

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ПЕРВИЧНЫХ ИММУНОДЕФИЦИТОВ В СВЕРДЛОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Дерябина С.С.^{1,2,3}, Лагутина О.В.¹, Тузанкина И.А.^{2,3,4}, Власова Е.В.⁴,
Болков М.А.^{2,3}

¹ ГБУЗ СО «Клинико-диагностический центр «Охрана здоровья матери и ребенка»», г. Екатеринбург, Россия

² ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук,
г. Екатеринбург, Россия

³ ФГАОУ ВПО «Уральский Федеральный университет имени Первого президента России Б.Н. Ельцина»,
г. Екатеринбург, Россия

⁴ ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница № 1», г. Екатеринбург, Россия

Резюме. В статье представлены результаты пятилетней работы лаборатории молекулярной диагностики клиничко-диагностического центра «Охрана здоровья матери и ребенка» по диагностике первичных иммунодефицитов в Свердловской области. Лаборатория была организована в 2009 для верификации диагноза моногенных наследственных заболеваний, входящих в Программу массового неонатального скрининга в РФ: фенилкетонурия, муковисцидоз, классическая галактоземия. Со временем спектр диагностируемых нозологий расширился, и с 2014 года лаборатория включила в работу новую группу заболеваний – врожденные ошибки иммунитета. Ежегодно областной регистр пациентов с первичными иммунодефицитами пополняется на 20-70 человек, что составляет от 15 до 43% всероссийского регистра. На 01.03.2020 в регистре пациентов с клиническим диагнозом «первичный иммунодефицит» состояло 526 человек, более половины из них (275) – дети до 18 лет. По расчетам специалистов частота выявленных случаев ПИД в Свердловской области составила 1:10 480 жителей, что свидетельствует не только о высоком уровне существующей службы клинической иммунологии, но и ожидаемо высокой частоте распространенности ПИД в регионе. Верификация диагноза «первичный иммунодефицит» у пациентов Свердловской области до 2014 года традиционно проводилась в московских клиниках (НМИЦ им. Д. Рогачева, МГНЦ). За 6 лет сотрудничества иммунологической службы области с медико-генетическим центром 47 детей получили молекулярно-генетическое подтверждение диагноза врожденных ошибок иммунитета в лаборатории областного клиничко-диагностического центра «Охрана здоровья матери и ребенка». В статье показаны данные регионального регистра пациентов с разделением на нозологические формы иммунозависимой патологии и дано подробное описание выполненной верификации диагнозов у пациентов с различными ПИД. У 43 человек обнаружена делеция 22-й хромосомы (синдром Ди Джорджи), у 7 пациентов и 6 членов их семей найдены мутации в гене *Btk* (X-сцепленная агаммаглобулинемия), у 1 ребенка подтвержден

Адрес для переписки:

Дерябина Светлана Степановна
ГБУЗ СО «Клинико-диагностический центр «Охрана
здоровья матери и ребенка»
620049, Россия, г. Екатеринбург, ул. Флотская, 52.
Тел.: 8 (982) 640-26-45.
Тел./факс: 8 (343) 374-31-10.
E-mail: ssderyabina@gmail.com

Address for correspondence:

Deryabina Svetlana S.
Medical Center "Health Care of Mother and Child
620049, Russian Federation, Yekaterinburg, Flotskaya str., 52.
Phone: 7 (982) 640-26-45.
Phone/Fax: 7 (343) 374-31-10.
E-mail: ssderyabina@gmail.com

Образец цитирования:

С.С. Дерябина, О.В. Лагутина, И.А. Тузанкина,
Е.В. Власова, М.А. Болков «Молекулярно-генетическая
диагностика первичных иммунодефицитов
в Свердловской области» // Медицинская иммунология,
2020. Т. 22, № 6. С. 1163-1172.
doi: 10.15789/1563-0625-MDO-2122
© Дерябина С.С. и соавт., 2020

For citation:

S.S. Deryabina, O.V. Lagutina, I.A. Tuzankina,
E.V. Vlasova, M.A. Bolkov "Molecular diagnostics of
primary immunodeficiencies in Sverdlovsk region", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2020,
Vol. 22, no. 6, pp. 1163-1172.
doi: 10.15789/1563-0625-MDO-2122
DOI: 10.15789/1563-0625-MDO-2122

синдром Ниймеген, разрешен трудный для диагностики семейный случай дефицита аденозиндезаминазы. Результаты исследования вдохновляют авторов на дальнейшее расширение спектра диагностируемой патологии и дают уверенность в том, что развитие региональных лабораторий подобного уровня может изменить к лучшему алгоритм диагностического процесса ПИД в России в целом: от пренатального и неонатального скрининга до разработки генной терапии отдельных форм иммунозависимой патологии.

