

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕРВИЧНЫХ ИММУНОДЕФИЦИТОВ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

GENETIC CHARACTERISTIC OF PRIMARY IMMUNO DEFICIENCIES IN THE REPUBLIC OF BELARUSB.

**В. В. Пугачёва¹, И. Е. Гурьянова¹, Е. А. Полякова¹,
А. А. Мигас¹, О. М. Хурс², С. О. Шарапова¹, И. С. Сакович¹,
С. Н. Алешкевич¹, Ю. С. Жаранкова¹, Т. А. Углова¹, М. В. Белевцев¹
V. Pugacheva¹, I. Guryanova¹, E. Polyakova¹, A. Migas¹, O. Hurs², S. Sharapova¹,
I. Sakovich¹, S. Aleshkevich¹, Yu. Zharankova¹, T. Uglova¹, M. Belevtsev¹**

¹Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии,
г. Минск, Республика Беларусь

²Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя», г. Минск, Беларусь
V_V_Pugacheva@mail.ru

¹Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology,
Minsk, Republic of Belarus

²Republican Scientific and Practical Center «Mother and child», Minsk, Republic of Belarus

Первичные иммунодефициты – группа редких, генетически обусловленных заболеваний, характеризующихся нарушениями в работе одного или нескольких звеньев иммунной системы. Эта группа заболеваний характеризуется тяжелым течением и высокой летальностью. В нашей работе мы провели генетическую диагностику пациентам для подтверждения диагноза первичный иммунодефицит и определения точной генетической поломки. В Республике Беларусь диагноз первичный иммунодефицит выставлен 470 пациентам, из них генетически подтвержден диагноз у 191 пациента (40,6%). Мы установили, что в Республике Беларусь большая часть пациентов с генетически подтвержденным диагнозом первичный иммунодефицит составляет группу комбинированных иммунодефицитов, ассоциированных с синдромами 59,2 % (n=113). Данная группа пациентов неоднородна в распределении по отдельным нозологиям.

Primary immunodeficiencies are a group of rare, genetically determined diseases characterized by impaired function of one or several elements of the immune system. This group of diseases is characterized by a severe course and high mortality rate. In our work, we performed genetic diagnosis of patients to confirm the diagnosis of primary immunodeficiency and determine the exact genetic breakdown. In the Republic of Belarus, 470 patients were diagnosed with primary immunodeficiency, of which 191 patients (40.6%) were genetically confirmed. We established that in the Republic of Belarus the majority of patients with a genetically confirmed diagnosis of primary immunodeficiency are a group of combined immunodeficiencies associated with syndromes 59.2 % (n=113). This group of patients is heterogeneous in the distribution of individual nosologies.

Ключевые слова: первичный иммунодефицит, генетическая диагностика, верификация диагноза.

Key words: primary immunodeficiency, genetic diagnosis, verification of the diagnosis.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2020-2-256-259>

Первичные иммунодефициты (далее – ПИД) — это гетерогенная группа генетически детерминированных заболеваний, возникающих в результате дефектов развития и/или функционирования иммунной системы [1]. Частота встречаемости первичных иммунодефицитов значительно варьирует, так наиболее частым иммунодефицитом является селективный дефицит IgA (частота встречаемости 1:400 чел.), который характеризуется довольно легким, чаще всего бессимптомным течением. В тоже время существует группа тяжелых комбинированных иммунодефицитов, частота встречаемости которых в среднем составляет 1:50 000 чел. Первичные иммунодефициты достаточно трудная для диагностики группа заболеваний. Диагноз ПИД устанавливается в результате совместной работы таких специалистов как врач-педиатр, врач-иммунолог, врач-гематолог, специалистов в области иммунологических и генетических лабораторных исследований. К характерным клиническим проявлениям ПИД, в первую очередь относят тяжелые, рецидивирующие, плохо отвечающие на стандартные схемы лечения инфекции. Спектр инфекций, определяемых у пациентов значительно широк, у пациентов наблюдаются вирусные, бактериальные, грибковые инфекции, инфекции вызванные простейшими. К тому же введение живых вакцин пациентам с некоторыми формами ПИД может привести к тяжелым инфекционным осложнениям.

У пациентов с диагнозом ПИД отмечается повышенная частота развития аутоиммунных заболеваний, а также злокачественных новообразований, задержка психического и физического развития, в некоторых случаях отмечаются пороки развития.

