

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
"НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ОНКОЛОГИИ ИМЕНИ Н. Н. ПЕТРОВА" МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

СУСПИЦЫН
ЕВГЕНИЙ НИКОЛАЕВИЧ

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА НАСЛЕДСТВЕННЫХ
ЗАБОЛЕВАНИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ПОВЫШЕННЫМ
РИСКОМ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ОПУХОЛЕЙ**

3.1.6 – онкология, лучевая терапия

1.5.7 – генетика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени

доктора медицинских наук

Научный консультант:

чл.-корр. РАН, д.м.н., проф.

Имянитов Евгений Наумович

Санкт–Петербург

2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	18
1.1. Введение	18
1.2. Революционная роль новых технологий в диагностике наследственных болезней ..	21
1.3. Синдром Линча.....	31
1.4. Синдром Пейтца-Егерса	36
1.5. Генетические детерминанты наследственного рака молочной железы (РМЖ)	38
1.6. Туберозный склероз (ТС).....	41
1.7. Первичные иммунодефициты и онкологические заболевания: точки соприкосновения	50
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	77
2.1. Набор пациентов	77
2.3. Секвенирование по Сэнгеру и аллель-специфическая ПЦР	83
2.4. MLPA	85
2.5. Высокопроизводительное таргетное секвенирование	86
2.6. Полноэкзомное секвенирование.....	89
2.7. Оценка популяционной частоты повторяющихся вариантов	91
2.8. Анализ потерь гетерозиготности.....	91
2.9. Анализ микросателлитной нестабильности	92
2.10. Иммуногистохимическое окрашивание	92
2.11. Статистическая обработка данных	93
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	94
3.1. Исследование пациентов с подозрением на синдром Линча	94
3.2. Пациенты с синдромом Пейтца-Егерса	110
3.3. Идентификация гена <i>VLM</i> в качестве генетической детерминанты риска РМЖ	111
3.3. Исследование пациентов с туберозным склерозом (ТС)	126
3.4. Исследование первичных иммунодефицитных состояний (ПИД)	155
3.4.1. Эффективность таргетного мультигенного секвенирования	160
3.4.2. Пациенты с атаксией-телеангиэктазией	187
3.4.3. Синдром Блума.....	193
3.4.4. Прочие иммунодефициты.....	201
3.4.5. Оценка популяционной частоты повторяющихся мутаций.....	206
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	211
ВЫВОДЫ.....	215

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	218
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	220
СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ	221
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	222
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	263

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Диагностика наследственных заболеваний представляет существенную медицинскую и общественную проблему. Большинство болезней генетической природы являются редкими (орфанными) состояниями, характеризующимися низкой встречаемостью, хроническим течением и наносящими существенный вред здоровью пациентов. Согласно современным представлениям, общее число нозологических форм орфанных заболеваний составляет не менее 6000-8000 [Forman et al., 2012]. Генетические болезни вносят существенный вклад в общую картину заболеваемости: считается, что в совокупности ими страдает около 6-8% населения планеты [Haendel et al., 2020]. В России число пациентов, страдающих наследственными патологиями, достигает 8-11 миллионов человек [Volgina and Sokolov, 2021].

Новообразования входят в спектр клинических проявлений многих орфанных заболеваний, нередко являясь единственной и главной проблемой. К наиболее частым опухолевым синдромам относят наследственный рак молочной железы и яичников, а также наследственный неполипозный рак толстой кишки (синдром Линча (СЛ)) [Yurgelun and Hampel, 2018]. Помимо «классических» наследственных опухолевых синдромов, в перечень орфанных заболеваний включено немало количество других нозологий, при которых для больных характерен очень высокий риск развития солидных или гематологических новообразований. Эта группа представляет особый интерес: поскольку обычно первоочередное внимание врачей обращено на другие симптомы (выраженная предрасположенность к инфекциям, отставание в физическом развитии, дизморфии и т.д.), необходимость онкологической настороженности в отношении таких больных далеко не всегда очевидна [Кузьменко, Щербина, 2017].

ДНК-диагностика играет ключевую роль в выявлении заболеваний, ассоциированных с наследственной предрасположенностью к опухолям. Многим болезням этой группы свойственна высокая локусная гетерогенность; в подобных случаях использование технологий высокопроизводительного секвенирования нового поколения имеет ряд преимуществ перед исследованием отдельных генов. Следует отметить, что, спектр мутаций, ответственных за развитие болезней генетической природы, в том числе и опухолевых синдромов, может существенно отличаться в разных этнических группах, что неизбежно влияет на алгоритм диагностики. Таким образом, выявление региональных молекулярно-генетических особенностей наследственных опухолевых синдромов и смежных патологий крайне актуально с практической точки зрения.

СТЕПЕНЬ РАЗРАБОТАННОСТИ ТЕМЫ

Известно, что подавляющее большинство новообразований у человека возникает спорадически, по мере критического накопления мутаций в соматических клетках. В то же время, не менее 5–10% опухолей развивается на фоне наличия у пациентов наследственных дефектов, передающихся из поколения в поколение в соответствии с законами Менделя. Наряду с изучением «молекулярного портрета» опухоли, в современной онкологии все чаще рекомендуется поиск наследственных мутаций, обуславливающих высокий риск развития новообразований. Появление методов высокопроизводительного секвенирования (таргетные панели, экзомное и геномное секвенирование) существенно упрощает задачу диагностики этой группы болезней. Однако рутинное применение подобных методов ограничивается высокой стоимостью, трудоемкостью и длительностью получения результатов.

В отношении «изолированных» наследственных опухолевых синдромов, манифестирующих преимущественно у взрослых, эффективным способом выявления мутаций является таргетное секвенирование, поскольку гены и связанные с ними фенотипы достаточно хорошо известны. В то же время существует ряд редких заболеваний, проявляющихся в детском возрасте, для которых типична значительная предрасположенность к развитию опухолей [Кулева и соавт., 2012; Кулева, Имянитов, 2017]. Диагностика такого рода синдромов в онкологической практике более сложна, т.к. возникающие опухоли не всегда имеют специфические клинико-морфологические черты, а другие проявления заболевания (дизморфии, уязвимость к инфекциям, кожные пигментации и т.д.) часто остаются «за кадром». По-видимому, минимум 15–25% опухолей детского возраста возникает на фоне наследственных мутаций в генах, связанных с теми или иными генетическими синдромами [Byrjalsen et al., 2020; Sylvester et al., 2022]. Это свидетельствует о необходимости более внимательного подхода к диагностике наследственных заболеваний у детей с новообразованиями. При этом, показательно, что генетический анализ выявляет широкий спектр синдромов: от хромосомных заболеваний и дефектов ДНК-репарации до факоматозов и первичных иммунодефицитов.

В отличие от многофакторных заболеваний, которые диагностируются в разных странах мира с сопоставимой частотой, встречаемость наследственных болезней подвержена значимым географическим и этническим вариациям. Описание генетического груза популяций, включая обнаружение частых патогенных вариантов, может иметь большую практическую ценность, упрощая выявление причин наследственных заболеваний. Следует заметить, что, если генетика населения стран Европы и Северной Америки хорошо изучена, особенности многих других народов мира нуждаются в более тщательном исследовании. В России ведется активная работа по выяснению спектра генетических повреждений у представителей различных народов страны [Ginter et al., 2012; Зинченко и соавт., 2007; Zinchenko et al., 2020, 2021;

Васильева и соавт., 2020; Kozina et al., 2020], однако, эти исследования далеки от завершения. Некоторые этнические группы характеризуются выраженным «эффектом основателя», что позволяет проводить эффективный скрининг наследственных заболеваний с помощью нескольких недорогих ПЦР-тестов. Например, в Финляндии два повторяющихся варианта MLH1 ответственны за развитие более половины случаев синдрома Линча [Holmberg et al., 1998; Nyström-Lahti et al., 1995; Salovaara et al., 2000]. В славянских популяциях также выявлен ряд founder-вариантов, ассоциированных с моногенными заболеваниями, включая наследственные опухолевые синдромы [Eisensmith et al., 1995; Ivanova-Smolenskaya et al., 1999; Sokolenko et al., 2007; Yanus et al., 2019].

Опубликовано несколько работ, посвященных анализу генов репарации неспаренных оснований ДНК у российских пациентов с подозрением на синдром Линча [Maliaka et al., 1996; Moliaka et al., 1997; Цуканов и соавт., 2015; 2017; Шельгин и соавт., 2021], самая крупная из которых [Шельгин и соавт., 2021] насчитывает около 60 пациентов. Результаты этих исследований свидетельствуют о возможном существовании патогенных вариантов, встречающихся в России с повышенной частотой. Следует заметить, что информация о крупных перестройках генов репарации неспаренных оснований ДНК практически отсутствует.

Синдром Пейтца-Егерса (СПЕ) является очень редкой разновидностью наследственного полипоза ЖКТ. Количество случаев, включенных в молекулярно-генетические исследования СПЕ, не превышает нескольких десятков [Bennett et al., 2021; Wu et al., 2020]. Результаты работ, посвященных молекулярно-генетическим особенностям российских больных [Шельгин и соавт., 2016; Цуканов и соавт., 2017; Янова и соавт., 2022] пока не позволяют сделать серьезных выводов о спектре мутаций.

Изучению наследственных форм рака молочной железы (РМЖ) посвящено множество научных работ. 20-30% генетических дефектов в семьях с признаками наследственного РМЖ приходится на классические гены

высокого риска РМЖ – BRCA1 и BRCA2 [Fackenthal and Olopade, 2007]; определенная доля случаев данного заболевания объясняется мутациями ряда других генов (CHEK2, NBN, BARD1, PALB2, BRIP1, RAD50, RAD51C, TP53, MRE11, и т.д.) [Vahteristo et al., 2002; Gorski et al., 2003; Rahman et al., 2007; Bartkova et al., 2008; Bogdanova et al., 2009; Fostira et al., 2020]. Однако даже в совокупности все известные на сегодня генетические детерминанты не могут объяснить и половины случаев РМЖ, имеющих признаки менделевского наследования [Olopade et al., 2008].

Несмотря на растущее внимание к проблеме туберозного склероза (ТС), число работ, содержащих систематические сведения о молекулярно-генетических характеристиках российских пациентов, по-прежнему невелико [Аношкин и др., 2018; Аношкин и др., 2020; Дорофеева и др., 2015]; кроме того, мало внимания уделяется изучению связи генотипа и фенотипа.

Особняком стоит тема связи первичных иммунодефицитов и канцерогенеза. Онкологические заболевания являются второй по значимости причиной смерти пациентов с первичными иммунодефицитами после инфекций [Mortaz et al., 2016]. В некоторых случаях онкологическое заболевание может стать одним из первых проявлений иммунодефицита. До 25% детей с первичными иммунодефицитами страдают злокачественными новообразованиями [Salavoura et al., 2008]. Кроме того, отмечается более ранний возраст манифестации опухолей, развивающихся на фоне ПИД [Jonkman-Berk et al., 2015; Mayor et al., 2018]. По данным отечественного регистра первичных иммунодефицитных состояний, злокачественные новообразования выявлены у 5.6% детей с ПИД; при этом, максимальная частота развития опухолей (48%) отмечалась у пациентов с дефектами репарации [Mukhina et al., 2018]. В то же время, перечень иммунодефицитных состояний, ассоциированных с повышенным риском неоплазм, отнюдь не ограничивается этой группой. Своевременное установление диагноза позволяет уточнить объем профилактического наблюдения с целью раннего

выявления новообразований, а также провести медико-генетическое консультирование семьи.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Целью настоящего исследования является разработка молекулярно-генетических подходов к диагностике наследственных заболеваний, ассоциированных с высоким риском возникновения опухолей.

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для достижения поставленной цели сформулированы следующие задачи:

1. Проанализировать спектр молекулярно-генетических повреждений у российских пациентов с наследственным неполипозным раком толстой кишки (синдромом Линча).
2. Описать паттерн патогенных вариантов у российских пациентов с синдромом Пейтца-Егерса.
3. Выполнить исследование, направленное на поиск новых генетических детерминант наследственного рака молочной железы.
4. Проанализировать особенности опухолей молочной железы, возникающих у носительниц славянской мутации *BLM* p.Q548* .
5. Описать спектр молекулярно-генетических повреждений и особенности клинических проявлений заболевания у российских пациентов с туберозным склерозом.
6. Оценить возможности таргетного секвенирования в диагностике первичных иммунодефицитов (ПИД).

7. Проанализировать спектр патогенных вариантов гена *ATM* у российских пациентов с атаксией-телеангиэктазией.
8. Описать клинико-генетические особенности ПИД у российских пациентов.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА ИССЛЕДОВАНИЯ

- На большой группе больных охарактеризован спектр молекулярно-генетических повреждений в генах репарации неспаренных оснований ДНК, приводящих к развитию наследственного неполипозного рака толстой кишки (синдрома Линча). В отличие от наследственного рака молочной железы и яичников, для российских пациентов с синдромом Линча эффект основателя выражен лишь в незначительной степени. Впервые описана частота крупных перестроек генов *MLH1* и *MSH2*.
- Описан спектр молекулярно-генетических повреждений у российских пациентов с редкой разновидностью полипоза ЖКТ - синдромом Пейтца-Егерса. Установлена существенная частота крупных делеций гена *STK11*, что диктует необходимость включения метода MLPA в алгоритм ДНК-диагностики этого заболевания.
- Обнаружена новая «славянская» founder-мутация *BLM* с.1642C>T (p.Q548*), встречающаяся в российской популяции с существенной частотой и многократно повышающая риск развития рака молочной железы. Продемонстрировано, что опухоли молочной железы, возникающие у носительниц дефекта *BLM*, развиваются по механизму гаплонедостаточности.
- Охарактеризован спектр патогенных вариантов, приводящих к развитию туберозного склероза. Установлено, что российские пациенты с туберозным склерозом обладают рядом особенностей: в частности, наблюдается абсолютное преобладание спорадических форм

заболевания над семейными, а также отмечается высокая частота крупных перестроек гена *TSC2*. Пациенты, у которых не было выявлено мутаций *TSC1* и *TSC2*, представляют собой особую группу в отношении клинических признаков заболевания.

- Впервые проведено крупное систематическое исследование, посвященное поиску генетических факторов предрасположенности к рекуррентным инфекциям у российских пациентов; выявлен широкий спектр дефектов различных звеньев иммунной системы. Продемонстрированы возможности таргетного мультигенного секвенирования в диагностике первичных иммунодефицитов: установлено, что применение данного подхода позволяет выявить причину заболевания у 18% детей с явными клиническими признаками иммунной недостаточности и в 21% случаев, соответствующих критериям Jeffrey Modell Foundation (JMF).
- Проведено систематическое исследование молекулярно-генетических особенностей российских пациентов с атаксией-телеангиэктазией. Биаллельные мутации гена *ATM* обнаружены у всех 17 пациентов с клиническим диагнозом этого заболевания. При этом 17 из 30 патогенных аллелей (57%) у больных славянского происхождения были представлены тремя вариантами (с.5932G>T, с.450_453delTTCT, с.1564_1565delGA), что свидетельствует о существовании в России выраженного «эффекта основателя» в отношении атаксии-телеангиэктазии.
- У российских больных с синдромом Блума описаны нетипичные клинические особенности (отсутствие характерной лицевой эритемы, вызванной инсоляцией), которые, по-видимому, являются причиной неэффективной диагностики этого заболевания у нас в стране.
- В рамках диссертационной работы получен патент на изобретение № RU2755538C1 от 17.09.2021 «Способ синтеза наборов олигонуклеотидов для ампликонного таргетного секвенирования», предлагающий новый

экономичный способ целевого обогащения последовательностей ДНК с целью их дальнейшего анализа посредством высокопроизводительного секвенирования.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

- Проведено исследование частоты и спектра мутаций, приводящих к развитию ряда наследственных опухолевых синдромов (синдром Линча, синдром Пейтца-Егерса, наследственный рак молочной железы) у российских пациентов.
- Обнаружение повторяющихся «founder»-вариантов позволит упростить и удешевить процесс ДНК-диагностики наследственного рака молочной железы, синдрома Блума и атаксии-телеангиэктазии у нас в стране.
- Установлено, что пациенты с подозрением на туберозный склероз, у которых не было выявлено мутаций *TSC1* и *TSC2*, представляют собой особую группу в отношении клинических проявлений заболевания.
- Разработаны критерии отбора пациентов с рекуррентными инфекциями для генетического исследования, позволяющие повысить эффективность выявления патогенных мутаций в генах системы иммунитета.
- Создана и апробирована таргетная мультигенная панель, направленная на ДНК-диагностику большинства известных на данный момент нозологических форм первичных иммунодефицитов.
- Описано существование нетипичной клинической картины синдрома Блума (отсутствие характерной лицевой эритемы). Это наблюдение свидетельствует о целесообразности поиска мутаций в гене *BLM* у пациентов с сочетанием низкорослости и инфекционных проявлений.

МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Настоящее исследование основано на проспективном и ретроспективном изучении молекулярно-генетических и клинических характеристик пациентов с рядом редких заболеваний из группы наследственных опухолевых синдромов (синдром Линча, синдром Пейтца-Егерса), факоматозов (туберозный склероз), дефектов ДНК-репарации (синдром Блума, атаксия-теленагиэктазия), первичных иммунодефицитных состояний.

Основными методами исследования являлись секвенирование по Сэнгеру, множественная лигазозависимая амплификация зондов (MLPA), а также разновидности высокопроизводительного секвенирования нового поколения (NGS): таргетное и полноэкзомное секвенирование.

Полученные в ходе исследования данные подвергались статистическому анализу, а обобщённые результаты сопоставлялись с результатами, представленными в научной литературе.

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ

1. Исследование пациентов с клиническими признаками наследственного неполипозного рака толстой кишки (синдрома Линча) и наличием феномена микросателлитной нестабильности в опухолевой ткани позволяет выявить наследственные дефекты в генах репарации неспаренных оснований ДНК в 72% случаев.
2. Таргетное высокопроизводительное секвенирование в комбинации с MLPA является наиболее эффективным способом выявления мутаций в генах mismatch-репарации.
3. Наличие повторяющихся патогенных вариантов *STK11* нехарактерно для российских пациентов с синдромом Пейтца-Егерса.

4. Носительство славянской мутации *BLM* p.Q548* многократно повышает риск развития рака молочной железы. Карциномы молочной железы, развивающиеся у носительниц мутации *BLM*, отличаются сохранностью гетерозиготности в отношении данного гена.
5. У российских пациентов с туберозным склерозом наблюдается ряд особенностей в отношении клинических признаков и спектра мутаций *TSC1* и *TSC2*.
6. Таргетное высокопроизводительное секвенирование позволяет установить диагноз первичного иммунодефицита у 22% пациентов с подозрением на наличие этого состояния.
7. Для российских больных характерно наличие рекуррентных патогенных вариантов, ассоциированных с развитием атаксии-телеангиэктазии и синдрома Блума.

СТЕПЕНЬ ДОСТОВЕРНОСТИ И АПРОБАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты диссертационного исследования достоверны и обоснованы, что обеспечивается достаточным числом исследованных пациентов, использованием современных методов молекулярно-генетического тестирования, применением адекватных подходов к статистическому анализу полученных данных. Основу работы составляют результаты исследования 5500 пациентов и 2184 здоровых доноров.

Материалы диссертации представлены на онкологическом форуме «Белые ночи» (Санкт – Петербург, 2015, 2016, 2020), IV международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Казань, 2014), V Съезде биохимиков России (Сочи, 2016), XVI Всероссийском научном форуме с международным участием им. академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге 2017», конгрессе с международным участием "Здоровые

дети - будущее страны", 2017 (Санкт-Петербург), V международной конференции «Постгеном 2018: поисках моделей персонализированной медицины» (Казань, 2018), международных конференциях Европейского общества генетиков человека (ESHG) 2011 (Амстердам, Нидерланды), 2013 (Париж, Франция), 2014 (Милан, Италия), 2016 (Барселона, Испания), 2017 (Копенгаген, Дания), 2019 (Гётеборг, Швеция), 2020 и 2021 (online), 10th Biannual Meeting of the International Society of Systemic Auto-Inflammatory Diseases (ISSAID), 2019, (Генуя, Италия), 19th Biennial Meeting of European Society for Immunodeficiency (ESID), 2020 (online).

Основные диссертационные разработки применяются при диагностике больных в Федеральном Государственном Бюджетном Учреждении "Национальный Медицинский Исследовательский Центр Онкологии имени Н.Н. Петрова" министерства здравоохранения Российской Федерации.

Результаты исследования используются при проведении лекций и практических занятий со слушателями, клиническими ординаторами, аспирантами ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, на кафедре общей и молекулярной медицинской генетики ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России; подготовлено методическое пособие по редким заболеваниям, предназначенное для врачей и учащихся медицинских ВУЗов.

Материалы диссертации отражены в 52 опубликованных работах, в том числе в 48 статьях в журналах из Перечня ВАК РФ. 22 работы опубликованы в изданиях, принадлежащих к квартилю Q1. Кроме того, опубликовано 82 тезиса отечественных и международных конференций. Получен 1 патент Российской Федерации на изобретение.

ВНЕДРЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты исследования и разработанные диагностические методики внедрены в практическую деятельность научной лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (акт о внедрении 27.07.2022).

Материалы диссертации используются в учебном процессе кафедры общей и молекулярной медицинской генетики ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России.

ЛИЧНЫЙ ВКЛАД АВТОРА

Все основные этапы диссертационного исследования, включая создание регистра пациентов, обработку данных историй болезни и результатов высокопроизводительного секвенирования, а также обобщение полученных результатов, выполнены автором лично. Пациенты, имеющие фенотипические особенности, лично осмотрены автором на консультациях в качестве врача-генетика. Непосредственно автором сформулированы цель, задачи и рабочие гипотезы, научно обоснованы выводы и практические рекомендации.

Самостоятельно выполнены анализ отечественной и зарубежной литературы по теме работы, лабораторные исследования, а также статистическая обработка полученных результатов. Молекулярно-генетический анализ (таргетное и экзомное секвенирование нового поколения) выполнен совместно с коллективом научной лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России.

СООТВЕТСТВИЕ ДИССЕРТАЦИИ ПАСПОРТУ НАУЧНОЙ СПЕЦИАЛЬНОСТИ

Диссертационная работа соответствует паспорту специальностей 3.1.6 «онкология, лучевая терапия» и 1.5.7 «генетика».

СТРУКТУРА И ОБЪЁМ ДИССЕРТАЦИИ

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы и приложения. Текст изложен на 277 страницах, иллюстрирован 24 таблицами и 9 рисунками. Список литературы включает 483 источника, в том числе 60 опубликованных отечественными и 423 - зарубежными авторами.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Введение

Наследственные заболевания и риск развития опухолей

Немалая часть злокачественных и доброкачественных опухолей развивается на фоне выраженной генетической предрасположенности, поэтому в практической онкологии помимо исследования характеристик новообразования нередко проводится поиск герминальных мутаций в крови пациента.

Известно, что наследственные дефекты обнаруживаются у 8.5% - 35.5% больных опухолями детского возраста [Sylvester et al., 2018, 2022]. Неслучайно именно с описания гипотетического механизма развития билатеральной ретинобластомы у детей (знаменитая «двухударная» гипотеза) фактически началась история молекулярной онкологии [Knudson, 1971]. Существенная часть новообразований, развивающихся у взрослых, также относится к наследственным; например, для рака молочной железы эта доля составляет 5-10%, а для рака яичников – 10-15% [Gage et al., 2012].

Косвенными маркерами наследственных форм опухолей являются нетипично ранний возраст манифестации, отягощенный семейный анамнез, тенденция к развитию первично-множественных опухолей [Brown et al., 2020].

Существует целый ряд наследственных опухолевых синдромов, при котором развитие новообразований, как правило, является главным и, зачастую, единственным проявлением. К таким заболеваниям относятся наследственный рак молочной железы и яичников, наследственный неполипозный рак толстой кишки (синдром Линча), наследственный медуллярный рак щитовидной железы, семейный аденоматозный полипоз и т.д.

В то же время, у больных многими редкими заболеваниями развитие опухолей сочетается с совокупностью других фенотипических проявлений [Gonzalez and Riddle, 2016]. К этой группе относятся, в частности, такие заболевания как туберозный склероз, нейрофиброматоз, синдромы с хромосомной нестабильностью (с-м Ниймеген, синдром Блума, атаксия-телеангиэктазия, анемия Фанкони) и синдром Нунан и т.д. Некоторые из упомянутых заболеваний являются предметом настоящего исследования и подробно обсуждены в разделах 1.3 – 1.6.

Своевременное выявление орфанных заболеваний, характеризующихся повышенным риском развития новообразований, имеет важное практическое значение, т.к. пациенты (а часто - и их родственники) нуждаются в профилактическом наблюдении.

Этнические особенности наследственных заболеваний

Существенно, что наследственные заболевания, редкие в одной популяции, могут быть весьма частыми в другой – это связано с особенностями генофонда, привнесёнными «прародителями» той или иной этнической группы. Например, болезнь Гоше или синдром Блума встречаются с повышенной частотой у евреев-ашкенази [Chargow, 2004], а наследственный нефротический синдром – у финнов [Jalanko, 2009].