Ключевые слова: первичные иммунодефициты (ПИД), молекулярно-генетическая диагностика, АДА-ТКИН, агаммаглобулинемия, делеция 22 хромосомы, синдром Ниймеген

MOLECULAR DIAGNOSTICS OF PRIMARY IMMUNODEFICIENCIES IN SVERDLOVSK REGION

Deryabina S.S.^{a, b, c}, Lagutina O.V.^a, Tuzankina I.A.^{b, c, d}, Vlasova E.V.^d, Bolkov M.A.^{b, c}

^a Medical Center “Health Care of Mother and Child”, Yekaterinburg, Russian Federation

^b Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

^c Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin», Yekaterinburg, Russian Federation

^d Sverdlovsk Regional Pediatric Clinical Hospital No. 1, Yekaterinburg, Russian Federation

Abstract. The article presents the results of the work performed by the laboratory of molecular diagnostics at the Medical Center “Health Care of Mother and Child” for the diagnosis of primary immunodeficiency in Sverdlovsk region over 5 years. The laboratory was organized in 2009 to verify the diagnosis of monogenic hereditary diseases included in the Neonatal Screening Program in the Russian Federation, e.g., phenylketonuria, cystic fibrosis, classical galactosemia. Over time, the range of diagnosed nosologies expanded, and since 2014, the laboratory has included in studies of a new group of disorders, i.e., congenital errors of immunity. Every year the Regional Registry of patients with primary immunodeficiencies (PIDs) replenished by 20 to 70 persons, thus comprising 15 to 43% of the entire Russian Registry for these conditions. As of 03/01/2020, the registry of patients with a clinical diagnosis of “primary immunodeficiency” consisted of 526 people, more than half of them (275) being children under 18 years of age. According to the expert calculations, the frequency of detected PID cases in the Sverdlovsk region is 1:10 480 inhabitants, which indicates not only high level of the existing clinical immunology service, but also the high expected frequency of PID in the region. Until 2014, verification of the “primary immunodeficiency” diagnosis in the patients from Sverdlovsk region was traditionally carried out in Moscow clinics (Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow Research Centre for Medical Genetics). Over 6 years of cooperation between regional immunological service with the medical genetic center, 47 children received molecular genetic confirmation of the diagnosis of congenital immunity errors at the laboratory of Regional Medical Center “Health Care of Mother and Child”. The authors present the data of Regional Registry of patients, classified into nosological forms of immune-dependent pathology and provide a detailed description of diagnostic procedures for the patients with various PIDs. A deletion of chromosome 22 (Di Giorgi syndrome) was found in 43 people, mutations in the Btk gene (X-linked agammaglobulinemia) were revealed in 7 patients and 6 members of their families, Nijmegen syndrome was confirmed in 1 child, a familial case of ADA-deficiency, difficult for diagnostics, was decided. The results of the study encourage the authors for further expansion of the spectrum of detectable disorders diagnosis, and give a hope that development of regional laboratories at this level may improve the diagnostic algorithm for PID diagnostic procedures in Russia, i.e., from prenatal and neonatal screening to the development of gene therapy for certain forms of immune-dependent disorders.

Keywords: primary immunodeficiency (PID), molecular diagnostics, ADA-SCID, agammaglobulinemia, del22q11, Nijmegen syndrome

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-29-14059.

Введение

Молекулярно-генетическая диагностика наследственных заболеваний в Свердловской области начала отсчет в 2008 году. Именно тогда было принято решение о создании в государственном бюджетном учреждении здравоохранения Свердловской области «Клинико-диагностический центр “Охрана здоровья матери и ребенка”» лаборатории молекулярной диагностики. Первые исследования были посвящены диагностике моногенных наследственных заболеваний, входящих в Программу массового неонатального скрининга в РФ: фенилкетонурия, муковисцидоз, классическая галактоземия. Со временем спектр диагностируемых нозологий расширялся, и с 2014 года лаборатория включила в работу новую группу заболеваний, требующих верификации диагноза молекулярно-генетическими методами, – группу первичных иммунодефицитов, или врожденных ошибок иммунитета.

Долгие годы, пока первичные иммунодефициты относили к группе редких заболеваний, пациентам приходилось страдать из-за поздней постановки диагноза и неадекватного и несвоевременного лечения [4, 5, 6]. Однако и в настоящее время ПИД в России и в Свердловской области в частности диагностируется после манифестации клинических признаков. Запоздывание точной диагностики усугубляется тем, что ПИД часто «надевает на себя маски» других заболеваний со сходными фенотипическими проявлениями, а отсутствие фенотипичности в отношении этой патологии у врачей первичного звена приводит больных к «диагностической одиссее» – длинному и трудному пути проведения серии диагностических исследований и направлений. Нередко полученные во время такого длительного обследования осложнения становятся уже необратимыми для пациента, несмотря на проводимое лечение [6, 7, 8].