Отдельные группы иммунодефицитов характеризуются определенными клиническими и лабораторными признаками, что позволяет заподозрить иммунодефицитное состояние и провести дальнейшую, более глубокую диагностику. Однако установлено, что одно заболевание, может развиваться в результате мутаций в целой группе генов, например, тяжелый комбинированный иммунодефицит может развиваться в результате мутаций в генах: *ADA*, *IL2RG*, *RAG1/2*, *JAK3*, *IL7R* и др. В тоже время мутации в гене *RAG1/2* могут приводить к разным клиническим фенотипам: тяжелому комбинированному иммунодефициту, атипичному тяжелому комбинированному иммунодефициту, Оменн синдрому, комбинированному иммунодефициту с гранулёмами/аутоиммунными заболеваниями [2]. Часто встречаются более мягкие формы ПИД, которые характеризуются более поздней манифестацией и широким спектром клинических и лабораторных проявлений. Все выше перечисленные факторы затрудняют своевременную диагностику ПИД, что приводит к развитию значительного числа осложнений, а в тяжелых случаях – к летальному исходу.

Генетическая диагностика позволяет верифицировать диагноз, даже в случае атипичной манифестации, выставить диагноз на досимптомной стадии, определить носителей в семье, а также провести пренатальную диагностику.

Отсутствие у пациентов ранних клинических признаков, или наличие неявной, нетипичной клинической картины, не позволяет заподозрить наличие иммунодефицита у пациентов, в результате чего пациентам не проводятся дополнительные исследования, и иммунодефицит остается не диагностированным. Эта проблема решается введением программы скрининга. Разработка скрининговых программ для обнаружения наиболее тяжелых форм иммунодефицитов ведется уже давно. На данный момент оптимальным скрининговым методом для выявления иммунодефицитных состояний является определение количества кольцевых фрагментов ДНК Т и В-клеточного рецептора (TREC/ KREC). Снижение количества TRECs/KRECs позволяет заподозрить у пациентов иммунодефицит и провести дальнейшие иммунологические и генетические исследования, что обеспечит своевременную диагностику этого состояния.

Для лечения ПИД используют широкий спектр противобактериальных, противовирусных, противомикотических препаратов, проводят заместительную терапию препаратами иммуноглобулина и трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (далее – ТГСК). Ранняя диагностика ПИД позволяет начать своевременную терапию и позволяет избежать осложнений. Также ранняя диагностика позволяет провести пациентам ТГСК в первые месяцы жизни, что повышает шансы на успешный результат трансплантации.

В Республике Беларусь диагноз первичный иммунодефицит установлен 470 пациентам, из них генетически подтвержден диагноз у 191 пациента, что составляет 40,6%. В исследование включен 191 пациент (120 пациентов мужского пола и 71 женского) с генетически подтвержденным диагнозом первичный иммунодефицит.

Периферическую кровь с антикоагулянтom К2 ЭДТА использовали для получения лейкоцитарных клеток и последующего выделения ДНК методом фенол-хлороформной экстракции. Полученную ДНК использовали для постановки полимеразной цепной реакции (далее – ПЦР), в результате которой происходила амплификация исследуемых областей генов. Подбор праймеров для ПЦР осуществляли таким образом, чтобы их длина составляла 18-22 нуклеотидов, температура отжига находилась в диапазоне 55-65°C, содержание GC-пар составляло не более 70%. Также важными условиями в подборе праймеров являлись отсутствие на 3'-конце стабильных петель, отсутствие способности формировать праймер-димеры со вторым праймером, а также отсутствие альтернативных сайтов отжига прямого и обратного праймеров на ДНК человека в пределах одной хромосомы. Полученные в результате ПЦР амплификаты проверяли в 1,5 % агарозном геле на наличие специфического продукта и отсутствие контаминации, при режиме 220 Вольт (10 Вольт/см), 20 минут. Все амплификаты подвергали анализу конформационного полиморфизма одноцепочечных фрагментов ДНК. По результатам этого исследования анализировали электрофоретическую подвижность одноцепочечных фрагментов ДНК в паре донор и пациент. Образцы, изменившие конформацию одноцепочечных фрагментов по сравнению с контролем, подвергали секвенированию.