Объем знаний об эпидемиологии наследственных болезней в различных регионах России неуклонно растет [Ginter et al., 2012; Зинченко и соавт., 2007; Zinchenko et al., 2020, 2021; Васильева и соавт., 2020; Kozina et al., 2020]. Очевидно, что многие этнические группы, проживающие на территории нашей страны, обладают характерными особенностями генетического груза. В частности, описан спектр наследственных заболеваний у жителей Карачаево-Черкессии [Gundorova et al., 2018; Zinchenko et al., 2020], Татарстана [Гинтер и соавт., 2012a, 2012b), Башкирии, Чувашии и Удмуртии [Бессонова и соавт., 2012]. Выраженным генетическим своеобразием отличаются якуты, среди

которых распространены такие уникальные генетические заболевания как множественная экзостозная хондродисплазия, синдром 3М, мукополисахаридоз-плюс (MPSPS), SOPH-синдром, спиноцеребеллярная атаксия типа 1 и т.д. [Пузырев, Максимова, 2008; Platonov et al., 2016; Максимова и соавт., 2016; Vasilev, Sukhomyasova, Otomo, 2020].

Систематизация сведений об эпидемиологии редких болезней в различных популяциях очень важна, так как дает возможность более рационально организовать систему медицинской помощи в конкретном регионе [Nguengang Wakar et al., 2020].

Целый ряд исследований посвящен молекулярно-генетическим аспектам наследственных болезней [Balashova и др., 2020; Barbitoff и др., 2019; Miroshnikova и др., 2021; Petrova и др., 2020; Ramensky и др., 2021]. Особенности генетического груза разных народов следует учитывать при создании алгоритмов скрининга частых патогенных вариантов: в частности, показано, что спектр мутаций *CFTR*, ассоциированных с развитием муковисцидоза, существенно различается между европейскими и северокавказскими народностями России [Petrova и др., 2021]. При этом сведения о спектре генетических повреждений при редких моногенных состояниях по-прежнему не отличаются полнотой, что неудивительно, принимая во внимание многообразие народов, населяющих территорию Российской Федерации. Следует отметить, что помимо анализа сведений, полученных в учреждениях медико-генетической службы и различных ЛПУ, возможен и другой подход к оценке распространенности наследственных заболеваний. Изучение данных секвенирования экзонов позволяет оценить разнообразие патогенных аллелей и примерную частоту той или иной болезни [Yanus et al., 2019; Barbitoff et al., 2019; Orlov et al., 2022]. Решению этой задачи способствует создание базы генетических вариантов, встречающихся у жителей РФ (RUSeq; <http://ruseq.ru>).

Поскольку люди славянского происхождения составляют более 80% населения России, накопление сведений о спектре повторяющихся

«славянских» мутаций имеет большое практическое значение. Восточные (русские, украинцы, белорусы), западные (поляки, чехи, словаки) и южные (сербы, хорваты, болгары, словенцы) славяне составляют очень крупную по численности (около 300 млн. человек) группу родственных народов. Сведения об общем происхождении этих популяций, полученные на основании данных археологии и лингвистики, в настоящее время подтверждены масштабным изучением аутосомных SNP, митохондриальной ДНК и маркеров Y-хромосомы [Kushniarevich et al., 2015]. Неудивительно, что набор патогенных аллелей, и, следовательно, спектр наследственных заболеваний в значительной степени схож у разных славянских народов. В частности, описаны повторяющиеся founder – мутации, ассоциированные с развитием наследственного рака молочной железы [Bogdanova et al., 2009], синдрома Ниймеген [Seemanova et al., 2016], муковисцидоза [Dork et al., 2000], мукополисахаридоза VI типа [Jurecka et al., 2014], изолированного гипогонадотропного гипогонадизма [Choi et al., 2015; Zernov et al., 2016], синдрома Оменн [Sharapova et al., 2016], болезни Шарко – Мари – Тус Iva [Дадали и соавт., 2009] и др.

1.2. Революционная роль новых технологий в диагностике наследственных болезней

Для многих орфанных патологий первичный генетический дефект остаётся неизвестным; в качестве примера можно привести синдромы Маршалла или Мелькерссона-Розенталя. Нередко ситуация осложняется высокой клинической и генетической гетерогенностью заболевания, что снижает диагностическую ценность отдельных, «точечных» тестов, при этом существенно увеличивая стоимость исследования. В перспективе эту проблему должно решить внедрение высокопроизводительных методов геномного анализа.

Сравнительная геномная гибридизация на микрочипе (arrayCGH) является относительно новым молекулярно-цитогенетическим методом, позволяющим детектировать увеличение или уменьшение копийности хромосомных локусов в масштабе всего генома [Calasanz and Cigudosa, 2008]. По сути, CGH является методом прецизионного кариотипирования. В качестве инструмента используется мембрана («микрочип»), на которой расположены тысячи локус-специфических ДНК-фрагментов. Анализируемая ДНК гибридизуется с подобным микрочипом; каждый сигнал соответствует определённому локусу генома, а изменение интенсивности сигнала свидетельствует об изменении копийности того или иного участка хромосом. В то время как пределом чувствительности «классического» кариотипирования является приблизительно 5-10 миллионов пар оснований, arrayCGH способна достигать разрешения менее 100 тысяч нуклеотидов [Ren et al., 2005]. Этот метод крайне полезен для диагностики детей с множественными микроаномалиями развития и/или отклонениями в умственном развитии, имеющими нормальный кариотип. Вместе с тем, необходимо отметить, что arrayCGH неспособна детектировать сбалансированные хромосомные перестройки. Широкое применение данной технологии ограничивается высокой стоимостью микрочипов. Кроме того, наличие в человеческом геноме полиморфных участков с вариабельной копийностью (CNV, copy number variation), медицинская значимость которых часто неизвестна, влечет за собой сложности при интерпретации результатов.

Важнейшим технологическим прорывом в молекулярной медицине стало появление так называемого секвенирования нового поколения (NGS, Next Generation Sequencing; massive parallel sequencing). Несмотря на свою недолгую историю, этот метод зарекомендовал себя в качестве мощного инструмента медицинской генетики, позволив обнаружить гены, причастные к развитию многих редких заболеваний [Gilissen et al., 2011, Ku et al., 2012, Ng et al., 2010]. В частности, за последние несколько лет при помощи массивного

параллельного секвенирования были открыты генетические причины синдромов Кабуки, Миллера, Фаулера, Сенсенбренера и т.д. [Ku et al., 2012].

Диагностическое применение полногеномного секвенирования пока ограничивается высокой стоимостью анализа, необходимостью приобретения дорогостоящего оборудования и сложностью биоинформатической обработки огромного массива полученных данных. В то же время экзомное секвенирование, подразумевающее анализ лишь небольшой части генома, имеет значительно лучшие перспективы внедрения. Известно, что подавляющее большинство генетических заболеваний связано с мутациями в участках ДНК, кодирующих синтез белков, поэтому анализ экзома, по-видимому, достаточен для детекции подавляющего большинства патогенных мутаций [Ng et al., 2010]. Крайне важно, что использование экзомного секвенирования позволяет производить диагностический поиск без четкой предварительной гипотезы, т.е., является наиболее оправданным в тех случаях, когда установление диагноза на основании клинических признаков и результатов традиционных исследований (биохимия, кариотипирование, FISH, отдельные молекулярно-генетические тесты) затруднительно.

Существует также вариант экзомного секвенирования, основанный на выборочной расшифровке кодирующих последовательностей ограниченного числа произвольно выбранных генов. Такой мультигенный анализ называют таргетным; он наиболее пригоден для диагностики заболеваний, развитие которых может быть связано с повреждением одного из десятков или сотен (!) генов, т.е., характеризующихся высокой генетической гетерогенностью [Ku et al., 2012]. Примерами таких заболеваний являются несиндромальная глухота, пигментный ретинит, спиноцеребеллярные атаксии, кардиомиопатии, болезнь Шарко-Мари-Тус. Возможно создание диагностических панелей, позволяющих одномоментно анализировать все известные гены, причастные к развитию серьезных генетических заболеваний, а также выявить гетерозиготное носительство рецессивных мутаций у лиц, вступающих в брак [Kingsmore et al., 2011]. Кроме того, технологии NGS позволили установить,

что причиной развития некоторых синдромов, например, болезней с макросомией и сосудистыми аномалиями, являются соматические мутации, присутствующие лишь в определенной фракции клеток организма [Yeung et al., 2017; Nathan et al., 2017].

Вероятно, накопление данных, полученных с помощью высокопроизводительного секвенирования, приведет к тому, что многие заболевания, которые сейчас относят к категории мультифакториальных (аутизм, некоторые психиатрические и неврологические болезни), в недалеком будущем перейдут в группу состояний, вызванных редкими мутациями [Singleton, 2011].

Стоит отметить, что на современном этапе развития технологий полногеномного анализа подразумевается, что полученные результаты должны верифицироваться с помощью других методов (секвенирование по Сэнгеру, количественная ПЦР, FISH, arrayCGH и т.д.).

Появление высокопроизводительного секвенирования нового поколения (Next Generation Sequencing, NGS) привело к революционному расширению возможностей ДНК-диагностики. Совмещая в себе диагностические и исследовательские возможности, эта технология становится важнейшим инструментом изучения наследственной патологии.

Следует заметить, что процедура высокопроизводительного секвенирования параллельно разрабатывалась различными компаниями (Illumina, Roche, Life Technologies), каждая из которых предлагает собственные технологические решения. Как правило, методика подразумевает одновременное секвенирование миллионов коротких фрагментов ДНК с последующей «сборкой» индивидуальных прочтений в геном или экзом. Вместе с тем существуют и другие подходы: например, метод одномолекулярного секвенирования в реальном времени, предложенный фирмой Pacific Biosciences, даёт возможность одномоментно получать очень длинные прочтения (до 60000 нуклеотидов). Компанией Oxford Nanopore разработан метод, основанный на протягивании одноцепочечной молекулы

ДНК через нанопору; изменение силы тока при прохождении молекулы через пору зависит от нуклеотидного состава [Deamer et al., 2016].

Помимо собственно технологии секвенирования, методы NGS отличаются по объему выполняемого анализа. Особенностью, отличающей таргетное и экзомное секвенирование от полногеномного, является предварительное обогащение ДНК в отношении интересующих нас последовательностей: в этом случае процедура исследования включает несколько общих этапов: подготовка библиотеки, целевое обогащение, секвенирование, и биоинформатическая обработка данных.

В настоящее время наиболее популярным является секвенирование на платформе фирмы Illumina. Согласно её протоколу, ДНК фрагментируется на короткие кусочки (300-600 пар оснований), к которым пришиваются адаптеры – нуклеотидные последовательности, необходимые для закрепления на микрочипе и начала процесса секвенирования. Этот этап называется подготовкой ДНК- библиотеки.

Обогащение по кодирующей последовательности достигается посредством гибридизации ДНК с биотинилированными зондами, специфичными к экзонам (Рис.1) или последовательностям нужных генов. Фрагменты ДНК, связавшиеся с зондами, осаждаются на магнитных частицах, покрытых стрептавидином, и затем используются для секвенирования, а прочие (несвязавшиеся) участки удаляются.

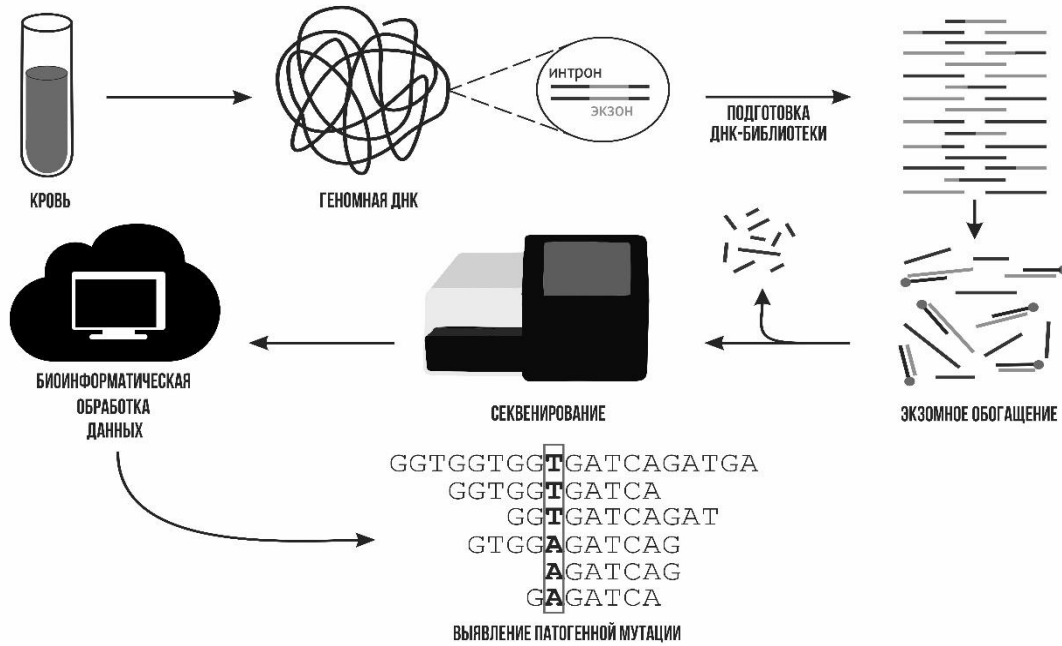


Рис.1. Основные этапы экзомного секвенирования

Следующие этапы анализа осуществляются непосредственно в приборе (секвенаторе), в который помещается стеклянный микрочип. На его поверхности фиксированы олигонуклеотиды, последовательность которых комплементарна адаптерам, находящимся на концах фрагментов ДНК. Связывание олигонуклеотидов с адаптерами инициирует проведение т.н. «мостиковой» (bridge) ПЦР, в результате которой генерируется огромное количество кластеров или ДНК-клонов.

Размноженные таким образом фрагменты ДНК далее подвергаются «секвенированию посредством синтеза». Оно начинается с добавления праймера, комплементарного адаптеру на одном из концов фрагмента; отжиг праймера позволяет ДНК-полимеразе проводить присоединение нуклеотидов. Встраивание нуклеотида, комплементарного матрице, вызывает изменение уровня флуоресцентного сигнала. Последовательное считывание флуоресценции от каждого встроившегося в цепь нуклеотида дает возможность определить состав короткого фрагмента ДНК. В итоге прибор переводит флуоресцентный сигнал на язык букв (нуклеотидов), продуцируя большое число индивидуальных прочтений, которые затем сопоставляются с

референсным геномом человека. Выявленные отличия подвергаются аннотации, т.е., оценке их влияния на аминокислотную последовательность.

В среднем, в результате секвенирования экзома обнаруживается около 20000 генетических вариаций [Gilissen et al., 2011]; далее они подвергаются фильтрации, задачей которой является отсеивание нейтральных вариантов, не обладающих функциональной значимостью. Этот этап представляет наибольшие сложности, поскольку эффект многих генетических вариантов в отношении функции белка неясен. Для успешного выявления искомым патогенных мутаций необходимо тесное взаимодействие врача-генетика и специалистов в области биоинформатической обработки данных.

В случае таргетного секвенирования поиск вариантов, причастных к развитию заболевания, упрощается, поскольку число исследуемых генов и, следовательно, выявляемых вариантов, значительно меньше.

За относительно недолгое время своего существования экзомное секвенирование (ЭС) убедительно продемонстрировало свою эффективность в установлении причин генетических заболеваний [Gilissen et al., 2011; Ku et al., 2012, Ng et al., 2010; Singleton, 2011]. В первую очередь, речь идет о болезнях, наследование которых подчиняется законам Менделя. В таких случаях наиболее понятна логика поиска патогенных мутаций: выявленное повреждение должно присутствовать у больных, и отсутствовать у здоровых членов семьи. Всего за несколько лет практического применения (2009-2014 гг.) экзомное секвенирование позволило обнаружить более 150 новых генов, причастных к развитию редких генетических синдромов [Rabbani et al., 2014], и список открытий продолжает постоянно пополняться. Технологический прорыв привел к существенному обогащению представлений о некоторых заболеваниях, этиология которых ранее была неясна: в частности, удалось выявить редкие мутации, приводящие к возникновению шизофрении и расстройств аутистического спектра [Baker and Jeste, 2015].

Экзомное секвенирование с успехом применяется для диагностики наследственных опухолевых синдромов [Sokolenko et al., 2015],

эндокринопатий [de Bruin and Dauber, 2015], неврологических заболеваний [Ghaoui et al., 2015; Hoischen et al., 2014] и первичных иммунодефицитов [Platt et al., 2014; Stray-Pedersen et al., 2017; Arts et al., 2019]. Обсуждается также целесообразность использования ЭС для неонатального скрининга [Landau et al., 2014; Francescatto and Katsanis, 2015].

Применение высокопроизводительного секвенирования наиболее оправдано в двух ситуациях – при диагностике редких (орфанных) заболеваний, а также при ДНК-тестировании в случае болезней, обладающих высокой генетической гетерогенностью.

Большинство орфанных заболеваний имеет генетическую природу [Nguengang Wakar et al., 2020], однако, несмотря на огромный объем проведенных исследований, около половины пациентов так никогда и не получает конкретного диагноза [Shashi et al., 2014]. Этот факт связывают с высокой гетерогенностью и атипичной симптоматикой более-менее известных заболеваний, а также недостаточным знакомством врачей со многими видами редкой патологии.

Нередко перед клиницистом стоит дилемма, какую именно разновидность NGS стоит выбрать в конкретной ситуации. Таргетные панели дают более глубокое покрытие, а значит, более качественную расшифровку анализируемых последовательностей; вместе с тем, необходимо четко представлять круг генов, имеющих возможную связь с фенотипом больного. С другой стороны, экзомное секвенирование даёт возможность поиска «без гипотезы», то есть без предварительного представления о том, какие именно гены, сигнальные каскады или метаболические пути повреждены в организме пациента. В этом случае оно служит исследовательским инструментом, результатом применения которого может стать открытие нового гена или не описанного ранее синдрома. Как показывает опыт, завершение «диагностической одиссеи», т.е., обретение пациентом конкретного диагноза, всегда приносит семье существенное облегчение.

Учитывая исключительную редкость некоторых заболеваний, успех поиска зависит от рациональной организации исследования. Выявить патогенную мутацию относительно просто, если удаётся найти семью, у нескольких членов которой присутствуют сходные клинические признаки. Если это невозможно, то можно попытаться набрать в исследование спорадические случаи заболевания с похожей симптоматикой.

Нередко заболевания генетической природы возникают вследствие мутаций *de novo* – наследственных дефектов, которые отсутствуют в экзоте родителей и возникают непосредственно у ребёнка вследствие естественного мутагенеза. Для того чтобы выявить такую мутацию, требуется провести экзомное секвенирование триады «здоровый отец – здоровая мать – больной ребенок».

В процессе диагностики болезней с высокой генетической гетерогенностью использование ЭС может быть продиктовано соображениями экономической целесообразности. Например, известно около 250 генов, причастных к развитию несиндромальной тугоухости; помимо этого, нарушения слуха входят в структуру примерно 400 различных синдромов [Rabbani et al., 2014]. В подобной ситуации выборочный анализ отдельных генов крайне редко приводит к успеху.

Несмотря на то, что современные методы ЭС позволяют установить точный диагноз лишь у 16–50% пациентов с генетическими заболеваниями [Shashi et al., 2014; Valencia et al., 2015; Meng et al., 2017], это – грандиозный шаг вперед по сравнению с эффективностью традиционных подходов (кариотипирование, секвенирование по Сэнгеру и т.п.). Несомненно, процент успешной диагностики будет расти по мере совершенствования технологии экзомного обогащения, секвенирования и алгоритмов обработки данных. В частности, продемонстрировано, что повышение эффективности ЭС может быть достигнуто за счет улучшения возможностей детекции патогенных вариаций числа копий (CNV) [Pfundt и др., 2017].

Сравнимые цифры в отношении выявления причин болезни даёт использование таргетных мультигенных панелей [Freire et al., 2019; Gorostidi et al., 2016; Sun et al., 2019; Tsaousis et al., 2019; Yu et al., 2016]. Очевидно, что процент эффективности этого подхода тем выше, чем лучше изучена связь генотипа и фенотипа: например, в исследовании [ben Aim et al., 2019] авторам удалось добиться обнаружения причин феохромоцитом и параганглиом в 78% случаев, используя панель, состоящую всего из 17 генов.

В настоящее время широкому использованию методов NGS в лабораторной диагностике препятствует ряд факторов: высокая стоимость реагентов и оборудования, сложность и длительность биоинформатической обработки данных, а также необходимость подтверждения обнаруженных мутаций другими методами.

Нельзя не упомянуть и этические проблемы, связанные с применением технологий NGS. Дело в том, что помимо выявления непосредственно интересующего нас генетического дефекта, секвенирование экзона или генома может, в качестве случайных находок, обнаружить и другие мутации, имеющие медицинское значение. Возникает вопрос, нужно ли доводить эту информацию до сведения пациента и его родственников, и если да, то в какой форме. Специалистами Американского колледжа медицинских генетиков (ACMG) разработан список из 59 генов, о выявлении мутаций в которых рекомендуется обязательно сообщить пациентам, поскольку в таких случаях ранняя, досимптоматическая диагностика принесет пользу [Kalia и др., 2017]. Однако на сегодняшний день единая точка зрения на эту тему пока не выработана.

Таким образом, выявление редких болезней является сложнейшей диагностической процедурой. В государствах Европы и Северной Америки соответствующие мероприятия осуществляются в специализированных учреждениях, причём зачастую соответствующие диагностические центры обслуживают несколько стран. Работа с пациентами, у которых подозревается редкое заболевание, требует исключительно высокой подготовки

медицинского персонала. Врачи, занимающиеся этой проблемой, должны иметь не только общемедицинскую эрудицию, но и владеть основами молекулярной биологии, обладать достаточным знанием английского языка, уметь пользоваться профессиональными интернет-ресурсами, а также обладать навыками взаимодействия со специалистами различного профиля у нас в стране и за рубежом. Организация диагностики и лечения редких заболеваний является трудной и дорогостоящей задачей, требующей значительного внимания со стороны государства.

1.3. Синдром Линча

Общие сведения

Наследственный неполипозный колоректальный рак (Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer, HNPCC), также известный как синдром Линча (СЛ), характеризуется высоким генетически - детерминированным риском злокачественных новообразований. Заболевание относится к наиболее часто встречающимся видам наследственных опухолевых синдромов: не менее 3% всех больных РТК имеют этот диагноз [Barnetson et al., 2006]. Необходимо отметить, что название «наследственный неполипозный колоректальный рак» является не вполне удачным, т.к. помимо поражения толстой и прямой кишки у больных также могут развиваться опухоли целого ряда других органов: матки, реже - яичников, желудка, тонкой кишки, мочеточников и т.д. По всей видимости, термин «неполипозный» используется, в первую очередь для того, чтобы избежать путаницы с другой известной разновидностью наследственного рака толстой кишки – семейным аденоматозным полипозом.

СЛ связан с наследственным дефектом в одном из генов репарации неспаренных оснований ДНК: *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* [Сох и др., 2018]. Кроме того, в редких случаях СЛ связан с делецией 3' – конца гена *EPCAM*,

которая влечет за собой снижение экспрессии *MSH2*, расположенного по соседству [Pathak et al., 2019]. Описан также так называемый эпигенетический СЛ, связанный с наследственной эпигенетической модификацией промотора *MLH1* [Hitchins and Ward, 2009].

Практически все опухоли, относящиеся к спектру СЛ демонстрируют соматический дефицит mismatch – репарации (MMR), что проявляется потерей экспрессии соответствующих белков, а также накоплением изменений длины микросателлитных повторов (высокий уровень микросателлитной нестабильности, MSI-H) [Boland et al., 2018; Vilar and Gruber, 2010]. Последний феномен связан с тем, что области микросателлитных повторов во время репликации ДНК подвержены неправильному совмещению («спариванию») повторяющихся участков, что, при наличии дефекта репарации таких повреждений ведет к уменьшению или увеличению числа повторов. Таким образом, детекция микросателлитной нестабильности (MSI) является «золотым стандартом» селективного скрининга при подозрении на синдром Линча [Boland and Goel, 2010].

В то же время, необходимо отметить, что некоторые спорадические опухоли толстой кишки и эндометрия также демонстрируют феномен MSI, что связывают с соматическим гиперметилированием промотора *MLH1* [Dillon et al., 2017; Pinto et al., 2018]. Для дифференциальной диагностики синдрома Линча и подобных состояний используется тестирование мутаций *BRAF*: соматические мутации в этом гене практически никогда не встречаются при СЛ [Adar et al., 2017]; кроме того, наличие микросателлитной нестабильности в отсутствие наследственного дефекта репарации, как правило, характерно для пациентов старше 70 лет [Varat et al., 2009].