Поскольку идея о проведении масштабных российских исследований на врожденные ошибки иммунитета пока только обсуждается в профессиональных кругах ученых-иммунологов, дать прогноз относительно распространенности этого заболевания в нашей стране весьма затруднительно. Тем не менее, если ориентироваться на количество населения, проживающего в Свердловской области, и сравнить его с близким по величине европейским государством (Германия, Франция), специалисты предполагают частоту первичных иммунодефицитов в пределах от 1:46 000 до 1:16 000. Первые попытки создания областного регистра пациентов с врожденными

ошибками иммунитета появились в 1986 году, когда общее количество больных не превышало 20 человек. Однако за 34 года региональная база данных по ПИД прирастала и обогащалась демографическими, клиническими, иммунологическими данными вновь выявленных пациентов с ПИД и исходами их заболеваний, что в конечном итоге позволило провести оценку частот отдельных форм первичных иммунодефицитов, в некоторых случаях прогнозировать развитие осложнений (аутоиммунных, аутовоспалительных, лимфопролиферативных), и, как итог, добавить новые знания о природе этих заболеваний с целью оптимизации их диагностики, лечения и профилактики.

В последние 10 лет регистр Свердловской области ежегодно пополняется на 30-70 человек, это составляет от 15 до 43% общероссийской базы данных. На 01.03.2020 в областном регистре пациентов с клиническим диагнозом «первичный иммунодефицит» состояло 526 человек, более половины из них (275) – дети до 18 лет (табл. 1). Таким образом, частота выявленных случаев ПИД в Свердловской области составила 1:10 480 жителей, что свидетельствует не только о высоком уровне существующей службы клинической иммунологии, но и ожидаемо высокой частоте распространенности ПИД в регионе.

Материалы и методы

Молекулярно-генетические исследования проводили в лаборатории молекулярной диагностики «Клинико-диагностический центр “Охрана здоровья матери и ребенка”». Геномную ДНК из сухих пятен крови и образцов цельной крови от 81 человека с подозрением на врожденные ошибки иммунитета выделяли автоматическим методом на станции MagNa Pure LC2.0 (Roche, США).

Поиск генетических причин развития патологии проводился доступными в лаборатории методами: мультиплексная лигазозависимая амплификация проб (MLPA), технология VACs-on-Beads, ПЦР в режиме реального времени, таргетное секвенирование. Анализ образцов проводили на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500 (США). Полученные данные обрабатывали с помощью программного обеспечения Coffalyser (MRC-Holland), Sequencing Analysis Software v. 6.0, Variant Reporter Software. Анализ патогенности новых вариантов нуклеотидной последовательности проводили, используя алгоритмы Mutation Taster, PolyPhen2.0., SIFT.

Результаты и обсуждение

Самой первой нозологией, с которой началась диагностика ПИД на Урале, стал синдром деле-

ТАБЛИЦА 1. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ДЕТЕЙ С ПЕРВИЧНЫМИ ИММУНОДЕФИЦИТАМИ ПО НОЗОЛОГИЧЕСКИМ ФОРМАМ В СВЕРДЛОВСКОЙ ОБЛАСТИ

TABLE 1. DISTRIBUTION OF CHILDREN WITH PRIMARY IMMUNODEFICIENCY BY NOSOLOGICAL FORMS IN THE SVERDLOVSK REGION

ПИД PID	Общее количество Number	Мальчики Male	Девочки Female	Из них умерло Died
Преимущественно гуморальные дефекты Predominantly antibody deficiencies				
Селективный дефицит IgA IgA deficiency	142	100	42	–
Агаммаглобулинемия с дефицитом В-клеток Agammaglobulinemia with B cell deficiency	10	10	–	3
Активация Р1К Syndrome activation Pi3k-delta	4	1	3	
Комбинированные с синдромами Combined immunodeficiencies				
Синдром Ди Джорджи DiGeorge syndrome	38	20	18	4
Синдром Ниймеген Nijmegen breakage syndrome	5	2	3	2
CHARGE	4	2	2	–
Синдром Вискотта–Олдрича Wiskott–Aldrich syndrome	4	4	–	1
Синдром Швахмана–Даймонда Schwachman–Diamond syndrome	6	1	5	–
Дефицит BACH2 end BRIDA BACH2 end BRIDA deficiency	1	–	1	–
Синдром Кабуки Kabuki syndrome	1	1	–	–
Атаксия-телеангиэктазия Ataxia Telangiectasia	11	5	6	6
Комбинированные неуточненные Combined unspecified	2	1	1	–
Комбинированные дефекты Combined deficiencies				
Ангидротическая эктодермальная дисплазия Anhidrotic ectodermal dysplasia	3	3	–	–
Дефекты фагоцитоза Phagocytosis defects				
Врожденная нейтропения Congenital eutropenia	3	1	2	
ХГБ Chronic granulomatous disease	6	6	–	4
ПИД с иммунной дисрегуляцией Diseases of immune dysregulation				
Синдром Грисцилле Griscilla syndrome	1	1	–	–
Синдром Чедиаки–Хигаси Chediak–Higashi syndrome	2		2	2