Определение мутаций проводили путем секвенирования по Сенгеру на генетическом анализаторе ABI 3130, Hitachi (Япония) и путем высокопроизводительного NGS секвенирования на генетическом анализаторе MiSeq, Illumina (США). Нуклеотидные последовательности, полученные во результате секвенирования по Сенгеру сравнивали с референсными последовательностями с использованием базы Ensemble. Анализ последовательностей проводили с помощью программ Sequencing Analysis 5.2 и BioEdit. Патогенность выявленных миссенс-мутаций оценивали с помощью программ-предикторов патогенности PolyPhen2, SIFT.

Обработку данных NGS секвенирования проводили с использованием автоматизированного алгоритма, включающего выравнивание прочтений на референсную последовательность генома человека (hg19), постпроцессинг выравнивания, выявление вариантов и фильтрацию вариантов по качеству, а также аннотацию выявленных вариантов с применением программы IGV и ряда методов предсказания патогенности замен (SIFT, PolyPhen2) [3]. Все найденные клинически значимые генетические варианты подтверждали секвенированием по Сэнгеру.

NGS секвенирование не позволяет выявлять инсерции и делеции длиной более 10 п.н., мутации в интронных областях (за исключением канонических сайтов сплайсинга), вариации длины повторов (в том числе экспансии триплетов), а также мутации в генах, у которых в геноме существует близкий по последовательности паралог (псевдоген). Метод не предназначен для определения цис-, транс-положения пар гетерозиготных мутаций, а также для оценки уровня метилирования, выявления хромосомных перестроек, полиплоидии, выявления мутаций в состоянии мозаицизма [3].

В соответствии с классификацией первичных иммунодефицитов [4] все пациенты с генетически подтвержденным диагнозом ПИД были разделены на 7 групп: иммунодефициты с поражением клеточного и гуморального иммунитета, комбинированные иммунодефициты, ассоциированные с синдромами, иммунодефициты с преимущественным дефектом антител, иммунодефициты с иммунной дисрегуляцией, иммунодефициты с врожденными дефектами числа и/или функций фагоцитов, иммунодефициты с дефектами врожденного иммунитета, аутовоспалительные синдромы (табл.).

На рисунке отражено распределение пациентов с генетически подтвержденным диагнозом ПИД по группам. Исходя из представленных данных можно сделать вывод о том, что преобладающее количество пациентов с генетически подтвержденным диагнозом ПИД относятся к группе комбинированных иммунодефицитов, ассоциированных с синдромами.

Таблица – Характеристика групп иммунодефицитов

Группа ПИД	Диагноз
Иммунодефициты с поражением клеточного и гуморального иммунитета	Тяжелый комбинированный иммунодефицит, комбинированный иммунодефицит
Комбинированные иммунодефициты, ассоциированные с синдромами	Синдром Вискотта-Олдрича, синдром Неймеген, синдром Блума, синдром Диджорджи, гипер-IgE-синдром (STAT3 (LOF) мутация), атаксия-телеангиэктазия, гипер-IgM-синдром (мутация в гене CD40LG)
Первичные иммунодефициты с преимущественным дефектом антител	X-сцепленная агаммаглобулинемия, общая вариабельная иммунная недостаточность (мутации в генах NFKB1, NFKB2, TAC1), синдром активации фосфоинозитид-3-киназы (PIK3CD (GOF) мутация), гипер-IgM-синдром (мутация в гене AICDA)
Первичные иммунодефициты с иммунной дисрегуляцией	Семейный гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз (мутация в гене UNC13D), первичный иммунодефицит с мутацией в гене LRBA, первичный иммунодефицит с GOF мутацией в гене STAT3, аутоиммунный полигландулярный синдром, X-сцепленный лимфопролиферативный синдром, тип 1 (мутация в гене SH2D1A), X-сцепленный лимфопролиферативный синдром, тип 2 (мутация в гене XIAP), аутоиммунный лимфопролиферативный синдром
Первичные иммунодефициты с врожденными дефектами числа и/или функций фагоцитов	Врожденная нейтропения, X-сцепленная хроническая гранулематозная болезнь
Первичные иммунодефициты с дефектами врожденного иммунитета	Хронический кожно-слизистый кандидоз (GOF мутация в гене STAT1)
Аутовоспалительные синдромы	STING-ассоциированная васкулопатия (мутация в гене TMEM173), гипер-IgD-синдром