Клинико-морфологические особенности

Как и в случае других наследственных опухолевых синдромов, косвенным признаком, указывающим на конституциональный генетический дефект, является ранний возраст манифестации заболевания. Так, средний возраст на момент выявления колоректального рака у больных с СЛ составляет 44 – 61 год, в сравнении с 69 годами у пациентов со спорадическими опухолями [Cox et al., 2018]. У пациентов с СЛ новообразования толстой кишки возникают наиболее рано (в среднем, в возрасте 43 – 44 лет) при наличии дефекта *MLH1* или *MSH2*; в то время как мутации *MSH6* и *PMS2*, как правило, проявляются более поздно, в возрасте 47 – 66 лет [Choi et al., 2009; Dowty et al., 2013; Hendriks et al., 2004; Senter et al., 2008; Stoffel et al., 2009]. В российском исследовании отмечен более ранний средний возраст развития первой опухоли (39 лет) у обладателей дефектов *MLH1* и *MSH2* [Шельгин и соавт., 2021].

Спектр поражения органов также в немалой степени зависит от того, какие именно гены MMR повреждены. В частности, индивидуумы с мутациями *MLH1* и *MSH2* имеют очень высокий шанс заболеть раком толстой кишки, тогда как для носителей *MSH6* и *PMS2* этот риск – умеренный [Bonadona et al., 2011]. Женщины - носители мутаций *MSH6* обладают наибольшим риском развития рака эндометрия [Baglietto et al., 2010]. Наличие мутации *MSH2* связано с повышенным риском опухолей мочевыделительной системы [Engel et al., 2012].

Показано, что для больных с СЛ характерно очень короткое время опухолевой прогрессии – около 3 лет по сравнению с 10 – 15 годами для большинства других колоректальных опухолей [Edelstein и др., 2011]. Этот факт служит обоснованием для раннего (с 20 – 25 лет) начала эндоскопического скрининга носителей мутаций в генах mismatch – репарации.

В то же время, показатели выживаемости пациентов с СЛ значительно превышают таковые при спорадическом РТК; при СЛ ниже частота как местных, так и отдаленных метастазов [Gryfe et al., 2000; Watanabe et al., 2001].

Опухоли обычно локализуются в проксимальных отделах толстой кишки [Bonadona et al., 2011]; однако, в выборке российских пациентов продемонстрирована высокая частота новообразований прямой кишки [Шельгин и соавт., 2021].

Наличие полипов ЖКТ, как правило, нехарактерно. Опухоли, ассоциированные с СЛ, имеют высокую степень злокачественности (high grade) и муцинозную гистологию. Важной морфологической чертой является наличие многочисленных опухоль - инфильтрирующих лимфоцитов и Крону-подобной лимфоцитарной инфильтрации [Jenkins et al., 2007].

Особенности лечения

Многочисленные исследования, посвященные предиктивному значению феномена микросателлитной нестабильности (MSI-H) у больных с СЛ, дают неоднозначные результаты [Pino and Chung, 2011]. С уверенностью можно утверждать, что пациентам с дефицитом MMR противопоказаны химиотерапевтические схемы на основе 5-фторурацила [Ribic et al., 2003; Sargent et al., 2010]; по – прежнему недостаёт данных относительно эффективности иринотекана [Fallik et al, 2003; Saltz et al., 2007; Morelli et al., 2021].

Опухоли, ассоциированные с СЛ характеризуются высокой мутационной нагрузкой и, следовательно, хорошо отвечают на лечение ингибиторами контрольных точек иммунитета – пембролизумабом и ниволумабом [Le et al., 2017; Overman et al., 2017]. Ингибиторы PD-1 блокируют взаимодействие между белком PD-1 (Programmed cell death protein 1), экспрессируемым на поверхности Т- и В – лимфоцитов, и лигандом PD – L1, позволяющим опухолевым клеткам распознаваться в качестве нечужеродных для организма. Количество опухоль - инфильтрирующих лимфоцитов, по – видимому,

отражает высокую иммуногенность опухолей при СЛ и является маркером прогноза [Kong et al., 2019].

В отличие от больных со спорадическим РТК пациентам с СЛ рекомендована тотальная колэктомия с илеоректальным анастомозом ввиду высокого риска образования новых колоректальных неоплазм [Giardiello et al., 2014]. В то же время проведение такой операции в для профилактики развития опухолей у здоровых носителей мутаций в генах MMR нецелесообразно, поскольку плановое колоноскопическое обследование обладает достаточной эффективностью [Stoffel et al., 2015].

Существуют свидетельства, что долговременный прием аспирина (в течение двух и более лет) приводит к значительному снижению риска развития РТК и других опухолей у пациентов с СЛ; однако, следует заметить, что исследователи пока не пришли к окончательным выводам по поводу оптимальных доз и длительности приема препарата [Burn et al., 2011].

Генетическая диагностика

ДНК-диагностика СЛ достаточно трудоемка. Существуют устоявшиеся клинические критерии отбора пациентов для ДНК - анализа, учитывающие данные семейного анамнеза и возраст появления новообразований.

Обязательной процедурой обычно является тестирование опухолевой ткани на наличие микросателлитной нестабильности (MSI-H).

Иммуногистохимический анализ белков MLH1, MSH2, MSH6 и PMS2 может помочь уточнить, какой из соответствующих генов наиболее вероятно содержит мутацию. До недавнего времени гены СЛ исследовали посредством секвенирования по Сэнгеру, обычно в сочетании с предварительным скринингом на возможное наличие изменений нуклеотидной последовательности [Vilar and Gruber, 2010]. Эта процедура постепенно заменяется секвенированием следующего поколения (NGS), которое

позволяет проводить одномоментный анализ всех диагностически значимых генов. Однако, несмотря на все технологические достижения, с точки зрения финансовых и трудовых затрат оправданным представляется создание максимально доступного алгоритма генетической диагностики СЛ, учитывающего особенности генетического груза российской популяции.

Некоторые этнические группы характеризуются выраженным эффектом основателя, который позволяет проводить эффективный скрининг наследственных заболеваний с помощью нескольких недорогих ПЦР-тестов. Например, два повторяющихся варианта *MLH1* ответственны за более чем половину случаев СЛ в Финляндии [Holmberg et al., 1998; Nyström-Lahti et al., 1995; Salovaara et al., 2000].

В настоящее время опубликовано несколько работ, посвященных анализу генов репарации неспаренных оснований у российских пациентов с СЛ. Результаты двух небольших исследований представлены в международных журналах [Maliaka et al., 1996; Moliaka et al., 1997], в то время как более подробные сведения имеются в отечественной медицинской литературе [Цуканов и соавт., 2015; 2017; Шельгин и соавт., 2021].

В славянских популяциях продемонстрирован ряд founder – вариантов, ассоциированных с моногенными заболеваниями [Eisensmith et al., 1995; Ivanova-Smolenskaya et al., 1999; Saucedo et al., 1995; Sokolenko et al., 2007; Yanus et al., 2019]; данные работ, посвященных синдрому Линча также свидетельствуют о существовании подобных мутаций [Цуканов и соавт., 2017; Шельгин и соавт., 2021].

1.4. Синдром Пейтца-Егерса

Синдром Пейтца – Егерса (СПЕ) представляет собой достаточно редкую разновидность наследственного полипоза ЖКТ. Считается, что данное заболевание встречается с частотой около 1:50000 – 1:200000 [Giardiello and

Trimpath, 2006]. Причиной заболевания является мутация в гене-супрессоре опухолевого роста, *STK11*, локализованного в регионе 19p13.3. Супрессорное действие гена связано преимущественно с подавлением mTOR-ассоциированного сигнального пути. Продукт этого гена (серин-треониновая киназа) наиболее активно экспрессируется в криптах кишечника; существует гипотеза, что данная молекула дает возможность клеткам эпителия тонкого кишечника очень часто делиться, не подвергаясь при этом злокачественной трансформации [Hezel and Bardeesy, 2008]. Клинический диагноз может быть установлен при наличии одного из следующих признаков: два или более гистологически подтвержденных гамартомных полипа (полипы Пейтца-Егерса); любое число полипов Пейтца-Егерса у пробанда при условии наличия установленного диагноза СПЕ по меньшей мере у одного из близких родственников; характерная кожно-слизистая пигментация при условии наличия установленного диагноза СПЕ по меньшей мере у одного из близких родственников; любое число полипов Пейтца-Егерса у пациента с кожно-слизистой пигментацией [Beggs et al., 2010]. В молодом возрасте существует высокий риск инвагинации кишки, составляющий до 50% к возрасту 20 лет [van Lier et al., 2011]; у детей и подростков кишечная непроходимость нередко является первым проявлением заболевания. Наблюдаемый у 95% больных периоральный лентигоноз (меланоцитарная пигментация), будучи достаточно характерным проявлением, обращает на себя внимание родственников и врачей, что способствует установлению правильного диагноза [Савельева и соавт., 2021].

Для пациентов характерен высокий риск развития злокачественных новообразований (толстой кишки, поджелудочной железы, желудка, молочной железы и других органов) в течение жизни [Bennett et al., 2021]. В связи с этим, носители мутаций нуждаются в профилактическом скрининге [Syngal et al., 2015]. Современные исследования свидетельствуют, что не существует связи между типом мутации и характеристиками заболевания

(риском рака, инвагинации кишки, тяжестью заболевания и т.д.) [Daniell et al., 2018].

Количество систематических работ, посвященных молекулярно-генетическим особенностям российских больных, невелико [Шельгин и соавт., 2016; Цуканов и соавт., 2017; Янова и соавт., 2022], что неудивительно, учитывая редкость заболевания.

1.5. Генетические детерминанты наследственного рака молочной железы (РМЖ)

Изучению наследственных форм РМЖ посвящено множество научных работ. Считается, что семейная предрасположенность к этому виду рака может быть результатом присутствия высокопенетрантных редких патогенных мутаций или же возникать в результате комбинации аллелей с низкой и средней пенетрантностью [Foulkes, 2008]. При этом классические гены риска РМЖ – BRCA1 и BRCA2 – обнаруживаются лишь в 20-30% раковых семей [Fackenthal and Olopade, 2007]. Определенная доля случаев данного заболевания объясняется мутациями в других известных генах: *CHEK2*, *NBS1* (*NBN*), *BARD1*, *PALB2*, *BRIP1*, *RAD50*, *RAD51C*, *TP53*, *MRE11*, и т.д. [Vahteristo et al., 2002; Gorski et al., 2003; Rahman et al., 2007; Bartkova et al., 2008; Bogdanova et al., 2009; Fostira et al., 2020]. Однако даже в совокупности все известные на сегодня генетические детерминанты не могут объяснить и половины случаев РМЖ, имеющих признаки менделевского наследования [Olopade et al., 2008].

Появление современных методов высокопроизводительного секвенирования открыло колоссальные возможности для различных медико-генетических исследований, в том числе, в области онкологии. С помощью этого подхода успешно идентифицирован ряд локусов генома, ассоциированных с наследственными раковыми синдромами [Lapunzina et al.,

2014]. В то же время, в области изучения наследственного РМЖ результаты использования полноэкзомного секвенирования оказались не очень впечатляющими [Noh et al., 2015; Sun et al., 2015; Chandler et al., 2016].

В частности, авторы одной из работ [Snape et al., 2012] проанализировали 50 пациенток с семейным РМЖ и опубликовали список кандидатных генов, однако не представили никаких фактических доказательств патогенности обнаруженных мутаций. Thompson et al., 2012 подвергли полноэкзомному секвенированию 33 больных из 15 семей, однако выявленные ими гены были уже открыты ранее, с помощью «кандидатного» подхода [Berwick et al., 2007; Sokolenko et al., 2012]. Также в качестве причины ряда семейных случаев РМЖ были предложены редкие мутации, затрагивающие ген репарации *XRCC1* [Park et al., 2012], однако этот факт не нашел подтверждения в последующих исследованиях [Hilbers et al., 2012; Peltari et al., 2015]. Два исследовательских коллектива независимо друг от друга с помощью экзомного секвенирования выявили редкие мутации в гене *FANCM*, которые встречались несколько чаще в группе пациенток с РМЖ по сравнению со здоровыми женщинами [Gracia-Aznarez et al., 2013; Kiiski et al., 2014]; однако, мутации в *FANCM* могут объяснить лишь очень небольшую часть случаев наследования предрасположенности к РМЖ, и вряд ли имеют большое клиническое значение [Schubert et al., 2019].

Наибольших успехов на сегодняшний день добились польские исследователи [Cybulski et al., 2015], которые в двух независимых популяциях выявили повторяющиеся мутации в гене *RECQL*. Наследственные дефекты *RECQL* в пять раз чаще встречаются у пациенток по сравнению со здоровым контролем; тем не менее, эти наблюдения также не могут претендовать на высокую клиническую значимость, в связи с крайне редкой встречаемостью соответствующих мутаций.

Поиск с помощью экзомного секвенирования позволил выявить еще ряд кандидатов на роль генов предрасположенности к РМЖ: *FAN1* [Felicio et al., 2021], *SERPINA3* [Koivuluoma et al., 2021], *MAST1*, *POLH*, *RTEL1*, *FANCI*

[Girard et al., 2019], однако каждый из этих генов в отдельности ответственен за очень малое число случаев заболевания.

Таким образом, следует признать, что многочисленные попытки использовать экзомное секвенирование для открытия новых клинически значимых генов наследственного РМЖ до сих пор не увенчались значительными успехами. Становится очевидным, что РМЖ обладает высокой генетической гетерогенностью. С другой стороны, патогенные варианты могут быть «упущены» из-за неоптимального алгоритма отбора кандидатных вариантов, а также существования крупных геномных перестроек, которые недостаточно надежно детектируются методами NGS [Parenti et al., 2021; Preobrazhenskaya et al., 2019].

Большим потенциалом в качестве объекта для таких исследований обладают генетически однородные популяции с выраженным эффектом основателя («founder»- эффектом) [Chandler et al., 2016]. К такой группе, в частности, относится славянское население России. В подобных гомогенных популяциях, если какой-либо ген имеет причастность к генетическому заболеванию, спектр его дефектов ограничивается всего одним или несколькими вариантами, при этом мутантные аллели характеризуются достаточно высокой популяционной частотой [Iyevleva et al., 2010; Sokolenko et al., 2015]; результаты исследований таких когорт, как правило, хорошо воспроизводятся [Chandler et al., 2016]. В связи с этим, оправдана надежда на то, что анализ результатов полноэкзомного секвенирования относительно небольшой, генетически гомогенной группы пациенток с выраженными признаками наследственного РМЖ (семейные случаи, молодые больные, пациентки с билатеральным поражением молочных желез), позволит обнаружить новые повторяющиеся патогенные аллели.

1.6. Туберозный склероз (ТС)

Диагностические критерии

Туберозный склероз (ТС) – наследственное заболевание, для которого характерно возникновение доброкачественных опухолей (гамартом) различных органов (головного мозга, почек, кожи, сетчатки глаза, печени и т.д.).

Ранее считалось, что туберозный склероз встречается очень редко, однако на протяжении последних десятилетий можно отметить тенденцию к постепенному увеличению частоты его выявления. Это связано с улучшением диагностических возможностей (доступность лучевых методов, появление ДНК-диагностики), уточнением диагностических критериев, а также возросшей осведомленностью врачей о данной патологии. В настоящее время считается, что туберозный склероз возникает у 1 из 6000 новорожденных; частота в популяции составляет приблизительно 1:10000 [Józwiak et al., 2000].

Клиническая картина туберозного склероза была описана еще в конце XIX века французским неврологом Бурневиллем и английским дерматологом Принглом. В течение длительного времени к минимальным диагностическим признакам заболевания относили судороги, умственную отсталость и ангиофибромы лица («триада Фогта»).

Развёрнутая клиника туберозного склероза не вызывает значительных диагностических трудностей. В то же время достаточно распространены стертые формы, распознаваемые далеко не всегда. Так, в одном из исследований у 6% больных туберозным склерозом не было обнаружено ни одного признака из «триады Фогта» [Schwartz et al., 2007]. Согласно другому сообщению, в 12% случаев диагноз удастся поставить лишь во взрослом возрасте, например, после рождения больных детей. При этом ретроспективное исследование показало, что у ряда пациентов

присутствовали (и были пропущены) признаки, указывавшие на возможный диагноз туберозного склероза [Staley et al., 2011].

Клинический опыт диагностики туберозного склероза постоянно накапливается и осмысливается, что отражается в создании и регулярном пересмотре диагностических критериев; последний консенсус относительно признаков ТС достигнут международными экспертами в 2021 году (Табл. 1). Диагноз считается несомненным в случае обнаружения двух больших критериев или сочетания одного большого и двух малых. При наличии одного большого и одного малого признака диагноз расценивается как возможный [Northrup et al., 2021].

К объективным трудностям при постановке диагноза следует отнести динамику развертывания клинической картины. Так, рабдомиомы сердца у таких больных чаще всего врожденные и спонтанно регрессируют с возрастом, тогда как ангиофибромы лица обычно начинают появляться лишь в 1-4 года [Staley et al., 2011]. При подозрении на наличие туберозного склероза важно тщательно зафиксировать симптомы и провести необходимые диагностические исследования (МРТ головного мозга, УЗИ почек и т.д.).

Табл.1. Критерии диагностики tuberозного склероза [Northrup et al., 2021]

<i>А. Генетические критерии</i> Выявления патогенной мутации <i>TSC1</i> или <i>TSC2</i> достаточно для установления несомненного диагноза
<i>Б. Клинические критерии</i>
<i>Большие критерии</i>
Гипопигментные пятна (три и более)
Ангиофибромы (три и более) или фиброзные бляшки на лбу
Ногтевые фибромы (две и более)
Пятна «шагренево́й кожи» или множественная коллагенома
Множественные гамартомы сетчатки
Множественные кортикальные туберы и /или радиальные миграционные тракты
Субэпендимальные узлы (два и более)
Субэпендимальная гигантоклеточная астроцитома
Рабдомиома сердца
Лимфангиолейомиоматоз (ЛАМ)*
Ангиолипомы почек (две и более)*
<i>Малые критерии</i>
Гипопигментные пятна на коже типа «конфетти»
Дефекты зубной эмали (три и более)
Фибромы полости рта (две и более)
Депигментированные пятна сетчатки
Множественные кисты почек
Непочечная гамартома
Склеротические поражения костей

*сочетания этих двух больших критериев без других признаков ТС недостаточно для установления окончательного диагноза.

Генетика ТС

Развитие туберозного склероза связывают с гетерозиготными мутациями в гене *TSC1* (OMIM*605284) или *TSC2* (OMIM*191092). Ген *TSC2* был открыт в 1993 году; он имеет 41 экзон, образует РНК-транскрипт размером 5.5 кб и расположен в локусе 16p13.3. Ген *TSC1*, как ни странно, клонирован позже – в 1997 году; он локализуется в регионе 9q34 и включает 23 экзона, 21 из которых является кодирующим; размер РНК-транскрипта составляет 8.6 кб.

Ген *TSC1* кодирует белок гамартин размером 1164 аминокислот (130 кДа), который в комплексе с туберином регулирует mTOR-S6K - опосредованный путь сигнальной трансдукции и клеточную адгезию через взаимодействие с белками Ezrin и Rho. *TSC2* кодирует белок туберин, состоящий из 1807 аминокислот (180 кДа). Комплекс гамартин-туберин воздействует на сигнальную трансдукцию mTOR-S6K, а также играет роль в клеточном цикле (предположительно, влияет на формирование актинового цитоскелета).

С точки зрения молекулярной генетики гены *TSC1* и *TSC2* являются достаточно протяжёнными. Ген *TSC1* состоит из 23 экзонов; при этом экзон 2 подвержен альтернативному сплайсингу. *TSC2* же включает 41 экзон, причём экзоны 25, 26 и 31 также подвержены альтернативному сплайсингу. Продукты обоих генов, гамартин и туберин, формируют гетеродимерный комплекс с белком TBC1D7, который, через малую ГТФазу Rheb регулирует активность комплекса mTORC1 (mammalian Target Of Rapamycin Complex 1).

Считается, что практически все мутации *TSC1* и *TSC2* вызывают утрату функции соответствующих белков, что приводит к повышению активности mTORC1. В свою очередь, последнее ведет к повышению трансляции белка, ускорению роста клеток, усилению синтеза нуклеотидов и снижению аутофагии [Henske et al., 1997]. Исходя из этого, гены туберозного склероза можно отнести к классическим супрессорам опухолевого роста. Кроме того, сигнальный каскад mTOR играет важную роль в обеспечении возбудимости нейронов и процессах синаптогенеза, поэтому его избыточная активация

повышает риск эпилепсии, умственной отсталости и симптомов аутистического спектра [Napolioni et al., 2009].

Около 70% случаев туберозного склероза связаны с мутациями *TSC2*, а около 30% - *TSC1* [Jones et al., 1999; Dabora et al., 2002]. Однако следует подчеркнуть, что такое соотношение характерно для стран Европы и США, тогда как, например, в Японии процент мутаций *TSC1* значительно выше [Niida et al., 2013]. Причины подобных географических различий остаются не очень понятными, т.к. значительная доля случаев ТС приходится на мутации, возникшие *de novo*. У некоторых пациентов мутации встречаются в форме мозаицизма, т.е., генетическое повреждение содержится только в определенной, нередко очень небольшой, фракции клеток организма [Verhoef et al., 2002; Kozlowski et al., 2007; Nellist et al., 2015].

Около трети случаев ТС можно отнести к семейным, а две трети – к спорадическим, причем считается, что в семейных формах повышен процент повреждений *TSC1* [Jones AC et al., 1999; Niida et al., 1999, Van Slegtenhorst et al., 1999; Jansen et al., 2008]. Примерно у 10% пациентов с признаками ТС идентифицировать мутации в генах *TSC1* или *TSC2* не удается [Lam et al., 2017]. Долгое время считалось, что подобные случаи связаны с существованием другого, еще не открытого гена (*TSC3*). Однако, секвенирование нового поколения (NGS) позволило детектировать мозаичные и интронные мутации в известных генах ТС, которые ранее не выявлялись по техническим причинам [Nellist et al., 2015], [Tyburczy et al., 2014]. Таким образом, при использовании высокочувствительных методов ДНК-анализа дефекты *TSC1/TSC2* могут быть обнаружены почти у всех пациентов, что делает существование дополнительных локусов, связанных с развитием ТС, маловероятным.

В настоящее время, в базе данных LOVD, содержатся сведения о примерно 700 уникальных повреждениях в гене *TSC1* и 1900 – в *TSC2*; при этом «горячие точки» мутагенеза практически отсутствуют. Все известные мутации *TSC1* приводят к преждевременной терминации синтеза гамартина;

повреждения, ведущие к аминокислотным заменам (миссенс-мутации) не описаны, а крупные перестройки (делеции отдельных экзонов или всего гена) очень редки. Напротив, в *TSC2* обнаружены все типы генетических повреждений, включая миссенс-мутации, а также масштабные делеции/дупликации [Kozłowski et al., 2007].

Клинические признаки ТС у носителей мутаций *TSC1* и *TSC2* в значительной мере перекрываются [Jansen et al., 2008]. Считается, что для пациентов с повреждениями *TSC2* более характерно тяжелое течение заболевания: развитие большего числа опухолей, ранний дебют эпилепсии, наличие умственной отсталости [Curatolo et al., 2015]. Есть сведения о том, что больные с мутациями *TSC2* имеют более высокий риск развития ангиомиолипом почек [Kwiatkowski et al., 2015]. Вместе с тем, ввиду вариабельной экспрессивности мутаций, предсказать характер течения заболевания в каждом конкретном случае практически невозможно. Члены одной семьи, и даже монозиготные близнецы, несущие одну и ту же мутацию, демонстрируют разнообразие клинических проявлений [Humphrey et al., 2004; Lyczkowski et al., 2007]. Для группы больных с мозаичными мутациями в целом характерно более мягкое течение заболевания [Verhoef et al., 2002].

Клинические исследования, посвящённые лекарственному лечению ТС (EXIST-1 и EXIST-2), не выявили связи между типом выявленных мутаций и эффективностью терапии ингибитором mTOR эверолимусом по отношению к ассоциированным с ТС субэпендимальным гигантоклеточным астроцитомам и ангиомиолипомам [Kwiatkowski et al., 2015]. Вероятно, это связано с тем, что все генетические повреждения *TSC1* и *TSC2* приводят к приблизительно одинаковым последствиям – усилению активности mTOR.

Генетические повреждения в опухолях, ассоциированных с ТС

В-целом, механизм развития доброкачественных опухолей (гамартом) при ТС может быть описан в рамках так называемой «двухударной» (two-hit) теории канцерогенеза, предложенной американским педиатром Альфредом Кнудсоном [Knudson, 1971]. В современной трактовке эта теория подразумевает, что для образования опухоли требуется повреждение обоих аллелей гена - опухолевого супрессора, причем в случае наследственных раков один из аллелей уже инактивирован за счет мутации, полученной от родителей. Сходным образом, при туберозном склерозе все клетки организма изначально содержат наследственную мутацию *TSC1* или *TSC2*, а в некоторых соматических клетках может произойти инактивация второго, неповреждённого аллеля, что приводит к образованию гамартмы соответствующего органа [Henske et al., 1997].

За последние годы накопились экспериментальные свидетельства того, что эта модель правдоподобно объясняет происхождение ангиофибром, ангиомиолипом, почечноклеточных карцином и лимфангиолейомиоматоза у пациентов с ТС [Lam et al., 2017; Аношкин и соавт., 2018].