ПИД PID	Общее количество Number	Мальчики Male	Девочки Female	Из них умерло Died
Аутоиммунный лимфопролиферативный синдром Autoimmune lymphoproliferative syndrome	2	2	–	–
Аутовоспалительные заболевания Autoinflammatory disorders				
Синдром Маршалла PFAPA syndrome	9	2	7	–
Хронический мультифокальный остеомиелит CRMO	7	4	3	–
Неуточненные Unspecified	2	2	–	–
Средиземноморская лихорадка FMF	2	1	1	
Дефекты комплемента Complement deficiencies				
Дефицит фактора Н-зависимого белка FHR	1	1		
ТКИН SCID				
АДА-недостаточность ADA deficiency	2	2		1
Х-сцепленная ТКИН X-linked SCID	3	3		2
Т-В-НК⁺ T-B-NK ⁺	2	–	2	2
ИРЕХ-синдром IPEX syndrome	1	1		
Аутоиммунный полигландулярный синдром Autoimmune polyendocrine syndromes	1	1		
Всего Total	275	177	98	27

ции 22-й хромосомы. К основным клиническим проявлениям этого заболевания относят гипоплазию тимуса и паращитовидных желез, врожденный порок сердца, к сопутствующим – дисморфические аномалии лица и неба, умственную отсталость разной степени. Гетерогенность синдрома проявляется в том, что некоторые пациенты страдают тяжелыми состояниями с выраженным иммунодефицитом и врожденным пороком сердца, приводящим в некоторых случаях к летальности, другие же характеризуются легкими субклиническими формами (лицевые аномалии, носовой оттенок голоса), чаще выявляемыми у взрослых при направленном обследовании в связи с рождением больного ребенка [2].

Анализ критического участка 22q11 у детей с подозрением на данную генетическую патологию

в ЛМД проводится методом мультиплексной лигазной амплификации проб (MLPA) с использованием коммерческого набора SALSA MLPA probemix P250-B2 DiGeorge (MRC-Holland, The Netherlands), содержащим 48 различных MLPA-зондов, 29 из которых локализованы в хромосомном районе 22q11. Вторым доступным для использования в нашей лаборатории методом является технология VACs-on-Beads (PerkinElmer, Finland), более известная в качестве применения ее для пренатальной диагностики у плода 9 частых микроделеционных синдромов, включая синдром Ди Джорджи.

В настоящее время в регистре Свердловской области находятся 45 пациентов с данной патологией: 38 детей и 7 взрослых. При молекулярно-генетическом обследовании у 36 пациентов

детского возраста была выявлена микроделеция del22q11.2. Еще в двух случаях диагноз был основан на совокупности фенотипических проявлений и пороков развития: врожденный порок сердца, расщелина твердого неба и трудности в обучении; диагностика молекулярно-генетическим методом не проводилась. Возраст выявления генетической причины заболевания у детей варьировал от 0,5 мес до 15 лет, медиана составила 29,5 месяцев [3]. Семи плодам диагноз del22q был установлен пренатально, в сроке 12-13 недель по совокупности УЗ-маркеров и биохимического скрининга. На основании этого шесть семей приняли решение о прерывании беременности и одна семья отказалась от инвазивной процедуры аспирации ворсин хориона, поэтому верификация диагноза была произведена на 4-е сутки после рождения ребенка. Большинству пациентов (19 человек) диагноз был поставлен в первые 6 месяцев жизни, 11 детям — в возрасте от 2 до 7 лет, 8 пациентам — в возрасте 9-16 лет, взрослые (6 женщин, 1 мужчина — родители выявленных пробандов) были обследованы в возрасте 27-36 лет. Семейная форма наследования патологии отмечена в 5 семьях, две из них имеют по два ребенка с синдромом Ди Джорджи. Все взрослые имели фенотипические признаки синдрома делеции 22-й хромосомы, однако врожденный порок сердца выявлен только у мужчины. У тридцати обследованных детей врожденный порок сердца преимущественно представлен перерывом дуги аорты, тетрадой Фалло, дефектом межжелудочковой и межпредсердной перегородок, при этом 22 ребенка подверглись корректирующим операциям. Кроме того, у всех детей в анамнезе отмечались острые или хронические процессы вирусно-бактериальной этиологии различной локализации. Однако у детей до 3 лет ведущее место в структуре заболеваемости занимали заболевания респираторного тракта в виде рецидивирующих бронхитов, риносинуситов или повторных пневмоний, в то время как дети школьного возраста страдали от редких респираторных вирусных инфекций, как правило, не требовавших назначения антибактериальной терапии. Генерализованные бактериальные инфекции чаще поражали детей раннего возраста и в послеоперационном периоде (коррекция врожденного порока сердца), при этом требовалось назначение как антибактериальной/противогрибковой, так и иммунотропной терапии. Летальные исходы за время наблюдения отмечены у 4 детей: смерть троих детей произошла от генерализованного инфекционного процесса, 1 ребенка — от гипокальциемического криза. Тяжелые иммунологические нарушения по причине аплазии или гипоплазии тимуса при синдроме Ди Джорджи нередко приводят к не-