Рисунок – Распределение пациентов с генетически подтвержденным диагнозом ПИД по группам иммунодефицитов в Республике Беларусь

У пациентов были обнаружены различные типы мутаций: миссенс-мутации, нонсенс-мутации, делеции, инсерции, приводящие к сдвигу рамки считывания, мутации в сайтах сплайсинга. Отмечаются особенности распределения мутаций по типам в пределах различных видов ПИД, так у пациентов с синдромом Неймеген характерной является гомозиготная делеция 5 нуклеотидов 6 экзона гена *NBN* с. 657-661 del ACAA, а у всех пациентов

с диагнозом синдром активации фосфоинозитид-3-киназы были выявлены миссенс-мутации. Синдром ДиДжорджи следует характеризовать отдельно так как для него типична делеция длинного плеча 22 хромосомы (del 22q11.2).

В Республике Беларусь диагноз первичный иммунодефицит установлен 470 пациентам, из них генетически подтвержденный диагноз выставлен 191 пациенту, что составляет 40,6%. Этот показатель отражает высокий уровень генетической диагностики первичных иммунодефицитов в Республике Беларусь.

Наиболее обширной группой пациентов с генетически подтвержденным диагнозом ПИД является группа комбинированных иммунодефицитов, ассоциированных с синдромами 59,2 % (n=113).

Группа комбинированных иммунодефицитов, ассоциированных с синдромами весьма неоднородна и представлена большим количеством назологий. В ходе проведения исследования была отмечена разнородность в распределении пациентов с ПИД по территории Беларуси.

ЛИТЕРАТУРА

1. *McCusker, C.* Primary immunodeficiency / C. McCusker, J. Upton, R. Warrington // *Allergy Asthma Clin. Immunol.* – 2018. – Vol. 14, № 2. – P. 141–152.
2. *Delmonte, O. M.* RAG deficiency: two genes, many diseases / O. M. Delmonte, C. Schuetz, L. D. Notarangelo // *J. Clin. Immunol.* – 2018. – Vol. 38, № 6. – P. 646–655.
3. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2) / О. П. Рыжкова [и др.] // Медицинская генетика. – 2019. – Т. 18, № 2. – С. 3–23.
4. International Union of Immunological Societies: 2017 Primary Immunodeficiency Diseases Committee Report on Inborn Errors of Immunity / C. Picard [et al.] // *J. Clin. Immunol.* – 2018. – Vol. 38, №1. – P. 96–128.

БИОИНФОРМАТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА ДАННЫХ МЕТАГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

BIOINFORMATICS TOOLS FOR METAGENOME SEQUENCING

Е. Я. Скоповец¹, Р. М. Смолякова²

K. Skapovets¹, R. Smolyakova²

¹ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»,
г. Минск, Республика Беларусь

²Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ,
г. Минск, Республика Беларусь
Skopovets@yandex.ru

¹Belarussian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology,
Minsk, Republic of Belarus

²Belarusian State University, ISEI BSU,
Minsk, Republic of Belarus

Благодаря технологическим усовершенствованиям в методах секвенирования, практически все представители микробиоты могут быть быстро проанализированы, избегая этапов культивирования. В частности, процедуры, основанные на секвенировании 16S рРНК следующего поколения, которые позволяют проводить микробную идентификацию с высокой пропускной способностью в конкретном метагеноме, представляют собой мощное средство для изучения состава и биоразнообразия микробных сообществ. Огромное количество метагеномных данных следующего поколения, генерируемых такими процедурами, требует биоинформационных инструментов, способных их анализировать.

Due to technological improvements in sequencing methods, virtually all the microbiotas from a given environment can be analyzed in a single run, avoiding cultivation steps. In particular, procedures based on 16S rRNA next-generation sequencing, which allow to hold the high throughput microbial identification within a specific metagenome, represent a powerful means to investigate the composition and the biodiversity of microbial communities. The enormous amount of next-generation metagenomic data generated by such procedures requires bioinformatics tools capable of analyzing them.

Ключевые слова: секвенирование, микробиота, метагеномика, биоинформатика.

Keywords: sequencing, microbiota, metagenomics, bioinformatics.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2020-2-259-261>