Ангиофибромы лица относятся к важным диагностическим признакам ТС. В опухолевой ткани наблюдается функциональная инактивация одного из аллелей *TSC1/2* за счет микромутаций (точковые мутации, небольшие инсерции/делеции). Примечательно, что это происходит в фибробластах, а не в других клетках, входящих в состав ангиофибром. По-видимому, эти фибробласты являются производными клеток нервного гребня [Sarnat and Flores-Sarnat, 2005]. Половина обнаруженных соматических мутаций представлены заменами СС>ТТ - это косвенно свидетельствует о том, что необходимым условием для развития ангиофибром является внешний фактор, а именно солнечное (ультрафиолетовое) излучение [Tuburczy et al., 2014].

Ангиомиолипомы относятся к наиболее частым проявлениям патологии почек у больных ТС. По-видимому, эти опухоли происходят из лимфатических эндотелиальных клеток, которые подверглись гиперактивации mTORC1 [Yue et al., 2016]. Повреждение нормальной копии гена происходит

за счет потери гетерозиготности по локусу *TSC1* или *TSC2* [Henske et al., 1997; Giannikou et al., 2016].

Почечноклеточные карциномы – относительно нечастая находка у пациентов с ТС, однако в некоторых случаях такие опухоли бывают множественными, причем поражение почек носит двухсторонний характер. Установлено, что множественные новообразования, развивающиеся у одного и того же индивидуума, имеют независимое клональное происхождение [Tyburczy et al., 2014].

Легочным проявлением ТС является лимфангиолейомиоматоз (ЛАМ), для которого характерно формирование кист, развитие пневмоторакса и хилезного плеврального выпота. В подавляющем большинстве случаев страдают женщины. Как ТС-ассоциированные, так и спорадические случаи ЛАМ связаны с биаллельной инактивацией *TSC1* или *TSC2*, только при спорадической форме ЛАМ функция обеих аллелей нарушена за счет соматических мутаций [Carsillo et al., 2002].

Подходы к ДНК-диагностике

Несмотря на достаточную надежность клинических критериев tuberозного склероза, в некоторых случаях постановка диагноза вызывает затруднения. В частности, у маленьких детей зачастую отсутствуют некоторые типичные проявления ТС, однако эти симптомы могут развиваться в более позднем возрасте. В таких случаях вопрос о дифференциальной диагностике ТС с другими заболеваниями может быть разрешён посредством молекулярно-генетического исследования. В 2012 году международная группа специалистов в области диагностики и лечения ТС постановила, что выявление патогенной мутации *TSC1* или *TSC2* является достаточным основанием для установления диагноза tuberозного склероза даже в отсутствие его клинических проявлений [Northrup et al., 2013].

Стандартом ДНК-диагностики туберозного склероза является секвенирование кодирующей последовательности *TSC1* (23 экзона) и *TSC2* (42 экзона). Как правило, ему предшествует этап предварительного скрининга мутаций; для этого используют такие методики как анализ полиморфизма конформации одонитевых фрагментов (SSCP), денатурирующий гель-электрофорез (DGGE), высокоразрешающий анализ кинетики плавления фрагментов ПЦР (HRMA) и т.д.

Существование крупных делеций/дупликаций отдельных экзонов или всей последовательности гена диктует необходимость применения дополнительного метода – мультиплексной лигазной пробозависимой амплификации (Multiple Ligation Probe Amplification, MLPA) в случае, если микромутации не были выявлены. В среднем, комбинация этих методов позволяет добиться успеха, т.е., обнаружить патогенную мутацию, примерно в 75-85% случаев ТС [Jones AC et al., 1999; Dabora et al., 2002; Sancak et al., 2005; Jozwiak et al., 2006; Au et al., 2007]. Отсутствие «горячих точек», т.е. аккумуляции мутаций в определенных участках, требует полного анализа кодирующих последовательностей обоих генов, за возможным исключением экзонов 25, 31 и 34 *TSC2* [Ekong и др., 2016; Аношкин и др., 2020].

Применение методов секвенирования нового поколения (NGS) позволяет повысить эффективность выявления мутаций. В первую очередь это относится к группе пациентов, у которых мутации не были обнаружены традиционными методами (секвенирование по Сэнгеру, MLPA). Оказалось, что в 18 – 42% случаев случаев таргетное NGS-секвенирование позволяет выявить ранее пропущенные мутации и мозаичные варианты [Qin et al., 2010; Nellist et al., 2015].

Углубленные методы молекулярно-генетического анализа позволяют добиться выявления генетически причин заболевания у 85% пациентов, у которых мутации не обнаруживались стандартными методами [Tuburczy et al., 2014]. Такие успехи достигнуты за счет высокой глубины прочтения (>500X) при выполнении NGS – это сделало возможным выявление мутаций,

представленных в тканях организма с очень низкой частотой (менее 5%). Кроме того, оказалось, что в некоторых случаях мозаичные мутации не обнаруживаются в крови и слюне, но могут быть найдены при исследовании биопсии кожных очагов заболевания. В этой же группе пациентов высока частота интронных мутаций, которые влияют на процесс сплайсинга. Некоторые из этих повреждений локализованы глубоко в интронах, что говорит о необходимости более тщательного исследования некодирующих последовательностей генома.

Несмотря на растущее внимание к проблеме ТС, число работ, содержащих систематические сведения о молекулярно-генетических характеристиках российских пациентов, невелико [Аношкин и др., 2018; Аношкин и др., 2020; Дорофеева и др., 2015].

1.7. Первичные иммунодефициты и онкологические заболевания: точки соприкосновения

Инфекционные заболевания долгое время считались примером патологии, в развитии которой генетические особенности организма играют незначительную роль по сравнению с влиянием внешней среды; ключевое значение придавалось патогенности и вирулентности микроорганизмов. С другой стороны, давно замечено существование индивидуальных различий в отношении восприимчивости и резистентности к инфекциям, а также особенностей клинической картины заболевания [Abel et al., 2014; Casadevall and Pirofski, 2018].

В течение многих столетий инфекции являлись главной причиной смерти людей. Фактически, особенно начиная с эпохи массового перехода к сельскому хозяйству, происходила селекция генных вариантов, дающих их обладателям преимущества в выживании при воздействии опасных бактерий и вирусов. Недавние молекулярно-генетические исследования приводят

доказательства обогащения генома современного человека в отношении таких протективных аллелей [Casanova et al., 2013; Quach et al., 2016].

Клинические описания некоторых наследственных дефектов иммунитета опубликованы еще в 1950-е годы. Однако, открытие генов, ответственных за развитие этой группы заболеваний, стало возможным лишь в конце XX века, с появлением технических возможностей надежного выявления мутаций. Второе десятилетие XXI века, благодаря внедрению секвенирования нового поколения, ознаменовалось многократным увеличением объема знаний в области генетики восприимчивости к инфекциям.

Следует заметить, что в течение долгого времени акцент генетических исследований делался на поиск аллелей предрасположенности, встречающихся в популяции с высокой частотой (полногеномный поиск ассоциаций, GWAS). Такой подход дал определенные результаты: в частности, удалось выявить генетические факторы, влияющие на клиническое течение гепатита С [Ge et al., 2009], локусы предрасположенности к лепре [Zhang et al., 2011], воспалительным заболеваниям кишечника [Jostins et al., 2012], туберкулезу [Thye et al., 2012] и другим инфекционным болезням [Abel et al., 2014].

Постепенно интерес исследователей смещается от изучения слабых, но широко распространенных факторов предрасположенности (концепция «частые болезни – частые варианты»), к поиску редких мутаций, вызывающих серьезные дефекты иммунитета. Это отражает изменение в понимании механизмов развития инфекционных заболеваний: фактически, основной причиной многих инфекций признаются моногенные дефекты, наследуемые в согласии с законами Менделя [Casanova, 2015].

Заболевания, связанные с повреждением генов, кодирующих те или иные компоненты иммунной системы, называют первичными иммунодефицитами; в западной литературе последнее время преобладает термин “inborn errors of immunity” (врожденные ошибки иммунитета).

Существуют косвенные признаки, позволяющие заподозрить у ребенка первичный дефект иммунитета и стимулирующие к проведению тщательного иммунологического и генетического исследований: в частности, наиболее известны критерии, предложенные международной благотворительной организацией Jeffrey Modell Foundation (Табл.2).

Табл. 2. Критерии подозрения на наличие ПИД у детей (10 Warning Signs, Jeffrey Modell Foundation; www.info4pi.org/library/educational-materials/10-warning-signs)

1	Четыре и более случая отитов в течение года
2	Два и более серьезных синусита в течение года
3	Два и более месяца лечения антибиотиками без значительного эффекта
4	Две и более пневмонии в год
5	Задержка прибавки массы и/или роста
6	Рецидивирующие глубокие абсцессы кожи и/или внутренних органов
7	Кандидоз ротовой полости или грибковые поражения кожи
8	Необходимость внутривенного введения антибиотиков для лечения инфекций
9	Два и более эпизода генерализованных инфекций, в т.ч. сепсиса
10	Семейный анамнез, отягощенный в отношении ПИД

В первую очередь, обращают на себя внимание повышенная частота эпизодов инфекционных заболеваний, необычная тяжесть протекания инфекции и ситуации, когда болезнь вызвана обычно непатогенными микроорганизмами.

С проявлениями первичных иммунодефицитов могут сталкиваться врачи различных специальностей (пульмонологи, отоларингологи, гастроэнтерологи, дерматологи, онкологи и т.д.), поэтому предложены алгоритмы обследования больных, ориентированные на не иммунологов [Costa-Carvalho et al., 2014; de Vries et al., 2012].

Несмотря на то, что к главным клиническим проявлениям ПИД принято относить уязвимость к инфекциям, у людей с наследственными дефектами иммунитета могут также наблюдаться аллергические, аутоиммунные и аутовоспалительные проявления, а также высокий риск развития новообразований. В некоторых случаях онкологическое заболевание может быть одним из первых проявлений иммунодефицита.

Своевременная диагностика ПИД очень важна, так как адекватное и вовремя начатое лечение может существенно улучшить состояние пациентов [Латышева, 2013; Walkovich and Connelly, 2016]. Кроме того, именно с лечением некоторых разновидностей ПИД (дефицит аденозиндезаминазы, тяжелая комбинированная иммунная недостаточность, синдром Вискотта-Олдрича) связаны немногочисленные примеры реальных успехов генотерапии [Kuo and Kohn, 2016].

Оценка числа пациентов, страдающих ПИД, достаточно проблематична, поскольку статистика ведется не во всех странах. Частота очень сильно варьирует в зависимости от нозологии: от 1:600 при селективном дефиците IgA до 1:250000 при хронической грануломатозной болезни [Fang et al., 2016]. Не вызывает сомнений тот факт, что встречаемость ПИД повсеместно существенно занижена [Bousfiha et al., 2013]: по-видимому, несколько миллионов человек в мире страдает разными формами этой патологии [Modell et al., 2009]. Главной причиной такой недооценки является недостаточная настороженность врачей и общества в отношении симптомов первичного иммунодефицита [Al-Hammadi et al., 2012; Modell et al., 2009]. Следует подчеркнуть, что существует значительное число форм ПИД, которые протекают сравнительно неагрессивно, приводя не столько к уменьшению

продолжительности жизни, сколько к снижению её качества. Таким образом, данная проблема касается не только детей, но и взрослых [Arslan et al., 2016]. При некоторых разновидностях ПИД описано возрастное ослабление симптоматики. В частности, у обладателей гомозиготных мутаций *IRAK-4* и *MyD88* в раннем детстве возникают эпизоды тяжелых, жизнеугрожающих инфекций, но по мере взросления состояние здоровья существенно улучшается [von Bernuth et al., 2012].

На данный момент к ПИД относят более 400 разнообразных нозологий, связанных с поражением тех или иных звеньев иммунной защиты. Согласно актуальной классификации IUIS, они подразделяются на 10 больших групп: комбинированные иммунодефициты, комбинированные иммунодефициты с синдромальными чертами, дефекты антител, болезни иммунной дисрегуляции, дефекты фагоцитоза, нарушения врожденного иммунитета, аутовоспалительные заболевания, нарушения комплемента, синдромы с нарушением функции костного мозга и фенкопии ПИД [Tangye et al., 2022]. Число описанных нозологических форм и соответствующих генов ежегодно увеличивается, что требует регулярного пополнения каталога [Tangye et al., 2021].

В то время как многие мутации повышают уязвимость к широкому спектру инфекций, некоторые обуславливают выраженную восприимчивость к достаточно узкой группе микроорганизмов. Так, существует генетическая предрасположенность к микобактериальным инфекциям, наследование которой подчиняется законам Менделя (Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Disease, MSMD). К настоящему моменту известны 9 генов MSMD [Bustamante et al., 2014]; все они так или иначе вовлечены в обеспечение антибактериальной защиты, опосредованной гамма-интерфероном. Для детей с мутациями характерна восприимчивость к аттенуированной *M.bovis* (компоненту прививки BCG) или условно-патогенным микобактериям.

Дефекты генов-участников цитокинового сигнального каскада (*IL17F*, *IL17RA*, *IL17RC*) приводят преимущественно к развитию изолированного хронического кожно-слизистого кандидоза [Ling et al., 2015; Puel et al., 2011]. Еще один пример специфической инфекционной уязвимости – наследственный дефект рецептора UNC93B1, предрасполагающий к развитию энцефалита, вызванного вирусом простого герпеса (ВПГ). При условии отсутствия контакта с ВПГ носители мутаций могут длительное время или даже всю жизнь оставаться здоровыми [Gennery, 2016].

Наряду с повышенной восприимчивостью к инфекциям, существуют и примеры генетически-обусловленной резистентности. В частности, носители гомозиготных мутаций в гене *CCR5* устойчивы к заражению ВИЧ [Samson et al., 1996], а индивидуумы с аутосомно-рецессивным дефицитом *FUT2* невосприимчивы к гастроэнтеритам, вызываемым норовирусами [Lindesmith et al., 2003].

Произошедшее в XX веке благодаря массовой вакцинации и антибиотикотерапии снижение смертности от инфекционных проявлений привело к тому, что проблема возникновения онкологических заболеваний у больных ПИД стала более актуальной [Rezaei et al., 2011].

В настоящее время онкологические заболевания являются второй по значимости причиной смерти пациентов с первичными иммунодефицитами после инфекций [Mortaz et al., 2016].

По некоторым оценкам до 25% детей с первичными иммунодефицитами страдают злокачественными новообразованиями [Mueller and Pizzo, 1996; Salavoura et al., 2008]. Кроме того, отмечается более ранний возраст манифестации опухолей, развивающихся на фоне ПИД [Jonkman-Berk et al., 2015; Mayor et al., 2018].

Исследования пациентов, входящих в национальные регистры разных стран, свидетельствуют о том, что риск развития опухолей у больных ПИД превышает популяционный. В частности, в работе Австралоазиатского общества клинической иммунологии и аллергологии показано увеличение

избыточного относительного риска в 1.6 раз; риск был значимо повышен для неходжкинских лимфом, лейкозий и рака желудка [Vajdic et al., 2010]. Данные голландского регистра сообщают о 2.3-кратном увеличении риска у пациентов с ПИД [Jonkman-Berk et al., 2015]. Исследование пациентов, включенных в американский регистр USIDNET Registry, продемонстрировало, что добавленный риск составлял 1.34X. Как у мужчин, так и у женщин отмечалось повышение риска развития лимфом (8-10X) и рака кожи (3 – 4X); кроме того, у мужчин было показано 4-х кратное увеличение риска рака щитовидной железы, а у женщин – повышение риска возникновения рака желудка в 3 раза. В то же время встречаемость наиболее частых видов опухолей (легкого, толстой кишки, молочной железы и простаты) не была повышена. Вероятно, это свидетельствует об ограниченной роли иммунной системы в осуществлении защиты от солидных опухолей [Mayor et al., 2018].

К факторам, определяющим риск развития новообразований у больных ПИД, относятся дефекты развития и дифференцировки миелоидных и лимфоидных клеток, нарушение механизмов поддержания хромосомной стабильности и репарации повреждений ДНК, снижение противоопухолевого иммунологического надзора, хроническое воспаление, а также воздействие онкогенных вирусов [Hauck et al., 2018].

Иммунная дисрегуляция, характерная для многих разновидностей ПИД, способствует ускользанию опухолевых антигенов от воздействия иммунной системы. Кроме того, при целом ряде ПИД наблюдаются аномалии внутриклеточных процессов, ответственных за распознавание и устранение повреждений ДНК [Rezaei et al., 2011].

Идеи о роли иммунитета в контроле новообразований высказывались достаточно давно. Теория существования противоопухолевого иммунологического надзора была предложена Бёрнеттом более полувека назад; однако, она нередко вступала в противоречие с фактами [Corthay, 2014]. В частности, наблюдение за пациентами с посттрансплантационной иммуносупрессией свидетельствует, что частота солидных опухолей у них не

повышена, тогда как частота лимфом, то есть, опухолей, связанных преимущественно с действием онкогенных вирусов, возрастает [Vajdic et al., 2010].

Не вызывает сомнений, что неопластические клетки обладают антигенными свойствами, и, следовательно, подвергаются атакам со стороны иммунной системы. Данные высокопроизводительного секвенирования свидетельствуют, что опухоли содержат тысячи мутаций, что теоретически должно приводить к существенной иммуногенности [Garraway and Lander, 2013]. Однако, с позиций сегодняшнего дня очевидно, что взаимоотношения иммунной системы и неоплазмы носят комплексный характер: иммунитет может как препятствовать, так и способствовать прогрессии новообразования, а также модифицировать его антигенный состав [Mittal et al., 2014].

Способность подавлять локальный иммунный ответ является одной из принципиальных характеристик опухолей [Hanahan and Weinberg, 2011]. Существует целый ряд ухищрений, к которым прибегают трансформированные клетки, чтобы избежать гибели. К ним относятся: снижение иммуногенности, усиление выживаемости, и создание иммуносупрессивной среды. Эти цели достигаются за счет подавления экспрессии антигенов и молекул главного комплекса гистосовместимости I класса, секреции антиапоптотических молекул, иммуносупрессивных цитокинов, факторов, снижающих хемотаксис лимфоцитов и усиливающих дифференцировку супрессорных регуляторных Т-клеток [Garg and Agostinis, 2017].

В XXI веке открытие иммуносупрессорных молекул опухоли, таких как CTLA4, PD1, PD-L1 [Schreiber et al., 2011] привело к возрождению интереса к иммунотерапии рака: подавление их ингибирующих влияний с помощью антител (блокада «контрольных точек», *checkpoint inhibitor therapy*) реактивирует эффекторные Т-лимфоциты. Если ранее к иммуногенным опухолям фактически относили только меланому [Jacobs et al., 2012], впоследствии выяснилось, что сфера применения этого подхода может быть

значительно расширена: антагонисты CTLA-4 (ипилимумаб), PD-1 (ниволюмаб и пембролизумаб), PD-L1 (атезолизумаб) продемонстрировали возможности иммунотерапии в лечении целого ряда опухолей [Emens et al., 2017; Wykes and Lewin, 2018].

Результатом взаимодействия иммунной системы и опухоли является процесс иммуноредактирования, направленный на селекцию клеток, обладающих наименьшей иммуногенностью [Dunn et al., 2006]. Доказательства его существования были получены как у экспериментальных животных [Dupage et al., 2012; Matsushita et al., 2012], так и у человека [von Boehmer et al., 2013; Nicholaou et al., 2011].

Можно сказать, что большинство модельных экспериментов, проводимых на животных, искусственно имитирует состояние первичного иммунодефицита – например, за счет выключения функции того или иного компонента иммунной системы (knockout). Опухоли, возникающие у *RAG2*-нокаутных мышей, у которых отсутствуют Т-клетки и натуральные киллеры, в целом, значительно более иммуногенны, чем у нормальных животных [Schreiber et al., 2011]. У мышей с дефектом NKG2D, рецептора, экспрессируемого Т- и НК-клетками, развивающиеся спонтанные опухоли простаты обладали более высокой степенью злокачественности, но при этом продуцировали значительно большее количество лиганда NKG2D, чем у иммунокомпетентных животных [Guerra et al., 2008].

Поведение экспериментально вызванных сарком также существенно различалось в зависимости от состояния иммунитета: у иммунокомпетентных мышей опухоли развивались с длительным латентным периодом, и их эволюция двигалась в сторону доминирования клеток, не экспрессирующих антигены, в то время как у мышей с иммунодефицитом саркомы появлялись быстрее, но были высокоиммуногенными [Dupage et al., 2012].

В определенном смысле уязвимость заложена в самой сложности процессов адаптивного иммунитета, которому необходимо гибко реагировать на многочисленные вызовы внешней и внутренней среды. Разнообразие

рецепторов Т- и В-лимфоцитов, позволяющее связываться с широчайшим спектром антигенов, достигается за счет молекулярно - генетических процессов: V(D)J рекомбинации, переключения классов иммуноглобулинов и процесса соматической гипермутации. Для поддержания геномной стабильности в процессе этих сложных событий нужны адекватно функционирующие механизмы ДНК-репарации, в первую очередь, способность распознавания двунитевых разрывов ДНК [Woodbine et al., 2014]. По этой причине патогенез многих разновидностей ПИД связан именно с дефектами генов репарации (Табл. 3). Поскольку нестабильность генома одновременно является одной из принципиальных характеристик канцерогенеза [Hanahan and Weinberg, 2011], этот феномен причастен к патогенезу как иммунодефицитов, так и опухолей.

По данным отечественного регистра первичных иммунодефицитных состояний, злокачественные новообразования выявлены у 5.6% детей с ПИД; при этом, максимальная частота развития опухолей (48%) отмечалась у пациентов с дефектами репарации [Mukhina et al., 2018]. В то же время, перечень нозологий, ассоциированных с повышенным риском неоплазм, не ограничивается этой группой (Табл.4).

Без сомнения, следует учитывать, что опухоли, возникшие на фоне ПИД, могут иметь существенные отличия от обычных новообразований той же локализации. В целом, прогноз для пациентов с ПИД менее благоприятен, чем у иммунокомпетентных индивидуумов с такими же новообразованиями [Attarbaschi et al., 2016; Pastorczak et al., 2016; Seidemann et al., 1999].

Как правило, больным требуется профилактика оппортунистических инфекций, введение внутривенных иммуноглобулинов при гипогаммаглобулинемии [Tran et al., 2008]. Перспективным методом лечения пациентов является трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). В частности, описан успешный опыт лечения пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями, возникшими на фоне ПИД [Cohen et al., 2009].