онатальной смертности, поэтому ранняя диагностика данной патологии очень актуальна, при этом современный этап генетической диагностики требует применения более расширенного арсенала диагностических методов. В частности, нельзя игнорировать сведения о больных с клинической картиной заболевания без выявления микроделеции, но с наличием точковых мутаций в гене *TBX1*, одного из генов, расположенных в локусе 22q11 [12]. При этом варианты генных изменений могут быть как однонуклеотидными заменами, так и делециями/вставками, затрагивающими сразу несколько нуклеотидов. *TBX1* ген принадлежит к семейству генов факторов транскрипции, поэтому качественные или функциональные изменения белков, кодируемых данными генами сказываются на процессе регуляции эмбриогенеза. Именно поэтому с сентября 2019 года мы поставили цель внедрить в лаборатории анализ генетической идентификации точечных мутаций в гене *TBX1* у пациентов с клиническими проявлениями синдрома Ди Джорджи без делеции критического региона. На сегодняшний день отработана методика прямого секвенирования 10 экзонов гена, набрана группа детей с заданными характеристиками. Особое внимание заслуживает семейный случай с подозрением на генетическую патологию у ребенка с врожденным пороком сердца и гипоплазией тимуса, умершего на первом году жизни. Анализ критического региона 22-й хромосомы с помощью технологии MLPA показал наличие в ДНК девочки микроструктурных нарушений именно в области гена *TBX1*. Поиск подобных генных изменений у родителей и определение характера наследуемости синдрома Ди Джорджи может послужить обоснованием необходимости проведения подобных исследований с целью будущей пренатальной и предимплантационной диагностики и в других семьях с отягощенным по данной генетической патологии анамнезом.

Второй нозологией, диагностика которой не требует больше транспортировки биологического материала пациента или его личной поездки в столицу, является X-сцепленная агаммаглобулинемия — первичное расстройство гуморального иммунитета, основным признаком которого является дефицит В-клеток. Заболевание манифестирует преимущественно как рецидивирующие вирусные, так и бактериальные инфекции. В гене брутонтирозинкиназы (*ВТК*), ассоциированном с патологией, известно более 500 различных вариантов, включающих единичные замены нуклеотидов, дефекты сайтов сплайсинга, а также короткие делеции и инсерции. В зарубежных исследованиях было отмечено, что некоторые из мутаций могут вызывать более высокую степень

нарушения гуморального иммунитета и раннюю манифестацию заболевания, однако прогнозирование клинических проявлений в случае конкретной аномалии гена все еще остается трудным, поскольку четкой корреляции генотип-фенотип доказать не удалось [11].

За последние 5 лет 11 пациентов с дефицитом В-клеточного звена были направлены иммунологами Екатеринбурга и Челябинска в лабораторию на исследование по поводу X-сцепленной агаммаглобулинемии. Молекулярно-генетическое подтверждение диагноза получили 7 детей. Только одному ребенку диагноз был установлен в 6 месяцев, два ребенка были обследованы врачом-иммунологом и диагностированы в 2 года, еще 4 – в возрасте 5 лет.

Периодически возникающие в детстве респираторные заболевания, протекающие без осложнений, не настораживали участковых докторов, поводом для обращения к узким специалистам (гематолог, иммунолог), как правило, служили острые клинические проявления заболевания: высокая (до 39 °С) температура тела, появление афтозных пятен, участков некроза на слизистых, развитие гигромы, изменения в анализе крови (левый ядерный сдвиг). Выявленные методом таргетного секвенирования кодирующей части гена варианты, приведшие к развитию агаммаглобулинемии, включали в себя как делеции (от участков в несколько нуклеотидов до протяженных, включающих целые экзоны), так и миссенс-нонсенс мутации (табл. 2). Необходимо заметить, что 3 варианта из детектированных 7 – совершенно новые, не описанные ранее изменения нуклеотидной последовательности гена. Однако характер наследования и алгоритмы предсказания патогенности данных вариантов позволяют сделать выводы о их каузативном значении.

В результате проведенных молекулярно-генетических исследований четверем семьям (4 матери, 1 тетя, 2 сиблинга) выдано заключение о семейном варианте наследования патологии. Такая информация дает родителям возможность провести комплекс пренатальной диагностики X-сцепленного заболевания у плода при следующей беременности, а сиблингам позволит в будущем грамотно подходить к вопросу планирования собственной семьи и рождению здорового потомства.

Дефицит аденозиндезаминазы (АДА) – первичное иммунодефицитное заболевание с аутосомно-рецессивным типом наследования, характеризующееся довольно широкой вариативностью клинических проявлений ПИД: от явных признаков тяжелого комбинированного иммунодефицита (ТКИН) до незначительных нарушений, случайным образом выявляемых у взрослых [10]. Данную гетерогенную группу иммунодефицитных состояний формируют генетические изменения последовательности ДНК на длинном плече 20 хромосомы 20q12-q13.1 – в гене *ADA*. Такие мутации оказывают влияние на экспрессию и функцию фермента аденозиндезаминазы, отвечающего за биосинтез нуклеиновых кислот и пролиферацию клеток. Выход из строя ключевого фермента пуринового обмена приводит к накоплению промежуточных продуктов (аденозиндифосфата, гуанозинтрифосфата и др.) с их повреждающим лимфотоксическим эффектом. Клинически это проявляется лимфопенией и невозможностью осуществления клеточного и гуморального вариантов иммунного ответа. В некоторых случаях у пациентов с дефицитом АДА наблюдаются проявления синдрома Оменна: у них развивается лимфоаденопатия, гепатоспленомегалия и эритродермия. Кроме этого, могут активизироваться аутоиммунные процессы, при-

ТАБЛИЦА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПАЦИЕНТОВ С ХЛА

TABLE 2. RESULTS OF THE MOLECULAR GENETIC STUDY OF PATIENTS WITH XLA

№ пациента Patient No.	Вариант <i>BTK</i> (GRCh38, NM_000061) Variant of <i>BTK</i> gene
1	c.1767G>T (p.Val535Phe)
2	c.37C>T (p.Arg13Ter)
3	c.1559G>A (p.Arg520Gln)
4	c.1051_1052insA (p.Gln297AlafsTer26)*
5	c.928_929insA (p.Ser310LysfsTer13)*
6	c.64_76del13(delCCTCTAAACTTCA), (p.P22fsTer28)*
7	del 2,3,4,5 ex

Примечание. * – ранее не описанные варианты.

Note. *, new variants.

водящие к таким заболеваниям, как гемолитическая анемия, идиопатическая тромбоцитопения, сахарный диабет, тиреоидит. Реже больные с недостаточностью ADA страдают от вовлечения в патологию костно-суставной системы, нарушения работы почек, нейросенсорной тугоухости, а также когнитивных и поведенческих расстройств [10]. Считается, что дефицит ADA составляет 20% от всех случаев ТКИН.

В нашем исследовании мы имеем необычный случай дефицита аденозиндезаминазы сразу у двух сиблингов в одной семье. Хотя проявления первичного иммунодефицита изначально были похожи (дакриоцистит, нейтропения, эозинофилия с рождения), однако тяжесть заболевания по-разному сказывалась на братьях. За два первых года наблюдения нами была исследована ДНК пробандов с целью поиска мутаций в генах *ILR2G*, *RAG1*, *SBDS*, *DCLRE*, однако это не привело к ожидаемому результату, причина ухудшающегося иммунодефицитного состояния не была определена. Старший ребенок с 5 лет находился под постоянным наблюдением гематолога и иммунолога. К 6 годам мальчику был поставлен диагноз острого лимфобластного лейкоза, в 7 лет проведена плановая трансфузия периферических стволовых клеток (ПСК) от HLA-идентичного неродственного донора. Определение химеризма по STR-локусам методом фрагментного анализа на 28-й день после трансплантации показала полный донорский химеризм. По данным клинического осмотра ребенок был выписан домой с положительной динамикой. Однако в течение следующего года на фоне течения хронической РТПХ и длительной иммуносупрессивной терапии, усилилось поражение кожи и слизистых. В возрасте 9 лет тяжелая генерализованная бактериально-грибковая инфекция вызвала нарастание неврологической симптоматики и полиорганную недостаточность, что привело к летальному исходу.

В 2019 году родители обратились в компанию Геномед (Москва) для проведения полноэкзомного секвенирования для младшего сиблинга. В результате было обнаружено 2 патогенных варианта в гене *ADA*, находящихся в гетерозиготном состоянии. Исследование архивного образца ДНК старшего пробанда и обоих родителей, проведенное в нашей лаборатории, подтвердило наличие семейных «ошибок» в нуклеотидной последовательности гена *ADA*. Семья проконсультирована по поводу возможного использования вспомогательных репродуктивных технологий, в том числе преимплантационного генетического тестирования на данную нозологию с целью рождения здорового ребенка.

В течение 2017–2019 г. в ЛМД были обследованы дети с микроцефалией, умеренной задержкой роста и рецидивирующими инфекциями различных органов, – характерных признаков другой формы первичного иммунодефицита – синдрома Ниймеген. Отличительными фенотипическими проявлениями данной патологии являются характерные дисморфичные черты лица – выдающаяся средняя часть, покатый лоб, гипоплазия нижней челюсти [9]. Главенствующая роль в диагностике синдрома отводится первичному осмотру и тщательному сбору анамнеза, что позволяет с большой вероятностью обнаружить макро- и микроаномалии развития ребенка и назначить генетические исследования на выявление мутации в гене *NBS1* и оценку стабильности хромосом.