Табл.3. Синдромы с дефектом ДНК-репарации и высоким риском развития опухолей

Синдром	Ген	Тип наследования	Возраст манифестации	Типичные симптомы	Частые разновидности опухолей у больных	Риск опухолей у гетерозигот
Атаксия-телеангиэктазия (синдром Луи-Бар)	<i>ATM</i>	Аутосомно-рецессивный	1-4 года	Прогрессирующая атаксия, дизартрия, окуломоторная апраксия, хореоатетоз. Телеангиэктазии конъюнктивы и кожи. Низкие уровни одного или нескольких классов иммуноглобулинов (чаще IgE, IgA, IgG2), развитие рекуррентных оппортунистических инфекций	Лейкозы и лимфомы. Редко: рак яичников, молочной железы, желудка, меланома, лейомиома, саркомы	Рак молочной железы
Синдром Блума	<i>BLM</i>	Аутосомно-рецессивный	С рождения до 2 лет	Пре- и постнатальная задержка роста, истончение подкожно-жировой клетчатки, эритема лица и открытых участков кожи после инсоляции. Инфекции среднего уха верхних дыхательных путей и легких. Низкий уровень иммуноглобулинов	Карциномы (толстая кишка, мочевыделительная система, верхние и нижние дыхательные пути, верхние отделы пищеварительного тракта, молочная железа); лимфоидная/гемопоэтическая ткань (острый лимфобластный и миелобластный лейкозы, лимфома). Саркомы. Герминогенные опухоли. Опухоли центральной нервной системы	Рак молочной железы, колоректальный рак

Синдром Ниймеген	<i>NBN</i>	Аутосомно-рецессивный	До 7 лет	Микроцефалия, задержка внутриутробного развития, низкорослость, отставание в психомоторном развитии. Рецидивирующие респираторные инфекции	Т- и В-клеточные лимфомы. Опухоли мозга (медуллобластома, глиома)	Рак молочной железы, рак простаты, медуллобластома, меланома
Анемия Фанкони	22 гена (<i>FANCA</i> – <i>FANCW</i>)	Аутосомно-рецессивный, реже Х-сцепленный (<i>FANCB</i>) и аутосомно-доминантный (<i>RAD51</i>)	4-10 лет	Низкий рост, пигментация кожи, скелетные мальформации верхних и нижних конечностей, микроцефалия, аномалии мочепоолового тракта. Прогрессирующее поражение костного мозга: панцитопения	Острый миелобластный лейкоз, опухоли головы и шеи, кожи, пищеварительного и мочепоолового тракта	Рак молочной железы, рак яичников, рак поджелудочной железы
Врожденный дискератоз	<i>DKC1</i> , <i>TERC</i> , <i>TINF2</i> , <i>CTC1</i> , <i>NHP2</i> , <i>NOP10</i> , <i>PARN</i> , <i>WRAP53</i> , <i>ACD</i> , <i>RTEL1</i> , <i>TERT</i>	Х-сцепленный (<i>DKC1</i>), аутосомно-доминантный, аутосомно-рецессивный	От детского до среднего возраста	Дисплазия ногтей, ретикулярная пигментация на коже шеи и градной клетки, лейкоплакия ротовой полости. Микроцефалия, низкорослость, фиброз легких. Недостаточность костного мозга, миелодиспластический синдром	Лейкозы, опухоли головы и шеи, мочепооловой системы	Нет данных

Синдром	Ген	Тип наследования	Возраст манифестации	Типичные симптомы	Частые разновидности опухолей у больных	Риск опухолей у гетерозигот
Дефицит лигазы IV	<i>LIG4</i>	Аутосомно-рецессивный	Детский возраст	Микроцефалия, низкорослость, отставание в психомоторном развитии, «птичье лицо», гипогонадизм, фоточувствительность, псориазо-подобное поражение кожи, панцитопения	Лимфома, лейкоз, плоскоклеточная карцинома прямой кишки, карцинома околоушной железы, печеночноклеточная карцинома	Нет данных

Табл. 4. Другие врожденные дефекты иммунитета с повышенным риском развития опухолей

Заболевание	Тип наследования	Гены	Типичный возраст манифестации	Клинические проявления	Опухоли
Общая переменная иммунная недостаточность (ОВИН)	Аутосомно рецессивный, аутосомно доминантный	Аутосомно-рецессивные формы: <i>ICOS, TNFRSF13B, TNFRSF13C, CD19, CD81, CR2(CD21), MS4A1 (CD20), TNFRSF7 (CD27), IL21, IL21R, LRBA</i> Аутосомно-доминантные формы: <i>TNFRSF13B, NFKB1, NFKB2, IKZF1, IKAROS</i>	В любом возрасте (наиболее часто - 20-40 лет)	Острые и хронические инфекции, аутоиммунные заболевания. Часто рецидивирующие инфекции уха, придаточных пазух, бронхиты, пневмонии. Лимфоаденопатия, гепатоспленомегалия, аутоиммунные цитопении. Низкие уровни иммуноглобулинов (обычно IgA и IgG)	Неходжкинские лимфомы, рак желудка, молочной железы, мочевого пузыря, шейки матки, вульвы, тонзиллярная карцинома
Агаммаглобулинемия Брутона	X-сцепленный	<i>BTK</i>	После 6-9 месяцев жизни	Рекуррентные инфекции (часто поражение дыхательных путей), гипоплазия лимфоидной ткани. Снижение уровня иммуноглобулинов всех классов	Лимфома, рак желудка, колоректальный рак
Тяжелая комбинированная иммунная недостаточность (ТКИН)	Аутосомно рецессивный, X-сцепленный	<i>JAK3, ADA, RAG1, RAG2, DCLRE1C/Artemis, NHEJ1/Cernunnos, ZAP70, IL2RG</i>	От рождения до 3 лет	Тяжелые инфекции дыхательного и пищеварительного тракта (кандидоз, хроническая диарея, снижение прибавки массы тела и отставание в росте). Инфекции, вызванные условно патогенными микроорганизмами	Неходжкинские и ходжкинские лимфомы, EBV-ассоциированная лимфома, лимфома Беркитта, лейкозы, множественные лейомиомы почек и легких

Заблевание	Тип наследования	Гены	Типичный возраст манифестации	Клинические проявления	Опухоли
Синдром Вискотта-Олдрича	Х-сцепленный	WAS	От рождения до 2 лет	Склонность к кровоточивости, экзема, рекуррентные бактериальные и вирусные инфекции. Микротромбоцитопения	В-клеточная лимфома, лейкемия, астроцитомы, саркома Капоши, лейомиомы
Х-сцепленный лимфопролиферативный синдром	Х-сцепленный	<i>SH2D1A, XIAP</i>	6 мес – 9 лет	Гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз, тяжелое течение EBV-инфекции и других вирусных инфекций. Дисгаммаглобулинемия	Ходжкинские и неходжкинские лимфомы
Дефицит <i>GATA2</i> , синдром MONOMAC (monocytopenia and mycobacterium avium complex)	Аутосомно доминантный	<i>GATA2</i>	5 мес – 78 лет (в среднем, около 20 лет)	Повышенная восприимчивость к диссеминированным нетуберкулезным микобактериальным инфекциям, вирусам (особенно HPV), грибковым инфекциям. Моноцитопения, дефицит В-лимфоцитов и натуральных киллеров	Острый миелоидный лейкоз, метастатическая меланома, лейомиосаркома, рак шейки матки, рак молочной железы

Вопреки распространенному мнению, при многих разновидностях ПИД существуют возможности эффективной терапии (внутривенные иммуноглобулины, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток и т.д.); иногда своевременное лечение позволяет предупредить и потенциальное развитие опухолей. Для некоторых форм первичных иммунодефицитов предпринимаются попытки замещения дефекта за счет введения нормальной копии гена в гемопоэтические стволовые клетки с помощью вирусных векторов [Thrasher and Williams, 2017]. Фактически, отдельные формы ПИД (дефицит аденозиндезаминазы, X-сцепленная тяжелая комбинированная иммунная недостаточность) представляют собой немногочисленные примеры реальных успехов генотерапии в клинической практике.

Наличие генетического дефекта иммунитета у пациента с онкологическим заболеванием может модифицировать тактику лечения больного. Это требует внимательности онколога (в первую очередь, детского) в отношении распознавания возможных признаков ПИД [Costa-Carvalho et al., 2014]. С другой стороны, выявление иммунодефицитного состояния врачами других специальностей нередко заставляет задуматься о потенциальном риске развития опухолей у конкретного пациента. В любом случае, настороженность в отношении ПИД крайне целесообразна, учитывая достаточно тесную патогенетическую связь между нарушениями иммунитета и развитием новообразований.

Синдромы с нарушением ДНК-репарации представляют собой группу заболеваний, связанных с дефектами ключевых белков, которые участвуют в репликации ДНК или клеточном ответе на её повреждения. Несмотря на клиническую и генетическую гетерогенность, можно выделить некоторые черты, общие для этих болезней. Во-первых, для пациентов характерно наличие пренатальной и постнатальной задержки роста и, в большинстве случаев, уменьшение окружности головы (микроцефалия). Во-вторых, риск развития опухолей у таких пациентов многократно превышает

общепопуляционный; при этом 60-70% новообразований затрагивают лимфоидную ткань [Vomken et al., 2018].

Кроме того, риск новообразований также повышен у гетерозиготных носителей мутаций [Gruber et al., 2002; Kleibl and Kristensen, 2016], поэтому родственники больных также нуждаются в медико-генетическом консультировании и профилактическом наблюдении.

Основные клинические проявления заболеваний этой группы представлены в Табл.3.

Пациенты с синдромом Ниймеген (Nijmegen breakage syndrome) обладают характерным фенотипом (низкорослость, «птичье» лицо, микроцефалия) и имеют тяжелые нарушения гуморального и клеточного иммунитета [Wolska-Kuśnierz и др., 2015]. Белок NBN входит в структуру комплекса, участвующего в коррекции хромосомных aberrаций, индуцированных радиацией.

Примечательно, что 70-100% пациентов с синдромом Ниймеген гомозиготны по аллелю *NBN* с.657_661del5, который с высокой частотой встречается в странах Восточной Европы, в том числе и в России; таким образом, этот вариант представляет собой славянскую founder-мутацию [Resnick et al., 2003; Seemanova et al., 2016; Varon et al., 2000].

Не вызывает сомнений повышенный риск новообразований у гетерозиготных носителей мутаций *NBN* [Seemanová et al., 2007]. В частности, неоднократно отмечалась повышенная частота варианта с.657_661del5 при различных солидных опухолях, таких как рак молочной железы, простаты, медуллобластома, меланома [Bogdanova et al., 2008; Buslov et al., 2005; Ciara et al., 2010; Cybulski et al., 2004; Górski et al., 2003].

Больные анемией Фанкони имеют разнообразные клинические проявления, включая низкорослость, пятна на коже, микроцефалию, аномалии верхних и нижних конечностей, панцитопению. Характерна высокая частота гематологических и солидных опухолей; наиболее часто встречается острый миелобластный лейкоз [Auerbach, 2009].

Заболевание обладает очень высокой генетической гетерогенностью; в частности, описаны 18 генов, ответственных за развитие аутосомно-рецессивных форм, кроме того, существуют аутосомно-доминантная и X-сцепленная формы, ассоциированные с мутациями генов *RAD51* и *FANCB*, соответственно.

Носительство мутаций также может быть ассоциировано с риском опухолей: достаточно сказать, что моноаллельные дефекты *BRCA2* и *PALB2*, известные своей связью с развитием наследственного рака молочной железы и яичников, в гомозиготном состоянии являются причиной анемии Фанкони [Rahman and Scott, 2007].

Обсуждается возможная причастность к развитию рака и других генов, связанных с ДНК-репарацией (*DCLRE1C*, *LIG1*, и т.д.) [de Miranda et al., 2011].

Лечение гематологических новообразований у пациентов с нарушением ДНК-репарации имеет ряд особенностей и требует особой осторожности [Pastorczak et al., 2022]. Недавнее международное исследование продемонстрировало неплохие результаты применения ТГСК у больных с некоторыми разновидностями дефектов ДНК-репарации, особенно если для кондиционирования (процедуры подавления собственного костного мозга) использовались редуцированные схемы химиотерапии [Slack et al., 2018].

Атаксия-телеангиэктазия

Атаксия телеангиэктазия (синдром Луи-Бар) представляет собой аутосомно-рецессивное заболевание, вызываемое наследственным дефектом гена *ATM* и характеризующееся мозжечковой атаксией, телеангиэктазией кожи и конъюнктив, хромосомной нестабильностью, высокой чувствительностью к ионизирующему излучению, предрасположенностью к

опухолям и спектром иммунологических нарушений. Другие типичные признаки включают глагодвигательную апраксию, задержку роста, атрофию гонад, преждевременное старение и инсулинорезистентный диабет.

Распространенность АТ во всем мире находится в диапазоне 1: 40000 - 1: 100000, причем в некоторых сообществах, в которых выражен «эффект основателя», встречаются существенно более высокие оценки [Teive et al., 2015]. К основным клиническим признакам АТ относятся: прогрессирующее изменение походки (атаксия) с началом в возрасте от одного года до четырех лет, нарастающие нарушения речи (дизартрия), нарушение движений глазных яблок (окуломоторная апраксия), патологические движения (хореоатетоз). Несмотря на то, что симптом телеангиэктазии вошел в название заболевания, он может проявляться достаточно поздно.

Возраст манифестации и скорость прогрессирования заболевания могут существенно различаться даже у членов одной семьи [Verhagen et al., 2012].

Наиболее очевидной характеристикой классической АТ является прогрессирующая мозжечковая атаксия, возникающая, как правило, после обучения ходьбе; к десяти годам большинство детей теряют способность к самостоятельному передвижению. Все пациенты, начиная с подросткового возраста, нуждаются в помощи с решением бытовых задач. Снижение интеллекта обычно не наблюдается, хотя могут встречаться трудности в обучении.

Для пациентов с этим заболеванием характерны частые инфекции, в первую очередь, бронхов, легких, и придаточных пазух; при иммунологическом исследовании выявляются признаки нарушений гуморального и клеточного иммунитета. По этой причине АТ внесена в современную классификацию первичных иммунодефицитов, предложенную IUIS [Picard et al., 2018].

Из показателей иммунограммы наиболее характерны слабый антительный ответ на пневмококковые полисахаридные вакцины [Nowak-

Wegrzyn et al., 2004; Stray-Pedersen et al., 2005], а также снижение сывороточных иммуноглобулинов IgA, IgE и IgG2 [Driessen et al., 2013; Staples et al., 2008].

Феномен лимфопении, как правило, наблюдается у пациентов с наиболее тяжелыми мутациями, приводящими к практически нулевой активности АТМ - киназы, и является маркером неблагоприятного прогноза [Staples et al., 2008; Verhagen et al., 2012]. У некоторых больных отмечается повышенный уровень иммуноглобулина М в сочетании с гипогаммаглобулинемией; в этой группе пациентов продолжительность жизни значительно снижена [van Os et al., 2017]. Простым способом, позволяющим подтвердить диагноз, является определение концентрации альфа-фетопротеина в сыворотке крови – у подавляющего большинства больных АТ уровень этого белка превышает 10 нг/мл и повышается с возрастом [Stray-Pedersen et al., 2007].

Продукт гена *ATM* служит сенсором при распознавании двунитевых разрывов ДНК; мутации приводят к снижению способности к активации контрольных точек (checkpoints) клеточного цикла в ответ на воздействие ионизирующего излучения [Shiloh and Ziv, 2013]. Вероятно, с этим связан очень высокий риск развития злокачественных опухолей у пациентов с АТ; новообразования отмечаются у 40% больных [Heintz, 1996]. Особенно часто у них возникают лейкемии и лимфомы – риск этих заболеваний в десятки и даже сотни раз превышает популяционный [Sandoval and Swift, 2003]. К сожалению, прогноз при развитии опухолей, как правило, весьма неблагоприятен: если обычно 5-летняя выживаемость детей с лимфомой Ходжкина превышает 90%, средняя выживаемость пациентов с атаксией-телеангиэктазией составляет около 3 месяцев независимо от наличия или отсутствия лечения [Sandoval and Swift, 2003; Suarez et al., 2015]. Учитывая повышенную чувствительность больных к ДНК-повреждающим агентам, при лечении целесообразно использование редуцированных схем химиотерапии и таргетных препаратов;

применение лучевой терапии нежелательно [Meister et al., 2015; Pastorczak et al., 2016].

Носительство мутаций *ATM* встречается очень часто: до 1% здоровых людей являются обладателями гетерозиготных мутаций, что приводит к 1,5-3-кратному увеличению вероятности развития злокачественных опухолей - в первую очередь, рака молочной железы [Concannon et al., 2008; van Os et al., 2017; Tavtigian et al., 2009].

Ген *ATM* был обнаружен путем позиционного клонирования в 1995 году [Savitsky et al., 1995]. Несмотря на развитие методов генетического анализа, ДНК - диагностика АТ остается сложной из-за исключительно большого размера гена (66 экзонов; 3056 аминокислот). Спектр патогенных вариантов *ATM* чрезвычайно разнообразен, хотя в некоторых этнических группах был описан ряд повторяющихся вариантов [Babaei et al., 2005; Chessa et al., 2009; Gilad, 1996; Laake et al., 1998; Telatar et al., 1998].

Обычно анализ гена *ATM* включает предварительный скрининг кодирующей последовательности посредством SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism, анализ полиморфизма конформации одностранных фрагментов ДНК) с последующим секвенированием по Сэнгеру. Кроме того, в некоторых лабораториях для обнаружения больших перестроек генов используется мультиплексная лигазозависимая амплификация проб (MLPA). Уровень эффективности генетической диагностики АТ в таких исследованиях обычно приближается к 90%. Случаи, в которых не удаётся подтвердить биаллельную инактивацию *ATM* могут быть объяснены либо несовершенной методологией мутационного анализа, либо существованием фенокопий этого заболевания [Anheim et al., 2012; McConville et al., 1996].

Данные о спектре повреждений *ATM* в нашей стране достаточно скудны [Birrell et al., 2005] и, безусловно, нуждаются в обновлении.

Синдром Блума

Синдром Блума - орфанное заболевание, которое было описано нью-йоркским дерматологом Дэвидом Блумом в 1954 году. Заболевание вызвано биаллельной инактивацией гена *BLM*, локализованного в регионе 15q26.1. Он кодирует продукт, состоящий из 1417 аминокислот, принадлежащий к к подсемейству ДНК-хеликаз RecQ.

Белок BLM играет важную роль в поддержании стабильности ДНК [Chu and Nickson, 2009], являясь сенсором повреждения ДНК и рекрутируя другие белки репарации в место дефекта [Tikoo and Sengupta, 2010]. Хеликаза BLM обеспечивает точность гомологичной рекомбинации, разрушая структуры Холлидея и, таким образом, предотвращая кроссинговер между сестринскими хроматидами [Wu and Nickson, 2003]. Кроме того, она управляет регрессией остановленной вилки репликации [Ralf et al., 2006]. Описано участие BLM в поддержании структуры теломер [Bohr, 2008].

Нарушение функции хеликазы приводит к высокому уровню гомологичной рекомбинации хромосом. Это выражается в повышенном числе обменов несестринских хроматид, увеличении числа квадриадальных конфигураций в культуре лимфоцитов и появлении хромосомных разрывов и перестроек, что может быть обнаружено при цитогенетических исследованиях [Chaganti et al., 1974; German et al., 1965].

К основным клиническим проявлениям относятся: задержка внутриутробного развития, низкорослость умеренной или тяжелой степени, микроцефалия, а также характерная эритема на лице, имеющая вид бабочки и возникающая под действием солнечного света.

Инфекционные проявления характерны для большинства больных: в первую очередь, это рекуррентные респираторные инфекции и гастроэнтериты. Как правило, наблюдается снижение по меньшей мере одного из классов иммуноглобулинов, в основном А и М [Cunniff et al., 2017]. Из

других нарушений иммунологических показателей отмечается снижение числа эффекторных В-лимфоцитов и В-клеток памяти, а также CD4⁺ Т-лимфоцитов [Schoenaker et al., 2018]; показано, что у пациентов с синдромом Блума гиперактивирован профиль интерферон-индуцированных генов [Gratia et al., 2019].

Геномная нестабильность объясняет повышенную частоту развития у больных синдромом Блума злокачественных опухолей, причем в необычно раннем возрасте. Это - наиболее опасное проявление синдрома. Нередки случаи, когда обнаружение опухоли становится первым симптомом, привлекающим внимание к другим проявлениям болезни, и ведущим к установлению диагноза [Campbell et al., 2018]. Обычно опухолевые заболевания манифестируют на третьем десятилетии жизни и являются основной причиной преждевременной смерти [Chu and Hickson, 2009; Ralf, et al., 2006]. Спектр новообразований достаточно широк; наиболее характерны лейкозы, лимфомы, опухоли ЖКТ, рак кожи и молочной железы [Cunniff et al., 2018].

Фенотип гетерозиготных индивидуумов нормален, хотя лабораторные тесты иногда позволяют выявить у них некоторые признаки геномной нестабильности [Martin et al., 1994]. Роль гетерозиготности по *BLM* в повышении риска развития рака подтверждается также экспериментами на генно-модифицированных мышах [Collins et al., 1995]. Gruber и соавт. [Gruber et al., 2002] сообщали о повышенном риске колоректального рака у носителей мутации *BLM*, однако это открытие было позже оспорено [Cleary et al., 2003].

К настоящему времени описано менее 300 пациентов с синдромом Блума, причем около четверти из них несли гомозиготную мутацию, характерную для евреев - ашкенази, *BLM* c.2207-2212delATCTGAinsTAGATTC (*BLMAsh*). Приблизительно 1% евреев-ашкенази гетерозиготны по аллелю *BLMAsh*, поэтому целесообразен соответствующий генетический скрининг этой

популяции [Arora et al., 2014; Cunniff et al., 2017; German et al., 2007; Roa et al., 2011]; см. также реестр синдрома Блума <http://weill.cornell.edu/bsr/>].

Систематические сведения о частоте данного заболевания в России отсутствуют.

Роль генетических методов в диагностике ПИД

Значительному числу больных с первичными дефектами иммунитета так и не устанавливается правильный диагноз. В первую очередь, это связано с тем, что критерии подозрения на ПИД обладают низкой чувствительностью и специфичностью [Costa-Carvalho et al., 2014]. Также, помимо «истинных» иммунодефицитов существуют многочисленные заболевания, в клинической картине которых доминируют признаки аутовоспаления, аллергии и аутоиммунных реакций [Picard et al., 2015]. В подобных случаях пациенты часто не соответствуют формальным критериям подозрения на наличие ПИД, и поэтому не подвергаются тщательному обследованию [Щербина, 2015].

Традиционные лабораторные подходы к выявлению наследственных дефектов иммунитета далеко не всегда позволяют установить точный диагноз. Это связано с тем, что данная группа заболеваний объединяет нозологические формы, крайне гетерогенные в отношении клинических, иммунологических и генетических характеристик. Дефекты различных генов могут приводить к развитию похожей симптоматики и одинаковым изменениям лабораторных показателей; и, напротив, разные мутации одного и того же гена способны проявляться в формировании разных фенотипов [Al-Herz and Notarangelo, 2012].

Трактовка результатов серологических исследований может быть затруднена и вследствие комбинированного генетического дефекта нескольких звеньев иммунитета. Кроме того, в некоторых случаях, несмотря

на наличие наследственной мутации, показатели стандартной иммунограммы остаются в пределах нормы, что приводит к диагностическим ошибкам.

Рутинная ДНК-диагностика, как правило, ограничена теми немногими нозологическими формами (агаммоглобулинемия Брутона и т.д.), при которых клинико-иммунологические показатели обладают достаточной специфичностью, а генетические детерминанты немногочисленны и хорошо изучены. В подобных случаях вполне оправдан подход, при котором анализу (обычно – секвенированию по Сэнгеру) подвергается один ген, связанный с развитием заболевания. Однако, значительно чаще «точечный» ДНК-анализ малоэффективен ввиду существования множества генов, мутации которых могут приводить к развитию сходной симптоматики. Современное развитие технологий высокопроизводительного секвенирования нового поколения (NGS) позволяет преодолеть эти препятствия за счет одномоментного анализа большого числа генов или, в случае необходимости, всего экзона и даже генома.

Наиболее популярным направлением диагностики становится высокопроизводительное таргетное секвенирование, при котором выборочно анализируются участки ДНК пациента, содержащие десятки или сотни известных генов ПИД. Однако, несмотря на большие возможности, выявить генетическую причину заболевания удастся лишь в 15 - 40% клинически неясных случаев [Al-Mousa et al., 2016; Moens et al., 2014; Nijman et al., 2014; Stoddard et al., 2014]. В первую очередь, это можно объяснить существованием других генов, причастность которых к развитию ПИД еще не установлена. Полноэкзомное и полногеномное секвенирование не имеют подобных ограничений. Будучи ввиду высокой стоимости реагентов не очень пригодными к рутинному использованию, эти методы незаменимы именно в качестве исследовательских инструментов: ежегодно с их помощью происходит открытие не менее десятка новых генов ПИД [Raje et al., 2014].

В то же время, необходимо отметить, что на современном этапе большинство разновидностей высокопроизводительного секвенирования не лишены технических недостатков. В частности, не всегда возможна надежная детекция крупных инсерций и делеций, а также неканонических сайтов сплайсинга [Fang et al., 2016].

Другую, еще более важную, проблему представляет оценка медицинской значимости полученных результатов. Для выявления патогенной мутации исследователю в первую очередь необходимо отфильтровать огромное число безвредных полиморфных вариантов. Одним из критериев отбора является популяционная частота аллеля – чем она выше, тем больше вероятность того, что мы имеем дело с нейтральным явлением. Кроме того, очень важен тип выявленной мутации: если нуклеотидное изменение приводит к возникновению стоп-кодона или к сдвигу рамки считывания, скорее всего, оно влечет за собой серьезные последствия в виде нарушения функции кодируемого белка. Упрощает анализ генетических данных наличие сведений о патогенности данного варианта в научной литературе. Обнаруженные генетические повреждения должны соответствовать тому или иному типу менделевского наследования. Так, чтобы подтвердить наличие аутосомно-рецессивного заболевания, необходимо обнаружить мутацию двух копий конкретного гена, в виде гомозиготы или компаунд-гетерозиготы.

«Неудобной» реальностью современной ДНК-диагностики является частое выявление вариантов с неясным клиническим значением (традиционно их называют аббревиатурой VUS – variant of unknown significance). Такие изменения могут быть не описаны в литературе или базах данных; нередко отсутствуют и сведения об их популяционной частоте. В этом случае невозможно с уверенностью сказать, связана ли находка с развитием заболевания у пациента. Прибегают к косвенной оценке патогенности, учитывая теоретические данные предиктивных программ, а также тип мутации. Очень важно подчеркнуть, что анализ данных не должен

проводиться в отрыве от фенотипа пациента; как правило, для успешной диагностики необходимо тесное взаимодействие специалистов (генетиков, иммунологов, эндокринологов и т.д.).

Успешность выявления ПИД, в первую очередь, зависит от разумной настороженности врачей различных специальностей в отношении этой группы заболеваний. Кроме того, усилия требуются и от научного сообщества. В частности, крайне необходимы регулярное обновление генетических баз данных, улучшение способов биоинформатической обработки результатов высокопроизводительного секвенирования. Очень важна публикация сведений о патогенности или наоборот, нейтральности, тех или иных генетических вариантов; особенно стоит подчеркнуть ценность описания даже отдельных случаев пациентов с новыми мутациями или необычным течением заболевания [Casanova et al., 2014].

Таким образом, оптимизация молекулярной диагностики наследственных заболеваний, ассоциированных с повышенным риском возникновения опухолей, является актуальной проблемой, решение которой требует комплексного подхода, основанного на знании особенностей генетического груза населения конкретной страны. В фокусе внимания настоящей работы лежат как непосредственно опухолевые синдромы, так и орфанные наследственные заболевания – в первую очередь, туберозный склероз и первичные иммунодефициты. В частности, данное исследование посвящено систематизации сведений о спектре молекулярно-генетических повреждений при синдромах Линча, Пейтца-Егерса, наследственного рака молочной железы, туберозного склероза и широкого спектра наследственных дефектов иммунной системы.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Набор пациентов

В исследование вошли архивные патоморфологические образцы опухолевой ДНК 2889 пациентов с неполипозным раком толстой кишки ($n = 2763$) или раком эндометрия ($n = 126$), диагностированными в возрасте 60 и менее лет, направленные в лабораторию молекулярной онкологии НМИЦ им. Н.Н. Петрова в период 2013 – 2022 гг. с целью генетического тестирования.

Набор пациентов с подозрением на синдром Пейтца-Еггерса проводился среди пациентов, получавших консультацию или лечение в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова в период 2016–2022 гг. В качестве критериев отбора использовалось сочетание двух или более гамартомных полипов ЖКТ и характерных меланоцитарных пигментаций на коже или слизистых. В исследование вошли 10 неродственных пациентов (4 мужского, 6 женского пола). Средний возраст на момент обследования составил 24 года (диапазон от 11 до 36 лет). Семейный анамнез, отягощенный в отношении полипов ЖКТ, был отмечен у четырех пациентов.

Пациентки с раком молочной железы ($n = 1498$; средний возраст на момент установления диагноза 51 год; возрастной диапазон от 24 до 81 года) проходили лечение в НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова (Санкт-Петербург). 879 случаев (средний возраст 54 года; возрастной диапазон 25–81 год) относились к последовательно собранным в течение апреля 2001 г. - февраля 2002 г., марта 2003 г. - января 2004 г., июня 2006 г. - мая 2007 г. и марта 2008 г. - мая 2008 г. У 437 пациенток (49.7%) наблюдался как минимум один из клинических признаков предрасположенности к РМЖ (семейный анамнез у ближайших родственников, билатеральность поражения, возраст манифестации ≤ 50 лет). Образцы еще 451 пациентки (средний возраст 45.3 года; возрастной диапазон 24–78 лет) были направлены в 2008–2010 гг. на

генетическое тестирование ввиду наличия клинических признаков наследственного РМЖ, либо из-за личных опасений пациентки; 386 (85.6%) этих женщин имели вышеупомянутые признаки высокого риска РМЖ. Остальные 168 случаев (средний возраст: 51.2 года; возрастной диапазон: 26–80 лет) собраны случайным образом; 101 (60.1%) из этих женщин имелиотягощенный семейный анамнез, двустороннее поражение молочных желез или раннее начало РМЖ.

95 образцов РМЖ составили «генетически обогащенную» (high-risk) группу. В неё были включены пациентки (средний возраст 42 года; возрастной диапазон 24-77 лет), имеющие признаки генетической предрасположенности к РМЖ, однако негативные в отношении мутаций гена BRCA1, а также частых мутаций CHEK2, NBS1/NBN и BRCA2. Из этих женщин 43 (45%) имели один клинический признак наследственного РМЖ (раннее начало: n = 29; билатеральность поражения: n = 14). В 48 случаях (51%) была выявлена комбинация из двух клинических маркеров предрасположенности (раннее начало и пораженный родственник(и) первой степени родства: n = 32; билатеральность и пораженный родственник(и) первой степени: n = 2; билатеральность и раннее начало: n = 14); у остальных четырех женщин (4%) наблюдалось сочетание всех трех признаков предрасположенности к РМЖ.

Кроме того, в исследовании приняли участие 199 пациенток с диагнозом «рак яичников» (средний возраст 53.4 года; возрастной диапазон от 18 до 82 лет) и 339 случаев с диагнозом «рак легких» (средний возраст 60.5 лет; возрастной диапазон от 30 до 84 лет). В контрольную группу (онкологически здоровые) входили 1093 женщины (средний возраст 42.0 года; возрастной диапазон 18–74 года) и 1091 мужчина (средний возраст 36.4 года; возрастной диапазон 18–74 года); образцы крови были собраны в отделениях переливания крови НИИ онкологии им. Петрова (n = 744) и городской больницы № 26 (n = 1074), а также в различных отделениях городской больницы № 2 (n = 281) и институте пульмонологии, Санкт-Петербург (n = 85) в период с 1998 по 2011 гг.

В исследование были включены пациенты с клиническими признаками туберозного склероза ($n = 61$), в течение 2012–2016 гг. проходившие лечение в медицинских учреждениях Москвы, Санкт-Петербурга, Екатеринбурга и Уфы. Данные по большинству больных присутствовали в реестре пациентов с ТС, который поддерживается в Центре эпилептологии Национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова (Москва). 53 (87%) больных соответствовали критериям несомненного диагноза ТС, тогда как остальные 8 (13%) были классифицированы как случаи возможного ТС. Средний возраст пациентов составил 8.8 года (диапазон от 3 месяцев до 43 лет).

Пациенты с подозрением на атаксию-телеангиэктазию (17 больных из 16 семей) проходили обследование в течение 2016–2019 годов. 14 детей наблюдались на кафедре клинической иммунологии (Российская клиническая детская больница, Медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва); один пациент был госпитализирован в Первую детскую городскую больницу Санкт-Петербурга, а двое были направлены иммунологом консультационно-диагностического центра Санкт-Петербургского педиатрического университета.

Набор детей с рекуррентными инфекциями производился в 2016–2019 гг. в нескольких лечебных учреждениях Санкт-Петербурга (отделения гастроэнтерологии, эндокринологии и ревматологии СПбГПМУ, Консультационно-диагностический центр СПбГПМУ, отделение респираторных (капельных) инфекций и отделение нейроинфекций и органической патологии нервной системы НИИ детских инфекций, Детская городская больница №1) и Москвы (Российская детская клиническая больница). Изначально были проанализированы истории болезни 422 пациентов, однако, 25 больных были исключены вследствие различных причин (несоответствие критериям отбора, выписаны из ЛПУ и т.д.). К участию в исследовании были привлечены 397 пациентов, полностью

соответствующих критериям отбора. Средний возраст пациентов на момент исследования составил 7.5 лет (диапазон 2 месяца – 18 лет).

Все пациенты оценивали свое этническое происхождение как «славянское» или «предположительно славянское». Во всех случаях от пациентов или их родителей/опекунов было получено информированное согласие на участие в исследовании.

Проведение исследования одобрено протоколом ЛЭК ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (выписка №20/25 заседания №1 от 28.01.2020 г).

Общий план исследования отражен на Рис. 1.

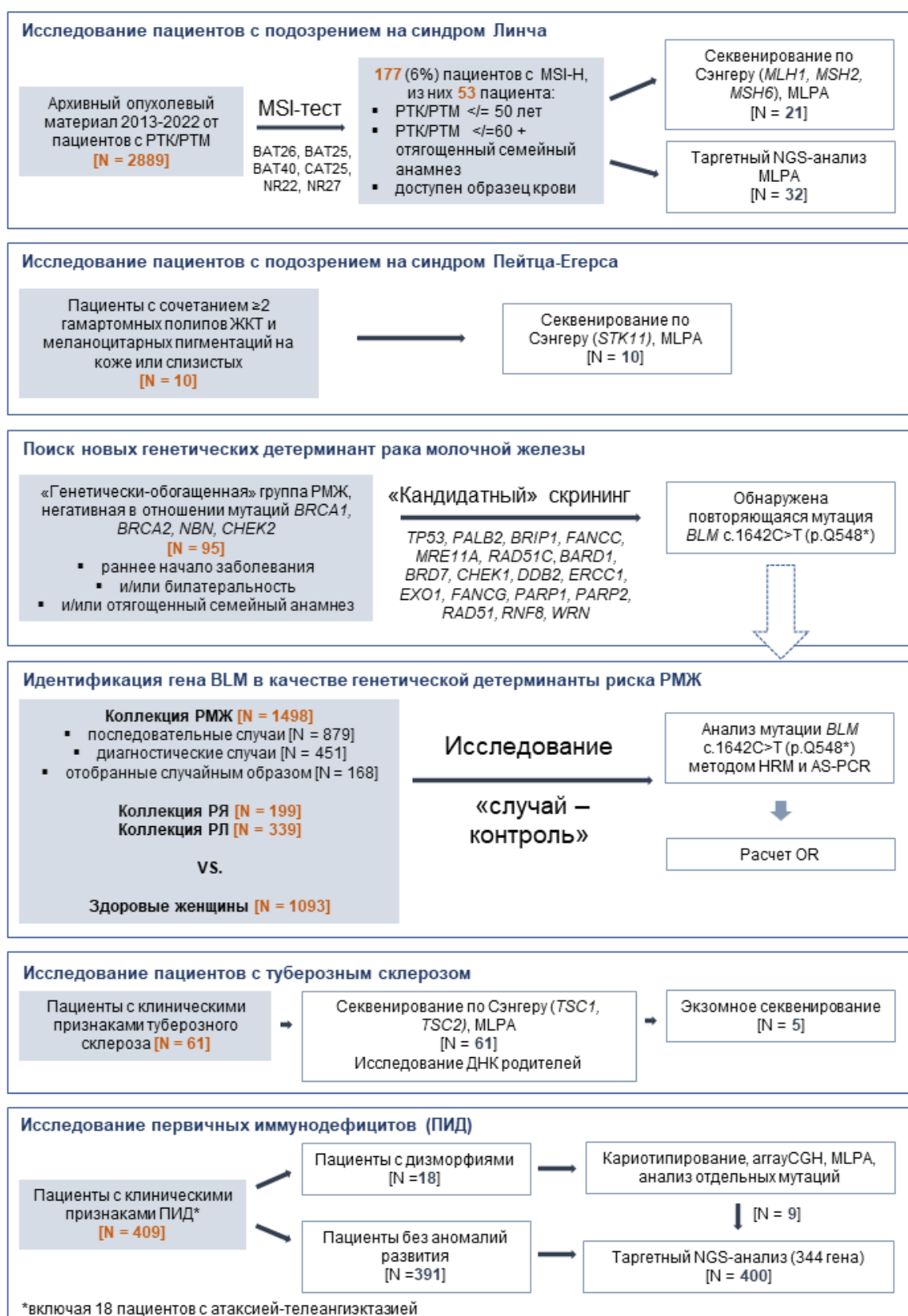


Рис. 1. Общий план исследования

2.2. Выделение ДНК

Выделение ДНК из крови

Экстракция ДНК из периферических лейкоцитов проводилась при помощи модифицированного соль-хлороформного метода (Mullenbach et al., 1989). Для гипоосмотического лизиса эритроцитов кровь разводилась в 3 раза дистиллированной водой. Затем осуществляли осаждение лейкоцитов посредством центрифугирования. Осадок ресуспендировали в 1 мл Трис-НСl (рН = 8.3), 1 мМ ЭДТА. Для разрушения плазматической мембраны клеток к суспензии добавляли Тритон X-100 до концентрации 1%. Ядра осаждали центрифугированием, ресуспендировали в 1 мл Трис-НСl (рН = 8.3), 1 мМ ЭДТА и лизировали посредством добавления додецилсульфата натрия (SDS) до концентрации 0.5%. Частичный протеолиз белков осуществлялся в присутствии протеиназы К (100 мкг/мл) при температуре 65°C в течение 12 часов. Затем к препарату добавляли раствор NaCl до конечной концентрации 1.5 М и равный объём хлороформа. Экстракция органическим растворителем проводилась в течение 30 мин. при медленном покачивании и приводила к удалению нерастворимых компонентов клеток, белков и липидов. После центрифугирования ДНК, содержащуюся в водной фазе, переосаждали 2 объёмами 96% этанола; осадок промывали 70% этанолом и растворяли в растворе TE до концентрации 1 мкг/мкл.

Выделение ДНК из опухолевой ткани

В качестве источника опухолевой ДНК использовались срезы фиксированных в формалине кусочков операционного материала, полученных из патоморфологического архива НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова.

После осуществления мануальной микродиссекции, направленной на минимизацию примеси нормальных клеток, ткань опухоли подвергалась депарафинизации посредством двухкратной инкубации в ксилоле. После промывки в 96% этаноле патоморфологический срез погружался в 200 мкл лизирующего раствора, содержащего 10 мМ Трис-НСl (рН = 8.3), 1 мМ ЭДТА и 2% Тритона X-100; в раствор добавлялась протеиназа К до концентрации 500 мкг/мл; протеолиз выполнялся в течение 6 - 12 часов при температуре 65°C и завершался инактивацией фермента посредством кратковременного нагревания препарата до 95°C. Далее к лизату добавлялся 1 объем нейтрального фенола (200 мкл) и 1/3 объема (60 мкл) смеси хлороформа и изоамилового спирта в соотношении 24:1; смесь перемешивалась на вортексе и центрифугировалась 30 мин на максимальных оборотах (14000 rpm). Супернатант переносился в чистые пробирки, к нему добавляли 60 мкл хлороформа (1/3 объема), перемешивали и центрифугировали 20 мин. После переноса супернатанта в новые пробирки к нему добавляли 1/10 объема ацетата натрия (3М, рН 5.0), 1 объем изопропанола и 1 мкл гликогена; смесь тщательно перемешивали. Далее осуществлялась стадия преципитации при температуре -20°C, после чего проводилось центрифугирование на максимальных оборотах в течение 20 мин. После удаления спирта полученный осадок однократно отмывали 70% этанолом, высушивали при комнатной температуре и растворяли в 100 мкл Tris-НСl.

2.3. Секвенирование по Сэнгеру и аллель-специфическая ПЦР

Поиск мутаций в различных генах осуществлялся с помощью высокоразрешающего анализа плавления ПЦР-фрагментов (High Resolution Melting, HRM), с использованием стандартных условий. Каждая ПЦР-реакция (суммарный объем 10 мкл) содержала 1 мкл раствора ДНК, 0,5 ед. ДНК-

полимеразы, 1-кратный ПЦР-буфер (pH 8.3), 2,5 мМ MgCl₂, 1-кратный Eva Green, 200 мкМ каждого из нуклеотидтрифосфатов, 0,3 мкМ прямого и обратного праймеров. ПЦР-реакция начиналась с 10-минутной активации Taq-полимеразы при 95⁰С; для накопления ПЦР-продукта проводилось 45 циклов амплификации (денатурация: 15 сек при 95⁰С; отжиг: 30 сек при 60⁰С; синтез: 30 сек при 72⁰С). ПЦР и последующий этап плавления продукта осуществлялись на приборах CFX96 (BioRad) и Roche Light Cycler (Roche).

Фрагменты, демонстрирующие необычный паттерн плавления, подвергались секвенированию по Сэнгеру с применением наборов GenomLab DTCS Starting Kit (Beckman Coulter) в соответствии с рекомендациями производителя; затем проводился капиллярный электрофорез на приборе SEQ8000 (Beckman Coulter). Последовательности праймеров, использованных для секвенирования кодирующей последовательности генов *TSC1*, *TSC2*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *STK11*, *BLM*, а также отдельных экзонов гена *ATM* представлены в Приложении А.

Повторяющийся патогенный вариант *MLH1* с.677G>T (p.Gln197Argfs*8) анализировали с посредством ПЦР в реальном времени с использованием проб Taqman для аллельной дискриминации. Каждая реакция содержала 1 мкл ДНК, 0.75 ед. ДНК-полимеразы, 1-кратный ПЦР-буфер (pH 8.3), 2.5 мМ MgCl₂, 200 мкМ каждого из нуклеотидтрифосфатов, 0.3 мкМ праймеров (*MLH1*ex8_2F AACCGTGGACATATTCGCT и *MLH1*ex8_2R ATGTGATGGAATGATAAACCAA) и проб Taqman (*MLH1*R226R FAM-ATCGACATACCGACATAACAGCATTT-BHQ и *MLH1*R226L HEX-ATCGACATACCGAATAACAGCATTT-BHQ) в конечном объеме 20 мкл. ПЦР-реакция начиналась с 10-минутной активации Taq-полимеразы при 95⁰С; для накопления ПЦР-продукта проводилось 45 циклов двухступенчатой амплификации (денатурация: 15 сек при 95⁰С; отжиг и синтез: 55 сек при 60⁰С). ПЦР и этап аллельной дискриминации осуществлялись на приборах CFX96 (BioRad).

«Финскую» мажорную мутацию, повторяющуюся делецию экзона 16 гена *MLH1*, оценивали с помощью аллель-специфической ПЦР в реальном времени с использованием ранее описанных праймеров и условий реакции [Nyström-Lahti et al., 1995].

2.4. MLPA

Выявление крупных генных перестроек (делеций и дупликаций) было выполнено с помощью метода мультиплексной амплификации, зависимой от лигирования зондов (MLPA), с использованием коммерческих наборов компании MRC Holland в соответствии с протоколом производителя (<http://www.mlpa.com>). Визуализация результатов осуществлялась с помощью открытого программного обеспечения Coffalyser.Net™.

У пациентов с признаками туберозного склероза использовались наборы P124 (ген *TSC1*) и P046 (*TSC2*); в случаях подозрения на наличие дефекта *TSC2* проводилась дополнительная верификация с применением набора проб P337.

Для поиска крупных перестроек генов *MLH1*, *MSH2* и *EPCAM* применялся набор P003-C1; для анализа гена *STK11* - набор P101.

Пациентам с высоким уровнем IgE MLPA проводилась с использованием набора проб P386 *DOCK8-STAT3*.

Больным с подозрением на микроделеционные синдромы проводился MLPA-анализ ряда хромосомных регионов (1p36, 2p16.1-p15, 2q23.1, 2q32-q33, 3q29, 4p16.3, 5p15, 5q35.3, 7q11.23, 8q24.11-q24.13, 9q22.3, 10p13-p14, 15q11.2, 15q24, 16p13.3, 17p13.3, 17p11.2, 17q21.31, 22q11.21, 22q11.2, 22q13, Xq28) с использованием набора проб P245-B1.

Для оценки копийности локуса *ATM* использовались зонды P041-ATM1 и P042-ATM2.

2.5. Высокопроизводительное таргетное секвенирование

Таргетная панель для диагностики первичных иммунодефицитов

Выбор генов для создания таргетной панели для диагностики первичных иммунодефицитов основывался на современной классификации ПИД, предложенной в 2017 году Международным союзом иммунологических обществ (International Union of Immunological Societies, IUIS) [Picard et al, 2018].

В неё вошли 344 гена, ассоциированные с 354 известными на тот момент иммунодефицитными состояниями: *ACP5, ACTB, ADA, ADA2(CECR1), ADAM17, ADAR1, AICDA, AIRE, AK2, AP1S3, AP3B1, AP3D1, APOL1, ARPC1B, ATM, ATP6AP1, BACH2, B2M (FCGRT), BCL10, BCL11B, BLM, BLNK, BTK, C1QA, C1QB, C1QC, C1R, C1S, C2, C3, C4A, C4B, C5, C6, C7, C8A, C8B, C8G, C9, CARD11, CARD9, CARD14, CASP8, CASP10, CCBE1, CD19, CD247, CD27 (TNFRSF7), CD3D, CD3E, CD3G, CD40, CD40LG, CD46, CD55, CD59, CD70 (TNFRSF7), CD79A, CD79B, CD81, CD8A, CDCA7, CEBPE, CFB, CFD, CFH, CFHR1, CFHR2, CFHR3, CFHR4, CFHR5, CFI, CFP, CFTR, CHD7, CIITA, CLEC7A, CLCN7, CLPB, COPA, CORO1A, CR2 (CD21), CSF2RA, CSF2RB, CSF3R, CTC1, CTLA4, CTPS1, CTSC, CXCR4, CYBA, CYBB, DCLRE1C, DCLRE1B, DDX58, DKC1, DNAJC21, DNMT3B, DOCK2, DOCK8, ELANE, EPG5, ERCC6L2, EXTL3, F12, FAAP24, FADD, FANCA, FANCM, FAS (TNFRSF6), FASLG, FAT4, FCGR3A, FCN3, FERMT3, FOXN1, FOXP3, FPR1, G6PC3, G6PD, GATA2, GF11, GINS1, GJC2, GTF2H5, HAX1, HELLS, HMOX1, HYOU1, ICOS, IFIH1, IFNAR2, IFNGR1, IFNGR2, IGHM, IGKC, IGLL1, IKBKB, IKBKG (NEMO), IKZF1 (IKAROS), IL2, IL2RA, IL10, IL10RA, IL10RB, IL12B, IL12RB1, IL17F, IL17RA, IL17RC, IL1RN, IL21, IL21R, IL2RG, IL36RN, IL7R, INO80, IRAK1, IRAK4, IRF3, IRF7, IRF8, IRF2BP2, ISG15, ITCH, ITGB2, ITK, JAGN1 (JAG1), JAK1, JAK3, KDM6A, KMT2D, KRAS, LACC1, LAMTOR2, LCK, LIG1, LIG4, LPIN2, LRBA, LRRC8A, LYST, MAGT1, MAL (MKL1), MALT1, MAP3K14 (NIK), MASP2, MBL2, MCM4, MEFV, MKL1, MOGS, MPO, MRE11A, MS4A1/CD20, MSH6, MSN, MTHFD1, MVK, MYD88, MYSM1, NBAS, NBN, NCF1, NCF2, NCF4, NCSTN, NFAT5, NFKB1, NFKB2, NFKBIA (IKBA), NHEJ1, NHP2, NLRC4, NLRP1, NLRP3, NLRP12, NOD2, NOP10, NRAS, NSMCE3 (NDNL2), ORAI1, OSTM1, OTULIN, PARN,*

PEPD, PGM3, PIK3CD, PIK3R1, PLCG2, PLEKHM1, PMS2, PNP, POLA1, POLE, POLE2, PRF1, PRKCD, PRKDC, PSEN1, PSENE1, PSMB8, PSTPIP1, PTEN, PTPRC, RAB27A, RAC2, RANBP2, RAG1, RAG2, RASGRP1, RASGRP2 (CalDAG GEF1), RBCK1 (HOIL1), RECQL4, RELB, RFX5, RFXANK, RFXAP, RHOH, RLTPR, RMRP, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, RNF168, RNF31, RNU4ATAC, RORC, RPSA, RTEL1, SAMD9, SAMD9L, SAMHD1, SBDS, SEMA3E, SERPING1, SH2D1A, SH3BP2, SLC29A3, SLC35A1, SLC35C1, SLC39A4, SLC37A4 (G6PT1), SKIV2L, SLC46A1, SMARCA1, SMARCD2, SNX10, SP110, SPINK5, STAT1, STAT2, STAT4, STAT3, STAT5B, STIM1, STK4, STN1, STX11, STXBP2, TAP1, TAP2, TAPBP, TAZ, TBK1, TBX1, TCIRG1, TCF3, TCN2, TERC, TERT, TFRC, THBD, TICAM1/TRIF, TINF2, TIRAP, TLR3, TMC6, TMC8, TMEM173, TNFAIP3, TNFRSF11A, TNFRSF13B, TNFRSF13C, TNFRSF1A, TNFRSF4, TNFSF12 (TWEAK), TPP1, TPP2, TRAC (TCRA), TRAF3, TRNT1, TRAF3IP2, TREX1, TTC37, TTC7A, TYK2, UNC13D, UNC93B1, UNG, USB1, USP18, VPS13B, VPS45, WAS, WDR1, WRAP53, WIPF1, XIAP, ZAP70, ZBTB24.

Подбор зондов для целевого обогащения осуществлялся с использованием бесплатной программы NimbleDesign (<https://design.nimblegen.com/nimbledesign/>) (Roche). Подготовка ДНК-библиотек выполнялась с помощью набора Кара HyperPlus (Roche); селективное обогащение по кодирующим последовательностям и экзон-интронным границам генов ПИД проводилось с помощью набора SeqCapEZ System (Roche). Секвенирование парных концов в 150 п.н. было выполнено на платформе MiSeq (Illumina, США) со средней глубиной считывания 70-90X и эффективностью прочтения целевых последовательностей 98.8%.

Конвейер анализа включал выравнивание полученных фрагментов (alignment) на эталонный геном версии GRCh37 (hg19) с использованием программного обеспечения BWA 0.7.12, variant calling с помощью инструмента GATK 3.3.0, фильтрацию по качеству с помощью инструментов bcftools 1.2 и аннотацию вариантов с использованием SnpEff4.1.

Потенциально значимые варианты генов ПИД были визуально проверены в геномном браузере Golden Helix Genome Browser 3.0.0 (<http://goldenhelix.com>); образцы, демонстрирующие относительно низкую глубину прочтения (менее чем 20X) и/или существенное отклонение

соотношения между прочтениями («ридами») дикого типа и мутантными, подвергались верификации с помощью секвенирования по Сэнгеру.

Выбор потенциально патогенных вариантов основывался на: а) данных о популяционных частотах редких аллелей (Minor Allele Frequency, MAF), полученных из общедоступных баз данных (dbSNP, ExAC, ESP, gnomAD); максимальное пороговое значение MAF было установлено равным 0.03 (3%); б) сведениях о типе мутации (транскирующие, т.е., приводящие к нарушения синтеза белка vs. нетранскирующие); в) данных, полученных *in silico* с помощью предиктивных программ (Polyphen-2, SIFT, MutationTaster, LRT Pred, CADD); г) сведениях о клинической значимости (данные ClinVar, HGMD и PubMed). Редкие варианты, приводящие к сдвигу кадров или стоп-кодонам *de novo*, а также миссенс-мутации с CADD-оценкой (score), равной или большей 20, считались потенциально патогенными. Интерпретация вариантов проводилась в соответствии с современными зарубежными и отечественными рекомендациями. [Richards et al., 2015; Рыжкова и соавт., 2019] с помощью интернет-ресурсов VarSome (<https://varsome.com/>) и InterVar (<https://wintervar.wglab.org/>).