В наше исследование вошла группа детей ($n = 21$, 14 мальчиков и 7 девочек) в возрасте от 21 суток до 12 лет (средний возраст $2,88 \pm 1,6$ лет) с подозрением на синдром Ниймеген. Наличие славянской мутации 657del5 в гене *NBS1* определяли с использованием набора «РеалБест-Генетика NBS1 657del5» (АО «Вектор-Бест»). Мутация 657del5 в гене *NBS1* была обнаружена в гомозиготной форме у новорожденного мальчика, который был направлен на данное исследование неврологом в 1 месяц. У родителей ребенка выявлено гетерозиготное носительство данной мутации (657del5/N). Полученные результаты ПЦР прошли подтверждение секвенированием по Сэнгеру данного участка ДНК всех членов семьи. Необходимо признать, однако, что применение набора реагентов «РеалБест-Генетика NBS1 657del5», разработанного и серийно выпускаемого в АО «Вектор Бест», затруднено из-за отсутствия РУ и было использовано нами исключительно в рамках клинического исследования. Остается надеяться, что процесс регистрации данного набора не затянется на годы и позволит уже в скором будущем проводить диагностику синдрома хромосомных поломок (синдрома Ниймеген) у детей с настораживающими фенотипическими признаками заболевания на раннем доклиническом этапе, что позволит предотвратить развитие у них жизнеугрожающих онкологических процессов.

Известно, что количественная оценка TREC и KREC в сухом пятне крови, взятом для неонатального скрининга, может иметь диагностическую ценность в анализе некоторых случаев младенческой смертности, регистрация которых проводится по фенотипическим проявлениям заболеваний, что, на наш взгляд, существенно снижает статистическую величину распространения патологии врожденных ошибок иммунитета [1]. В нашей лаборатории с 2014 года ведется работа по ретроспективному исследованию архивных

образцов крови детей (n = 147), умерших на первом году жизни, и специалисты пришли к выводу, что основной причиной летального исхода в 84 случаях явилось наличие первичного иммунодефицитного состояния. Такое заявление основывалось на совокупности клинических, гематологических и молекулярно-генетических данных (выраженное снижение количества TREC/KREC и находки изменений в нуклеотидной последовательности ДНК в генах *RAG1*, *ELANE*, *BTK* и микроделеции участка 22-й хромосомы), которые позволяют ретроспективно верифицировать первичную иммунную недостаточность в более чем 50% рассматриваемых случаев.

Заключение

Современные достижения лабораторной диагностики и молекулярной биологии дают возможности быстрого и точного тестирования пациентов с клиническими проявлениями иммунной недостаточности на врожденные ошибки иммунитета. Проведенная вовремя точная

диагностика позволяет в предельно ранние сроки начать лечение таких пациентов – выполнить трансплантацию костного мозга в первые месяцы жизни ребенка или даже провести ее внутриутробно с использованием стволовых клеток пуповинной крови. В этой связи развитие региональных лабораторий молекулярной диагностики, расширение спектра диагностируемой ими патологии может поднять на более высокий уровень весь алгоритм диагностических мероприятий: от пренатального и неонатального скрининга на ТКИН до подготовки пациента к успешному проведению трансплантации и дальше, к разработке генной терапии отдельных форм ПИД. Молекулярно-генетическая диагностика первичных иммунодефицитов в Свердловской области только начинает набирать обороты, впереди – внедрение новых методов и технологий, выход на освоение таргетных панелей, а в перспективе на полноэкзомное и полногеномное исследование методом массового параллельного секвенирования.

Список литературы / References

1. Дерябина С.С., Тузанкина И.А., Власова Е.В., Лаврина С.Г., Шершнева В.Н. Ретроспективная диагностика первичных иммунодефицитных состояний у детей в Свердловской области // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 6. С. 583-588. [Deryabina S.S., Tuzankina I.A., Vlasova E.V., Lavrina S.G., Shershnev V.N. Retrospective diagnosis of primary immunodeficiencies for children in Sverdlovsk region. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, Vol. 18, no. 6, pp. 583-588. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2016-6-583-588.
2. Намазова-Баранова Л.С., Гинтер О.В., Полунина Т.А., Давыдова И.В., Савостьянов К.В., Пушков А.А., Журкова Н.В., Мосьпан Т.Я. Синдром делеции 22q11.2: симптомы, диагностика, лечение // Вопросы современной педиатрии, 2016. Т. 15Б № 6. С. 590-595. [Namazova-Baranova L.S., Ginter O.V., Polunin T.A., Davydova I.V., Savostyanov K.V., Pushkov A.A., Zhurkova N.V., Mospan T.Ya. Deletion syndrome 22q11.2: symptoms, diagnostics, treatment. *Voprosy sovremennoy pediatrii = Current Pediatrics*, 2016, Vol. 15, no. 6, pp. 590-595. (In Russ.)]
3. Пашнина И.А., Власова Е.В., Дерябина С.С. Клинико-лабораторная характеристика пациентов с синдромом Ди Джорджи // Российский иммунологический журнал, 2019. Т. 22, № 3. С. 1239-1243. Pashnina I.A., Vlasova E.V., Deryabina S.S. Clinical and laboratory characteristics of patients with DiGiorgi syndrome. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2019, Vol. 22, no. 3, pp. 1239-1243. (In Russ.)]
4. Тузанкина И.А. К вопросу диагностики иммунопатологии // Медицинская иммунология, 2010. Т. 12, № 6. С. 485-496. [Tuzankina I.A. Some issues of diagnostics in immune pathology. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2010, Vol. 12, no. 6, pp. 485-496. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2010-6-485-496.
5. Чернышова Е.В., Анастасевич Л.А., Щербина А.Ю., Ларин С.С. Современные возможности скрининга и диагностики первичных иммунодефицитных состояний в педиатрии // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. 2016. № 3. С.124-128. [Chernyshova E.V., Anastasevich L.A. Shcherbina A.Yu., Larin S.S. Modern possibilities of screening and diagnostics of primary immunodeficiencies in pediatrics. *Pediatrics. Zhurnal im. G.N. Speranskogo = Pediatrics. G. Speransky Journal*, 2016, no. 3, pp. 124-128. (In Russ.)]
6. Щербина А.Ю. Маски первичных иммунодефицитных состояний: проблемы диагностики и терапии // Российский журнал детской гематологии и онкологии. 2016. Т. 3, № 1. С. 52-58. [Shcherbina A.Yu. Masks of primary immunodeficiency disorders: diagnostic and therapeutic problems. *Rossiyskiy zhurnal detskoy gematologii i onkologii = Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology*, 2016, Vol. 3, no. 1, pp. 52-58. (In Russ.)]
7. Bonilla F.A., Bernstein I.L., Khan D.A. et al. Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiency. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 2005, Vol. 94, no. 5, Suppl. 1, pp. S1-S63.