Анализ крупных перестроек гена *ATM*, основанный на данных NGS, выполнялся с помощью программного обеспечения CNVkit и метода Amplicon [Talevich et al., 2016]. Файл формата .bam пациента с подозрением на делецию сравнивался со референсным .bam файлом, содержащим данные, полученные от 25 пациентов без делеций или дупликаций локуса *ATM*; все данные были сгенерированы в одном запуске секвенатора.

Таргетная панель для диагностики наследственных опухолевых синдромов

Целевое обогащение в отношении произвольно выбранных генов основных наследственных опухолевых синдромов (*APC*, *ATM*, *BLM*, *BRCA1*,

BRCA2, CDH1, CDKN2A, CHEK2, FH, FLCN, MAP2K1, MAX, MEN1, MET, MLH1, MSH2, MSH3, MSH6, MUTYH, NBN, NF1, NF2, PALB2, PDGFRA, PMS2, POLD1, POLE, PTCH1, PTEN, RAD50, RAD51C, RAD51D, RB1, RET, SDHA, SDHAF2, SDHB, SDHC, SDHD, SMAD4, STK11, TMMEM127, TP53, TSC1, TSC2, VHL, WRN) осуществлялось с помощью коммерческого набора HEAT-Seq Choice (Roche).

Избирательное обогащение основывалось на использовании разновидности молекулярных инверсионных проб – HeatSeq Probes, состоящих из таргет-специфических последовательностей, соединенных линкером и содержащих молекулярные баркоды (универсальные идентификаторы).

Секвенирование проводилось на платформе MiSeq (Illumina, США) со средней глубиной прочтения не менее 150X и эффективностью прочтения целевых последовательностей 99.2%. Алгоритм биоинформатической обработки, приоритизации и интерпретации вариантов был аналогичен описанному в разделе 2.5.1.

2.6. Полноэкзомное секвенирование

Образцы ДНК больных без выявленных мутаций TSC1/2 подвергали полноэкзомному секвенированию (Whole exome sequencing, WES).

Массивное параллельное (экзомное) секвенирование выполнялось на платформе Illumina с 50-кратным покрытием. Процесс пробоподготовки включал фрагментацию ДНК и лигирование адаптеров. Далее библиотека была подвергнута экзомному обогащению – выделению кодирующих участков ДНК. На этапе пробоподготовки и экзомного обогащения использовались коммерческие наборы Nextera Exome Enrichment Kit (Illumina,

USA); процедура обогащения включала два раунда гибридизации ДНК с биотинилированными зондами, комплементарными экзонам. Заявленный производителем размер покрытия генома составлял 37 Мб и включал 214405 экзонов (98.3% последовательностей в базе Refseq).

Библиотеки были подвергнуты секвенированию на приборе MiSeq system (Illumina, USA) с использованием парных прочтений длиной 150 пар оснований. Аккуратность секвенирования оценивалась по количеству ридов (прочтений) с высоким показателем качества (Phred Quality Score, или Q score).

Первый этап обработки данных (конвертация нуклеотид-специфических флюоресцентных сигналов в формат fastq) был осуществлен с помощью программного обеспечения MiSeq Reporter, интегрированного в систему MiSeq. Далее, с помощью этого же программного продукта риды были выровнены (картированы) относительно эталонного (референсного) генома (геном человека в редакции hg19); для этой процедуры использован алгоритм BWA (Burrows-Wheeler Aligner). Полученные в результате выравнивания файлы в формате .bam затем обработаны с помощью набора программных инструментов GATK v.2.7 (Genome Analysis Tool Kit и Picard v.1.86) с целью выявления всех отличий от референсной последовательности.

Аннотация идентифицированных вариантов проводилась с использованием ресурса Annovar (<http://www.openbioinformatics.org/annovar/>). Полученный в результате файл в формате .txt послужил основой для дальнейшей фильтрации вариантов (наименование локуса, эффект мутации, частоты в базах данных полиморфизмов, показатель патогенности *in silico*, генотип, глубину прочтения и др.). Все варианты, отобранные для верификации, подвергнуты визуальной проверке в Integrative Genomic Viewer (<http://www.broadinstitute.org/igv/>).

2.7. Оценка популяционной частоты повторяющихся вариантов

Оценка популяционной частоты повторяющихся вариантов генов, ассоциированных с развитием ПИД, осуществлялась с помощью высокоразрешающего анализа плавления ПЦР-продуктов (High Resolution Melting, HRM) с последующим секвенированием по Сэнгеру фрагментов с необычным паттерном плавления. В качестве контрольной группы были использованы образцы крови здоровых доноров ($n = 500$).

Последовательности праймеров, использованных для HRM – анализа и секвенирования повторяющихся мутаций, приведены в Приложении В.

2.8. Анализ потерь гетерозиготности

Потерю гетерозиготности (Loss of Heterozygosity, LOH) в локусе *BLM* оценивали с помощью аллель - специфической ПЦР в режиме реального времени с применением флуоресцентного красителя SYBR Green. Для амплификации использованы праймеры ATGACTTAGAAAGAGAAACCC (аллель дикого типа), ATGACTTAGAAAGAGAACT (мутированный аллель) и TGATGGGTTGATAGGCC (общий обратный праймер). Значения циклов, на которых кривая амплификации приобретала экспоненциальный характер (C_t), сравнивались в опухолевом образце и ДНК нормальных клеток пациента; увеличение соотношения C_t между аллелем дикого типа и мутантной копией гена (ΔC_t) свидетельствовало о наличии феномена потери гетерозиготности.

2.9. Анализ микросателлитной нестабильности

Наличие феномена микросателлитной нестабильности (MSI-H) в опухолевых клетках оценивали с использованием ПЦР-амплификации квазимономорфных маркеров *BAT26*, *BAT25*, *BAT40*, *CAT25*, *NR22*, *NR27* с последующим гель-электрофорезом как описано ранее [Yanus et al., 2013].

2.10. Иммуногистохимическое окрашивание

Иммуногистохимическую (ИГХ) оценку опухолей проводили с помощью антител к ER (клон 6F11; Novocastra, Newcastle on Tyne, UK), PgR (клон 16; Novocastra, Newcastle on Tyne, UK), EGFR (клон 25; DAKO; Carpinteria, CA), HER2 (HercepTest; DAKO, Carpinteria, CA), CK 5/6 (клон D5/16 B4; DAKO; Carpinteria, CA), Vim (клон V9; Sanbio, Uden, the Netherlands).

Экспрессия белков репарации неспаренных оснований ДНК оценивалась с применением коммерческих антител MLH1 (ES05, Novocastra Leica), MSH2 (25D12, DBS), MSH6 (EPR3945, Abcam) и PMS2 (MOR4G, Novocastra Leica).

Классификация опухолей на экспрессионные подтипы с учетом иммуногистохимических паттернов выполнялась как описано ранее [Russnes et al., 2011]. Разделение базировалось на оценке экспрессии рецепторов к эстрогенам (ER) и прогестерону (PgR), цитокератинов 5/6 (CK5/6) и виментина (Vim). Образцы, позитивные в отношении ER и PgR, классифицировались как относящиеся к люминальному типу. Негативность в отношении упомянутых рецепторов служила основанием для отнесения опухоли к типу «трижды-негативных», даже при наличии позитивности по CK5/6 и/или Vim.

2.11. Статистическая обработка данных

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного обеспечения SPSS Version 17. Для сравнения малых групп использовался точный тест Фишера. Все различия считались достоверными при доверительной вероятности не менее 95 % (уровень значимости $p < 0,05$).

Корректировка множественных сравнений осуществлялась с помощью поправки Бонферрони. Для мета-анализа данных, полученных в различных публикациях, использовался метод Mantel-Haenzel.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Исследование пациентов с подозрением на синдром Линча

Необходимо отметить, что в большинстве западных стран для отбора пациентов с подозрением на синдром Линча используются клинические критерии Bethesda или Amsterdam I/II [Samadder et al., 2017; Umar et al., 2004]. Применение этих критериев подразумевает наличие подробных сведений о родословной пациента в нескольких поколениях. С практической точки зрения, такой подход представляется малореалистичным для населения стран, которые в недавнем прошлом испытывали масштабные исторические потрясения [Win et al., 2013]. По этой причине мы намеренно применили упрощенные клинические критерии первичного отбора пациентов [Irmejs et al., 2007].

Алгоритм исследования представлен на Рис. 2.

Феномен микросателлитной нестабильности (MSI-H) был выявлен в 177 из 2889 образцов опухолевой ткани (6%), включая 161 случай рака толстой кишки (РТК) и 16 случаев рака тела матки (РТМ). Отбор пациентов для дальнейшего исследования осуществлялся по следующим критериям:

- возраст манифестации ≤ 50 лет с наличием семейного анамнеза, отягощенного в отношении опухолей спектра синдрома Линча или без такового
- или возраст манифестации ≤ 60 лет в сочетании с наличием семейного анамнеза, отягощенного в отношении опухолей спектра синдрома Линча.
- наличие феномена микросателлитной нестабильности в опухолевой ткани.
- наличие образца лейкоцитарной ДНК.

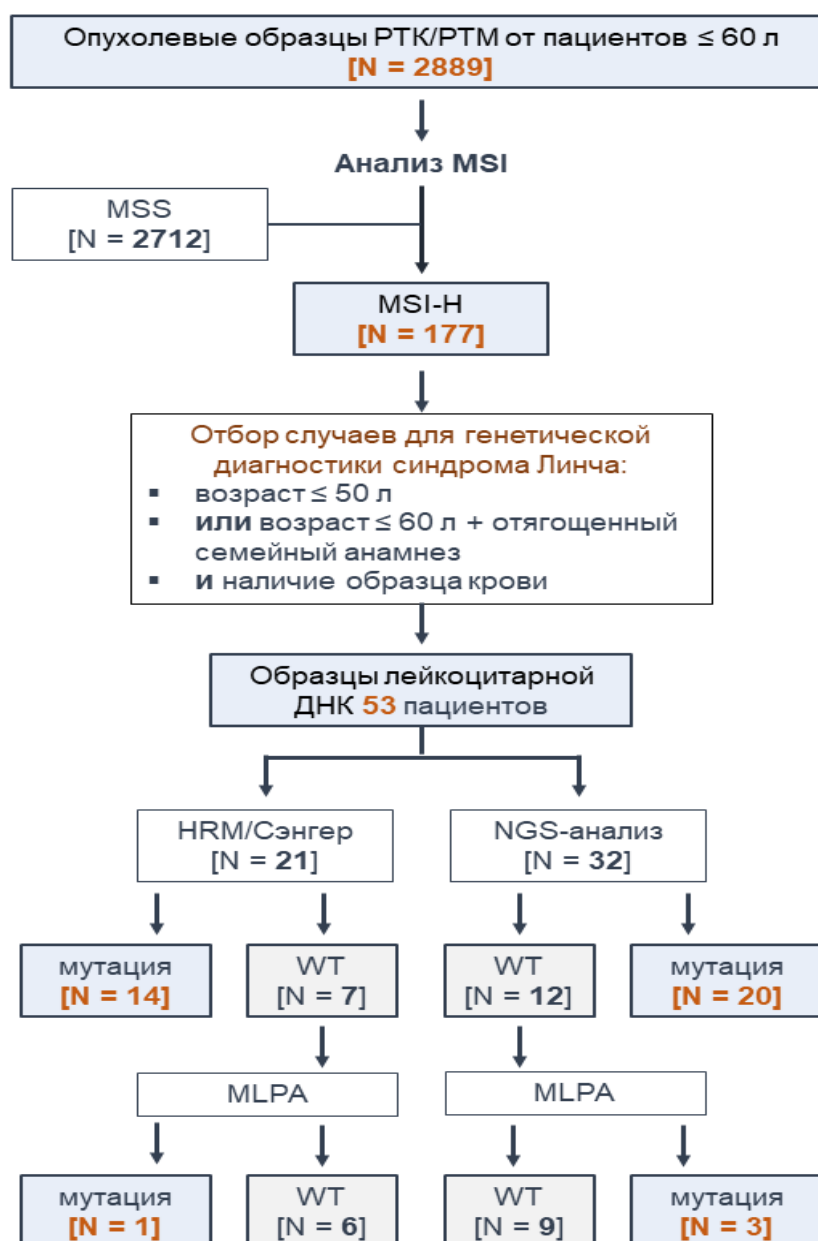


Рис.2. Алгоритм поиска мутаций у пациента с признаками синдрома Линча (СЛ)

Больные были условно разделены на две группы, в которых применялись разные алгоритмы ДНК-диагностики. В первую группу вошли пациенты (n = 21; 13 мужчин, 8 женщин) с раком толстой кишки (РТК), проходивших обследование в в 2013–2018 гг. Средний возраст больных составил 39.9 л (14–59 л). Группа включала 19 случаев РТК, и два случая первично-

множественного рака (сочетание РТК и астроцитомы, сочетание РТК и рака пищевода). Образцы лейкоцитарной ДНК этих пациентов исследовались на предмет наличия мутаций в генах mismatch-репарации (MMR) посредством комбинации секвенирования по Сэнгеру и MLPA.

Вторая группа включала 32 пациента (n = 32; 25 мужчин и 10 женщин); средний возраст составил 41.1 г (18–60 л). Среди них были больные РТК (n = 24) и раком тела матки (РТМ; n = 8), направленные с целью диагностики синдрома Линча в 2019–2022 гг. В этот период в качестве метода исследования было внедрено высокопроизводительное секвенирование с таргетным обогащением по последовательностям генов известных наследственных опухолевых синдромов.

Патогенные / вероятно патогенные варианты генов MMR были выявлены у 38 из 53 (72%) пациентов с подозрением на СЛ (Рис. 2).

Среди выявленных мутаций доминировали дефекты *MLH1*, которые были обнаружены у 21 из 38 пациентов (55%). (Рис.3). Процентный вклад различных генов MMR в целом соответствовал данным других исследований, проведенных с привлечением пациентов разных этнических групп [Lagerstedt-Robinson et al., 2016; Sunga et al., 2017; Alvarez et al., 2020].

При этом, аллель *MLH1* с.677G>T (p.Gln197Argfs*8) был обнаружен у двух неродственных индивидуумов. Большинство вариантов (12/21, 57%) представлены транкирующими мутациями (сдвиг рамки считывания, *de novo* стоп-кодона). 3 варианта представлены миссенс-мутациями, 3 – нарушениями сайтов сплайсинга; еще в 3х случаях дефект был представлен крупной делецией, выявленной MLPA.

Варианты *MSH2* составляли 34% случаев (13/38); при этом дважды выявлен известный вариант с.1906G>C (p.Ala636Pro), описанный у евреев - ашкенази. Большинство вариантов (7/13, 54%) представлены транкирующими мутациями (сдвиг рамки считывания, *de novo* стоп-кодона).

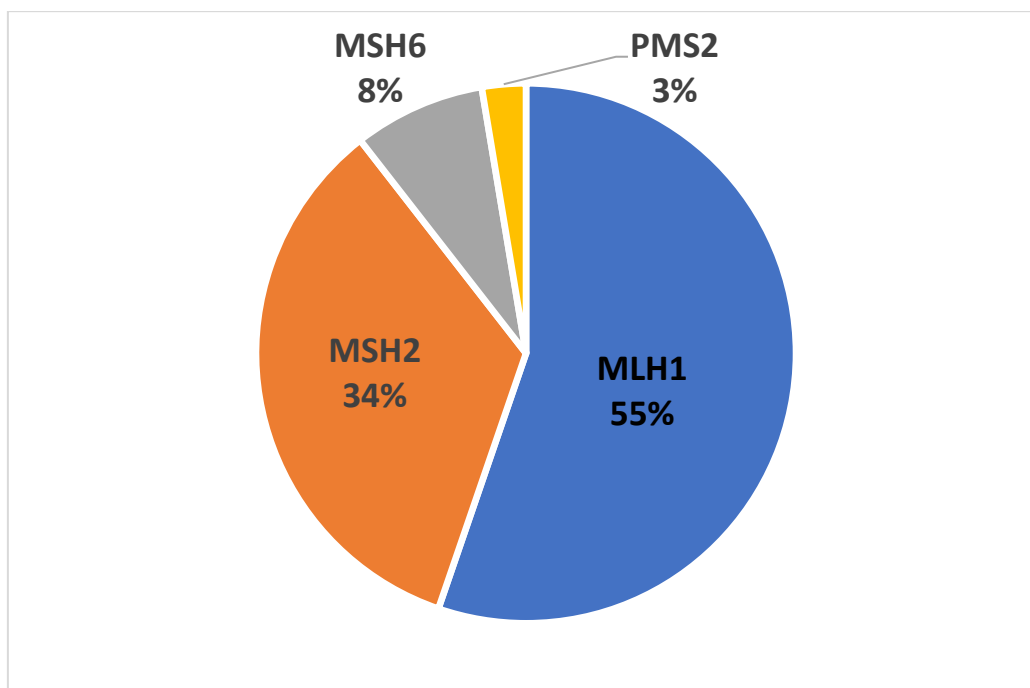


Рис.3. Процент мутаций в отдельных генах MMR

4 варианта (31%) представлены миссенс-мутациями; в одном случае выявлено нарушение сайта сплайсинга; еще у одного пациента дефект представлен крупной делецией, выявленной MLPA. Мутации *MSH6* были выявлены в 3/21 (8%); все варианты относятся к транскрибирующим; также обнаружен 1 патогенный вариант *PMS2* (миссенс-мутация).

Подробная информация об обнаруженных вариантах содержится в Табл.5.

Табл.5. Результаты анализа генов репарации неспаренных оснований (MMR) у пациентов с подозрением на синдром Линча

Пациент	Диагноз	Пол	Возраст	Семейный анамнез	Обнаруженная мутация
3	РТК	ж	31	Нет	<i>MLH1</i> c.677G>T (p.Q197Rfs*8)
5	РТК	м	45	Брат, мать, бабушка (со стороны отца): РТК Соответствует амстердамским критериям	<i>MLH1</i> c.1975C>T (p.R659*)
Fu 4279	РТК	м	47	Сестра: РТК (28 лет); отец: РТК (51 год); дедушка (со стороны отца): РТК (60 лет). Соответствует амстердамским критериям	<i>MLH1</i> c.2041G>A (p.A681T)
Fu 3818	ПМР: РТК, астроцит ома	м	14	Нет	<i>MLH1</i> c.1909delA (p.I637Lfs*6)
Fu 4554	РТК	ж	53	Сестра: РЯ (45 лет); отец: РТК (50 лет); дядя (со стороны матери): РТК (40 лет); двоюродный брат (со стороны матери, дяди): РТК (40 лет); тетя (со стороны матери): РТК (30 лет); двоюродный брат (со стороны матери, тети): РТК (51 год); бабушка (со стороны матери): РТК, РМЖ, РЯ (умерла в 50 лет) Соответствует амстердамским критериям	<i>MLH1</i> c.677G>T (p.Q197Rfs*8)
MG 426	РТК	м	28	Мать: РТК; бабушка: РТК Соответствует амстердамским критериям	<i>MLH1</i> c.2181_2182delCA p.(I728Sfs*4)
MG 459	РТК	м	40	Мать: РТК (50 лет)	<i>MLH1</i> : c.1-?_306+?del (del exon 1-3)

MG 510	РТК	м	42	Мать: РТК, рак пищевода; дядя (со стороны отца): РТК (17 лет); бабушка (со стороны отца): РТК; сестра бабушки (со стороны отца): РТК; бабушка (со стороны матери): гинекологические опухоли Соответствует амстердамским критериям	<i>MLH1</i> c.856delA (p.K286fs*)
BC 5031	РТК	ж	59	Мать: РТК; бабушка (со стороны отца): РТК; тетья (со стороны отца): РТК	<i>MLH1</i> c.350C>T (p.T117M)
MG2456	РТК	ж	40	Нет	<i>MLH1</i> c.1983_1984del (p.Thr662fs)
MG2365	РТК	м	35	Нет	<i>MLH1</i> c.676C>T (p.Arg226*)
MG2222	РТК	м	40	Нет	<i>MLH1</i> c.1649T>C (p.Leu550Pro)
MG2133	РТК	м	42	Нет	<i>MLH1</i> c.1559-1G>C
MG2142	РТК	м	22	Нет	<i>MLH1</i> c.1558+1G>A
MG2093	РТК	ж	38	Нет	<i>MLH1</i> c.187G>T (p.Asp63Tyr)
MG1771	РТК	ж	43	Нет	<i>MLH1</i> c.1598delG (p.Cys533fs)
MG1439	РТК	м	38	мать - РМЖ (>50), отец - РТК (42 г), сестра - РЖ (28 л)	<i>MLH1</i> c.243delC (p.Ile81fs)
MG1249	РТК	м	46	брат – рак поджелудочной железы (27 л), брат матери – рак прямой кишки (41 г)	<i>MLH1</i> c.885-1G>A
MG7460	РТК	м	29	отец - РТК (65 лет); дедушка (со стороны отца) – РЖ	<i>MLH1</i> c. 2103G>C (p.V664_Q701del)
MG2457	РТК	м	30	Нет	<i>MLH1</i> ex1-6del + del последних экзонов EPCAM
MG2326	РТК	м	41	Нет	<i>MLH1</i> ex5-9del

7	РТК	ж	32	Отец: РТК	<i>MSH2</i> c.2633_2634delAG (p.E878fs*)
11	РТК	м	36	Мать: РТК	<i>MSH2</i> c.415_416delAA (p.N139fs*)
Fu 2696	РТК	ж	42	Отец: РТК; тетья (со стороны матери): РТК и рак пищевода	<i>MSH2</i> c.1906G>C (p.A636P)
MG 588	РТК	ж	18	Мать: рак пищевода; дедушка (со стороны отца): РТК; бабушка (со стороны отца): РЯ, РМЖ Выполняются пересмотренные амстердамские критерии	<i>MSH2</i> c.1906G>C (p.A636P)
MG2523	РТК	м	32	нет	<i>MSH2</i> c.1906G>C (p.Ala636Pro)
MG1554	РТК	ж	18	сестры - РТК; бабушка (по матери) - РЯ, РМЖ; дед (по матери) – РТК	<i>MSH2</i> c.1906G>C (p.Ala636Pro)
MG2413	РТК	м	39	нет	<i>MSH2</i> c.1216C>T (p.Arg406*)
MG2154	РТК	м	28	нет	<i>MSH2</i> c.2086C>T (p.Pro696Ser)
MG1669	РТК	м	43	нет	<i>MSH2</i> c.792+1G>A
MG1433	РТК, РТМ	ж	39	нет	<i>MSH2</i> c.1619delT (p.Val540fs)

MG1537	PTM	ж	36	нет	<i>MSH2</i> c.2446C>T (p.Gln816*)
MG2226	PTM	ж	48	отец – РЖ, сестра – РТК	<i>MSH2</i> c.1418C>G (p.Ser473*)
MG1391	РТК	м	45	нет	<i>MSH2</i> ex12-14 del
MG 562	РТК	м	29	нет	<i>MSH6</i> c.2764C>T (p.R922*)
MG 571	ПМР: рак пищевода, РТК	ж	54	брат – РТК (56 лет)	<i>MSH6</i> c.3516_3517delAG (p.R1172Sfs*4)
MG2441	РТК	ж	41	нет	<i>MSH6</i> c.1853delT (p.Gln618fs)
MG868	PTM	ж	45	нет	<i>PMS2</i> c.A1G (p.Met1Val)

ПМР – первично-множественный рак; РЖ – рак желудка; РМЖ – рак молочной железы; РТК – рак толстой кишки; РЯ – рак яичников; N/A – анализ не проводился; WT – «дикий тип», мутации не обнаружены.

Большинство выявленных мутаций были ранее описаны в научной литературе, тогда как два варианта, *MSH2* с.415_416delAA (p.Asn139fs*) и *MSH6* с.3516_3517delAG (p.Arg1172Serfs*4), обнаружены впервые.

Также мы проанализировали 30 опухолей, принадлежащих к клиническому спектру СЛ и продемонстрировавших феномен MSI (MSI-H), на предмет наличия 5 повторяющихся патогенных вариантов. В перечень таких мутаций, в частности, вошли аллели *MLH1* с.677G>T (p.Gln197Argfs*8) и *MSH2* с.1906G>C (p.Ala636Pro), идентифицированные в настоящем исследовании. Кроме того, были протестированы мутации *MLH1* p.Ala681Thr и *MSH2* с.942 + 3A>T, описанные в качестве повторяющихся в Польше (Dymerska et al., 2010; Kurzawski et al., 2006). Наконец, учитывая географическую близость Санкт – Петербурга к Финляндии, мы включили в анализ финскую founder – мутацию - делецию экзона 16 гена *MLH1* [Nyström-Lahti et al., 1995].