8. Chan A., Scalchunes C., Boyle M., Puck J.M. Early vs. delayed diagnosis of severe combined immunodeficiency: a family perspective survey. *Clin. Immunol.*, 2011, Vol. 138, no. 1, pp. 3-8.
9. Chrzanowska K.H., Gregorek H., Dembowska-Bagińska B. et al. Nijmegen breakage syndrome (NBS). *Orphanet. J. Rare Dis.*, 2012, Vol. 7, 13. doi: 10.1186/1750-1172-7-13.
10. Flinn A.M., Gennery A.R. Adenosine deaminase deficiency: a review. *Orphanet. J. Rare Dis.*, 2018, Vol. 13, no. 1, 65. doi: 10.1186/s13023-018-0807-5.
11. Hashimoto S., Tsukada S., Matsushita M. Identification of Bruton's Tyrosine Kinase (Btk) gene mutations and characterization of the derived proteins in 35 X-linked agammaglobulinemia families: a nationwide study of btk deficiency in Japan. *Blood*, 1996, Vol. 88, no. 2, pp. 561-573.
12. Sgardoli I.C., Vieira T.P., Simioni M., Monteiro F.P., Gil-da-Silva-Lopes V.L. 22q11.2 Deletion syndrome: Laboratory diagnosis and TBX1 and FGF8 mutation screening. *J. Pediatr. Genet.*, 2015, Vol. 4, no. 1, pp. 17-22.

Авторы:

Дерябина С.С. — к.б.н., заведующая лабораторией молекулярной диагностики ГБУЗ СО «Клинико-диагностический центр «Охрана здоровья матери и ребенка»», научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук; научный сотрудник кафедры иммунохимии ФГАОУ ВПО «Уральский Федеральный университет имени Первого президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

Лагутина О.В. — биолог лаборатории молекулярной диагностики ГБУЗ СО «Клинико-диагностический центр «Охрана здоровья матери и ребенка»», г. Екатеринбург, Россия

Тузанкина И.А. — д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук; ведущий научный сотрудник кафедры иммунохимии ФГАОУ ВПО «Уральский Федеральный университет имени Первого президента России Б.Н. Ельцина»; врач — аллерголог-иммунолог научного отдела ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница № 1», г. Екатеринбург, Россия

Власова Е.В. — к.м.н., заведующая отделением клинической иммунологии ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница № 1», г. Екатеринбург, Россия

Болков М.А. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук; научный сотрудник кафедры иммунохимии ФГАОУ ВПО «Уральский Федеральный университет имени Первого президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Deryabina S.S., PhD (Biology), Head, Laboratory of Molecular Diagnostics, Medical Centre "Health Care of Mother and Child"; Research Associate, Laboratory of Inflammation Immunology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Research Associate, Department of Immunochemistry, Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin», Yekaterinburg, Russian Federation

Lagutina O.V., Biologist, Laboratory of Molecular Diagnostics, Medical Centre "Health Care of Mother and Child", Yekaterinburg, Russian Federation

Tuzankina I.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Honoured Science Worker, Chief Research Associate, Laboratory of Immunology of inflammation, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Leading Research Associate, Department of Immunochemistry, Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin»; Clinical Allergologist/Immunologist, Research Department, Regional Pediatric Clinical Hospital No. 1, Yekaterinburg, Russian Federation

Vlasova E.V., PhD (Medicine), Head, Immunology Department, Regional Pediatric Clinical Hospital No. 1, Yekaterinburg, Russian Federation

Bolkov M.A., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Immunology of Inflammation, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Research Associate, Department of Immunochemistry, Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin» Yekaterinburg, Russian Federation

Поступила 23.08.2020
Принята к печати 20.09.2020

Received 23.08.2020
Accepted 20.09.2020