Генотипирование этой группы больных (Табл.6) выявило один случай мутации *MLH1* p.Gln197Argfs*8 у пациента с двумя первично – множественными опухолями толстой кишки, диагностированными в возрасте 42 лет. Кроме того, выполняя секвенирование фрагмента, соответствующего аллелю *MSH2* с.1906G>C (p.Ala636Pro) у больной с аденокарциномой 12-перстной кишки, диагностированной в возрасте 30 лет, мы случайно идентифицировали в этом же ПЦР - фрагменте мутацию *MSH2* с.1861C>T (p.Arg621*).

Таким образом, стратегия анализа отдельных повторяющихся мутаций продемонстрировала низкую эффективность, позволив подтвердить диагноз синдрома Линча лишь в 1 из 30 (3,3%) MSI-позитивных опухолей.

Данные о патогенных вариантах были представлены в общедоступную базу LOVD Global Variome (<https://databases.lovd.nl/shared/genes/>).

Табл. 6. Мутации, выявленные при избирательном анализе повторяющихся вариантов

Пациент	Вид рака	Пол	Возраст	Семейный анамнез	Обнаруженная мутация	Примечание
Fu 9411	Первично-множественный РТК	м	42	Неизвестно	<i>MLH1</i> с.677G>T (p.Gln197Argfs*8)	
Fu 6719	Рак двенадцатиперстной кишки	м	30	Дядя (со стороны матери): рак желудка (40 лет); бабушка (со стороны матери): РТК	<i>MSH2</i> с.1861C>T (p.Arg621*)	Вариант выявлен случайно в ходе исследования <i>MSH2</i> с.1906G>C (p.A636P)

Ранее незарегистрированные варианты получили идентификационные номера MLH1_002108, MLH1_002109, MSH2_001833 и MSH6_001175.

Необходимо признать, что предварительный отбор вероятных мутаций с помощью HRM, несовершенен, т.к. его интерпретация имеет субъективный компонент. Кроме того, анализ гена *PMS2* технически затрудняется присутствием в геноме его псевдогенов [Gould et al., 2018]. Поэтому следует с осторожностью относиться к отрицательному результату анализа, особенно при наличии убедительных клинических признаков заболевания [Yohe and Thyagarajan, 2017].

Сравнение алгоритмов ДНК-анализа (комбинация секвенирования по Сэнгеру и MLPA и высокопроизводительное секвенирование с таргетным обогащением по последовательностям генов известных наследственных опухолевых синдромов и MLPA) показало практически идентичную частоту выявления мутаций: 15/21 (71%) и 23/32 (72%), соответственно (Рис. 2). Следует учесть, что первая группа состояла исключительно из больных РТК, тогда как вторая группа включала также нескольких пациенток с РТМ: при исключении последних, процент выявления мутаций с помощью NGS незначительно повышается (до 83%). С практической точки зрения, алгоритм, основанный на NGS, является значительно более быстрым и менее трудоемким по сравнению с индивидуальным анализом нескольких генов.

Процент выявления мутаций у пациентов с MSI-позитивными опухолями толстой кишки значительно выше по сравнению с аналогичным показателем MSI-позитивных карцином эндометрия; если в первых мутации обнаружены в 20/24 (83%) случаев, то во-вторых – лишь в 3/8 (38%) ($p = 0.023$). Это наблюдение, в целом, соответствует данным крупного мета-анализа, в котором наследственные мутации выявляются в 25-30% MSI-позитивных аденокарцином эндометрия [Ryan et al., 2019].

Частота выявления зависит от строгости критериев отбора образцов – например, от того, проводился ли предварительный анализ метилирования промотора *MLH1* – феномена, характерного для спорадических опухолей.

Стоит отметить, что в других исследованиях, посвященных молекулярной диагностике СЛ у российских пациентов, частота крупных делеций/дупликаций не исследовалась, в то время как наша работа свидетельствует, что подобный тип повреждений может составлять до 11% выявленных молекулярных дефектов.

Мутация *MLH1* p.Gln197Argfs*8 была обнаружена у трех неродственных пациентов. Известно, что этот аллель часто встречается в Польше (3 из 78 зарегистрированных случаев) [Kurzawski et al., 2006] и Словакии (2 из 11 случаев) [Zavodna et al., 2006].

Другой повторяющийся вариант, *MSH2* p.Ala636Pro, является founder - мутацией евреев – ашкенази; анализ гаплотипов показал, что все носители этого аллеля имеют общего предка [Foulkes et al., 2002; Goldberg et al., 2015]. Выявление данного варианта у людей без явного еврейского происхождения не вызывает удивления, учитывая, что в странах Восточной Европы исторически проживала значительная доля еврейского населения. Хорошим примером служит аллель *BRCA1* c.5382insC, ассоциированный с развитием наследственного рака молочной железы и яичников. Первоначально он был описан как «еврейская» мутация, однако впоследствии оказался распространенным почти исключительно среди славянских пациентов [Gorodnova et al., 2015; Sokolenko et al., 2006]; существуют убедительные доказательства того, что носители этой мутации произошли от единственного общего предка нееврейского происхождения [Hamel et al., 2011].

Данные о происхождении мутаций, предрасполагающих к СЛ, могут быть значимыми с практической точки зрения, поскольку позволяют установить, должен ли скрининг на конкретный аллель быть ограничен какой-либо этнической группой или может применяться к более широкой популяции.

Например, мутация *MSH2* с.942+3A>T, которая часто обнаруживается в славянских и некоторых других популяциях, вероятно, является «горячей точкой» (hotspot), поскольку носители этого варианта характеризуются разнообразием гаплотипов [Desai et al., 2000; Froggatt et al., 1999; Kurzawski et al., 2006]. Тем не менее, некоторые географические и этнические различия в отношении частоты этой и других мутаций в «горячих точках» также могут иметь место: СЛ обычно манифестирует после пика репродуктивной активности, поэтому влияние отрицательного отбора выражено недостаточно сильно. Следовательно, даже такие мутации могут быть представлены с необычно высокой частотой в определенных географических регионах. В частности, аллель *MSH2* с.1861C>T, согласно данным крупных исследований и интернет-регистров, более распространён среди русских и других славян [Dymerska et al., 2014; Fokkema et al., 2011; Lagerstedt-Robinson et al., 2016]. Аналогичная, хотя и менее выраженная тенденция наблюдается для аллеля *MLH1* с.350C>T [Fokkema et al., 2011; Grandval et al., 2013; Lagerstedt-Robinson et al., 2016]. В целом, восточноевропейские и евразийские славяне, проживающие на территории от Балтийского моря до Тихого океана и включающие около 240 миллионов субъектов русского, украинского, белорусского и польского происхождения, имеют явно более высокую пропорцию повторяющихся мутаций по сравнению с другими европейскими народами. Возможной причиной такой генетической однородности могли быть существовавшие в прошлом культурные особенности, препятствующие межэтническим бракам.

Помимо аллелей, идентифицированных в качестве повторяющихся в настоящем исследовании, еще несколько рекуррентных вариантов заслуживают внимания. В частности, *MLH1* с.350C>T (p.Thr117Met), *MLH1* с.677G>T (p.Arg182Serfs*6), *MLH1* с.1852_1854del (p.Lys618del), *MLH1* с.2041G>A (p.Ala681Thr), *MSH2* с.942+3A>T (p.Val265_Gln314del), *MSH2* с.1861C>T (p.Arg621*) и *MSH2* с.1968C>A (p.Tyr656*) неоднократно

наблюдались у пациентов из России, Польши и Словакии, т.е., могут рассматриваться как славянские.

В настоящее время, помимо настоящего исследования [Yanus et al., 2020] опубликованы еще несколько работ, посвященных анализу мутаций генов репарации неспаренных оснований (MMR) у российских больных СЛ [Maliaka et al., 1996; Moliaka et al., 1997; Цуканов и соавт., 2017; Шелыгин и соавт., 2021], самая масштабная из которых [Шелыгин и соавт., 2021] включает пациентов из 60 семей. Большинство повторяющихся вариантов, обнаруженных у российских пациентов с СЛ, приходится на славянские аллели *MLH1* с.350C>T (p.Thr117Met), *MLH1* с.1852_1854del (p.Lys618del) и *MSH2* с.942+3A>T. Вероятно, панель частых наследственных мутаций, требующих первоочередного тестирования у российских пациентов, в целом должна включать 6 аллелей *MLH1* и 7 - *MSH2* (Табл. 7).

Совокупность данных свидетельствует, что эффект основателя в отношении СЛ в России менее выражен, чем в случае наследственного рака молочной железы и яичников. С практической точки зрения это свидетельствует о низкой эффективности тестирования отдельных генетических вариантов.

Табл.7. Повторяющиеся патогенные варианты, описанные у российских пациентов с СЛ

	Мутация	Описания у российских пациентов	Комментарии, описание в других славянских странах
MLH1	c.298C>T (p.Arg100*)	[Цуканов и соавт., 2017; Шельгин и соавт., 2021]	
	c.306+5G>A	[Шельгин и соавт., 2021]	
	c.350C>T (p.Thr117Met)	[Цуканов и соавт., 2017; Шельгин и соавт., 2021; Yanus et al., 2019]	Мутация зарегистрирована в польской [Kurzawski et al., 2006] и молдавской семьях [Maliaka et al., 1996]
	c.677G>T (p.Gln197Argfs*8)	[Цуканов и соавт., 2017; Шельгин и соавт., 2021; Yanus et al., 2019]	Мутация зарегистрирована в польской [Kurzawski et al., 2006], молдавской [Maliaka et al., 1996], словацкой [Zavodna et al., 2006] и венгерской семьях [Papp et al., 2007]. У поляков - это умеренно распространенная повторяющаяся мутация (3/78); распространена среди словацких (2/11) пациентов [Kurzawski et al., 2006; Zavodna et al., 2006]
	c.792+1G>A	[Шельгин и соавт., 2021]; настоящее исследование	
	c.1852_1854del (p.Lys618del)	[Maliaka et al., 1997; Цуканов и соавт., 2017; Yanus et al., 2019; Шельгин и соавт., 2021]	Мутация обнаружена в польской семье [Kurzawski et al., 2006]
MSH2	c.1861C>T (p.Arg621*)	[Maliaka et al., 1997; Yanus et al., 2019; Шельгин и соавт., 2021]	О мутации сообщалось в Словакии [Zavodna et al., 2006] и Венгрии [Papp et al., 2007]. Значительная часть современного венгерского населения имеет славянское происхождение [Malyarchuk et al., 2018]
	c.942+3A>T (p.Val265_Gln314del)	[Цуканов и соавт., 2017; Yanus et al., 2019; Шельгин и соавт., 2021]	Главная повторяющаяся мутация в Польше и странах Балтии [Kurzawski et al., 2006, Dymerska et al., 2014]. Известная "горячая точка" для мутаций de novo [Desai et al., 2000]

c.989T>C (p.Leu330Pro)	[Цуканов и соавт., 2017; Шельгин и соавт., 2021]	
c.1288A>T (p.Lys430*)	[Цуканов и соавт., 2017; Шельгин и соавт., 2021]	
c.1386+1G>T	[Шельгин и соавт., 2021]	
c.1906G>C (p.Ala636Pro)	[Yanus et al., 2019]; настоящее исследование	Главная founder-мутация у евреев-ашкенази [Greenwood et al., 2010]
c.2086C>T (p.Pro696Ser)	[Цуканов и соавт., 2017; Шельгин и соавт., 2021]; настоящее исследование	

3.2. Пациенты с синдромом Пейтца-Егерса

Комбинация секвенирования по Сэнгеру и MLPA позволила выявить патогенные/вероятно патогенные варианты *STK11* у 8 из 10 пациентов (80%) с подозрением на синдром Пейтца-Егерса (Табл. 8), что очень сходно с данными, полученными другими исследователями [Volikos et al., 2006; Jiang et al., 2018].

Табл. 8. Обнаруженные патогенные/вероятно патогенные варианты *STK11*

ID	Возраст, лет	Пол	Локализация полипов	Вариант <i>STK11</i> (транскрипт NM_000455)
2272	11	м	Толст кишка	c.989_990insCCGGTGG (p.R333Pfs*28)
1696	22	м	Толст. кишка	c.923G>A (p.W308*) rs864622488
1863	32	ж	Тонкая кишка	Ex.1 del
898	11	ж	Желудок	c.180C>G (p.Y60*)
529	27	м	Толстая, прямая	c.559_583delGGTGGCACCCCTCAAATCTCCGACC (p.G187Wfs*92)
2104	22	ж	Желудок, двенадцатиперстная кишка	Ex1-10 del
789	36	м	Прямая кишка	c.1153_1154insT (p.G385fs)
2277	36	ж	Желудок, тонкая и толстая кишка	c.345_346del (p.L117Ifs*44)

Высокая частота выявления мутаций свидетельствует о достаточно надежных клинико-морфологических признаках заболевания. Все пациенты с мутациями имели характерные меланоцитарные макулы на в периоральной

области или на слизистой губ; все пациенты также имели характерную гамартomную морфологию полипов. При этом три мутации: с.989_990ins (p.R333Pfs*28), с.559_583del (p.G187Wfs*92) и с.345_346del (p.L117Ifs*44), описаны впервые. У двух из 8 пациентов (25%) молекулярно-генетические повреждения представлены крупными перестройками – делециями 1 экзона *STK11* или всего гена. Это подтверждает необходимость включения метода MLPA в алгоритм ДНК-диагностики синдрома Пейтца-Егерса. Сравнение полученных данных с результатами других исследований, посвященных российским пациентам [Шелыгин и соавт., 2016; Цуканов и соавт., 2017; Янова и соавт., 2022], свидетельствует о том, что практически в каждом случае причиной заболевания является уникальная мутация. Единственным исключением служит крупная делеция 1-го экзона, отмеченная в одной из отечественных работ [Янова и соавт., 2022]. По видимому, это генетическое повреждение не является уникальным для российских больных [Ngeow et al., 2013; Vannon et al., 2018].

Редкость повторяющихся патогенных аллелей *STK11* свидетельствует о необходимости секвенирования всей последовательности гена. Благодаря относительно небольшим размерам *STK11* (9 кодирующих экзонов), секвенирование по Сэнгеру остается актуальным методом диагностики.

3.3. Идентификация гена *VLM* в качестве генетической детерминанты риска РМЖ

Для поиска новых генов предрасположенности к раку молочной железы (РМЖ) применялся так называемый «кандидатный» подход. Была выдвинута гипотеза, что генетические детерминанты риска РМЖ должны быть функционально вовлечены в процесс ответа на повреждение ДНК. В рамках этой гипотезы группа «генетически обогащенных» случаев РМЖ (n = 95)

проанализирована на наличие редких вариантов генов *TP53*, *PALB2*, *BRIP1*, *BLM*, *FANCC*, *MRE11A*, *RAD51C*, *BARD1*, *BRD7*, *CHEK1*, *DDB2*, *ERCC1*, *EXO1*, *FANCG*, *PARP1*, *PARP2*, *RAD51*, *RNF8*, *WRN*, приводящих к преждевременной терминации синтеза соответствующего белка. С помощью такого подхода удалось выявить двух носительниц гетерозиготной инактивирующей мутации с.1642C>T (p.Q548*) в гене *BLM*. (Рис.4). Данное повреждение ранее описано в реестре больных синдромом Блума, однако сведения о его этническом происхождении отсутствовали.

У одной из пациенток дополнительно (в цис-положении) наблюдался еще один вариант *BLM*, с.2119C>T. Теоретически это событие ведет к аминокислотной замене p.P707S; однако, учитывая, что с.2119C>T расположен ближе к 3' - концу по отношению к нонсенс-мутации (с.1642C>T), фактически этого не происходит.

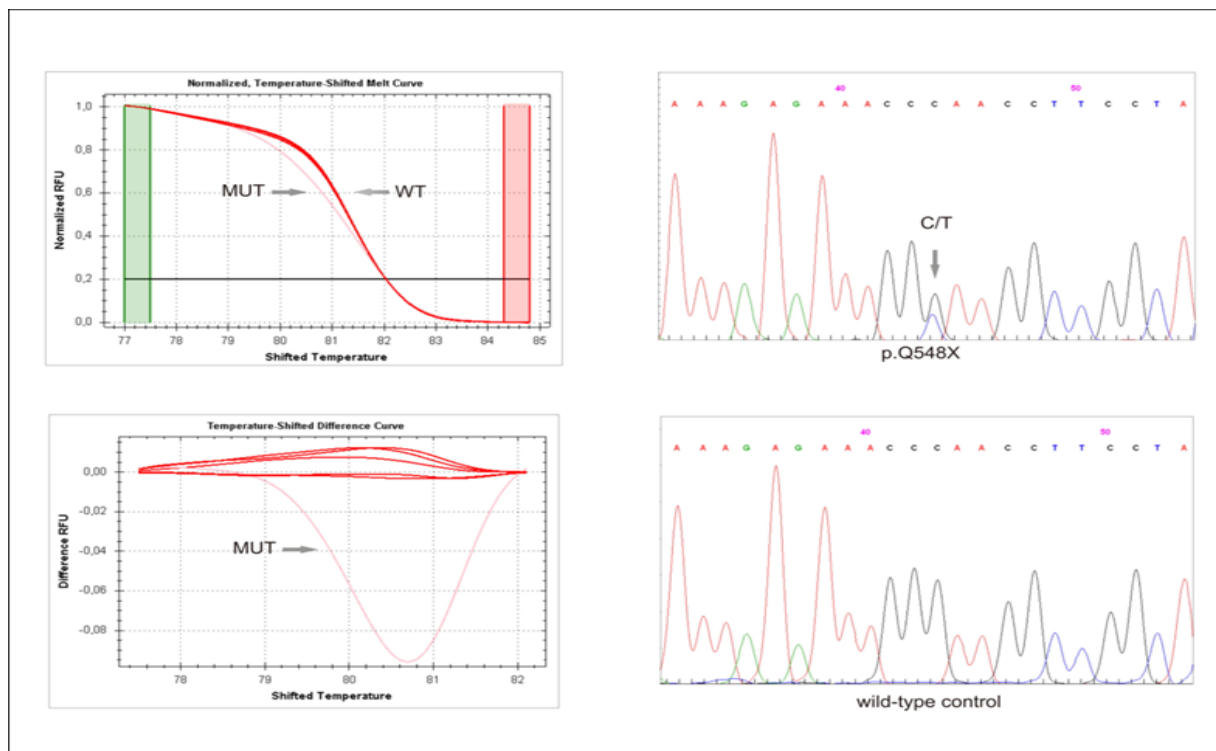


Рис.4. Мутация *BLM* с.1642C>T (p.Q548*), идентифицированная с помощью высокоточного анализа плавления и секвенирования по Сэнгеру.

Еще одна пациентка с РМЖ была гетерозиготной по ранее неизвестному миссенс-варианту, с.3416G>C (p.R1139P). Потенциальный эффект этого события был оценен с помощью общедоступных программных средств (PANTHER: <http://www.pantherdb.org/tools/csnpscore.do>; Pmut: <http://mmb.pcb.ub.es/PMut/>; PolyPhen: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>); все упомянутые предиктивные алгоритмы свидетельствуют в пользу функционального значения этого SNP. Сведения о других SNP, идентифицированных при секвенировании гена *BLM*, с.1722A>G (p.L574L, rs28385011, 2/95 (2%)), с.3531C>A (p.A1177A, rs2227934, 1/95 (1%)), с.3102G>A (p.T1034T, rs2227933, 24/95 (25%)) и с.2603C>T (p.P868L, rs11852361, 8/95 (9%)), содержатся в базе данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>).

Исследование всех доступных пациенток с РМЖ позволило выявить аллель p.Q548* в 17/1498 (1.1%) случаях; для сравнения, только 2/1093 (0.2%) здоровых женщин имели этот генетический дефект ($p = 0.005$) (Табл. 9). Соотношение шансов (OR), рассчитанное на основе сравнения последовательных случаев РМЖ (10/879 (1.1%)) и здоровых женщин, достигало 6.28 (95% доверительный интервал 1.52 – 42.18).

Генотипирование других групп выявило аллель *BLM* p.Q548* у 1/339 (0,3%) пациентов с раком легких, у 1/199 (0,5%) больных раком яичников и у 3/1091 (0,3%) здоровых мужчин.

Распределение гетерозигот p.Q548* в различных подгруппах пациенток свидетельствует в пользу участия этого аллеля в формировании генетической предрасположенности к РМЖ. Носители мутаций чаще встречались среди пациенток, сообщивших о семейном анамнезе РМЖ (6/251 (2.4%) против 11/1247 (0.9%), $p = 0.05$, в случаях с ранним дебютом заболевания (12/762 (1.6%) против 5/736 (0.7%), $p = 0.14$) и среди женщин с билатеральным поражением молочных желез (2/122 (1.6%) против 15/1376 (1.1%), $p = 0.64$) (Табл. 9).

Табл. 9. Частота носителей мутаций *BLM* p.Q548* у больных злокачественными опухолями и здоровых индивидуумов

Группа	<i>Носители мутации BLM p.Q548*</i>
РМЖ	17/1498 (1.1%)
Билатеральный РМЖ	2/122 (1.6%)
Монолатеральный РМЖ	15/1376 (1.1%)
Возраст на момент диагноза*	
≤50 лет	12/762 (1.6%)
≥51 года	5/736 (0.7%)
Семейный анамнез	
Позитивный	6/251 (2.4%)
Негативный	11/1247 (0.9%)
Признаки наследственного РМЖ	
Семейный анамнез или билатеральное поражение или ранее начало	14/924 (1.5%)
Отсутствуют	3/574 (0.5%)
Принцип отбора пациентов	
Последовательный	10/879 (1.1%)
Генетическое консультирование	5/451 (1.1%)
Случайный	2/168 (1.2%)
Здоровые индивидуумы	
Женщины	2/1093 (0.2%)
Мужчины	3/1091 (0.3%)
Рак яичников	1/199 (0.5%)
Рак легких	1/339 (0.3%)

*для билатерального РМЖ – возраст на момент диагноза первой опухоли

Генетический материал от родственницы, пораженной РМЖ, был доступен для одной носительницы мутации *BLM* (BC1158, Табл. 10); генотипирование показало, что мать пациентки также была гетерозиготной по аллелю p.Q548*.

1129 из 1498 пациентов, включенных в исследование, были протестированы на наличие инактивирующих наследственных мутаций *BRCA1* с помощью тестирования founder – вариантов (n = 949) или секвенирования всего гена (n = 180); у 69 пациенток выявлено наличие мутации *BRCA1*, причем одна из них оказалась обладателем компаунд-гетерозиготы.

Клинико-морфологические особенности *BLM*-ассоциированных РМЖ.

У пациентов с мутацией p.Q548* наблюдалась обычное распределение по стадиям TNM и степени злокачественности. Данные иммуногистохимии были доступны для 18 карцином (Табл. 10). Экспрессия рецепторов стероидных гормонов обнаружена в 13/18 (72%) случаях; большинство из этих опухолей не экспрессировали базальные маркеры или значимые количества HER2 и, следовательно, принадлежали к люминальному А подтипу экспрессии (Luminal A). 5/18 (28%) образцов РМЖ демонстрировали базально-подобные (Basal-like) паттерны экспрессии; одна из этих опухолей принадлежала носительнице сочетания мутаций *BRCA1* и *BLM*. 5 женщин прошли курс неoadьювантной терапии и, следовательно, имели информацию о химиочувствительности опухоли: у трех из них наблюдался практически полный патологический ответ, а у двух - частичный клинический ответ.

Соматическая утрата оставшегося аллеля традиционно рассматривается как канонический механизм опухолеспецифической инактивации генов наследственного рака [Beristain et al., 2010]. 10 образцов опухолей после

микродиссекции были успешно проанализированы на предмет потери гетерозиготности локуса *BLM*, и ни один из них не содержал делецию аллеля *BLM*.

Ранее продемонстрировано, что некоторые опухоли, возникающие у пациентов с синдромом Блума, имеют микросателлитную нестабильность (MSI) [Kaneko et al., 1996]. Кодированная область гена *BLM* содержит нуклеотидный трек poly(A)₉, размер которого часто меняется в опухолях с феноменом микросателлитной нестабильности [Calin et al., 1998]. Секвенирование 12 образцов ДНК, полученных из опухолей, развившихся у носителей мутации *BLM*, не выявило изменений поли(А) - трека. Кроме того, мы использовали квазимономорфный маркер BAT26 для оценки состояния микросателлитов в 14 *BLM* - ассоциированных карциномах, и не обнаружили ни одного случая MSI.

Настоящее исследование продемонстрировало избыток наследственных мутаций *BLM* у пациенток с раком молочной железы по сравнению с группой здоровых женщин (Табл. 11). Кроме того, *BLM*-гетерозиготность имела тенденцию к большему распространению в случаях РМЖ, характеризующихся клиническими признаками наследственного заболевания, такими как семейный анамнез, раннее начало и двусторонность заболевания (Табл. 9), хотя полученные значения недостаточны для надежной оценки.

Табл. 10. Клинические характеристики РМЖ у носителей мутации *BLM*

Пациент	Диагноз	Возраст на момент постановки диагноза	Семейный анамнез	TNM	Люминальные маркеры	HER2	Базальные маркеры	Экспрессионный подтип	Степень злокачественности	ДНК-анализ опухоли	Примечания
BC666	РМЖ	49	Мать, сестра - РМЖ	T1N0 M0	нд	нд	нд	нд	нд	нд	
BC668	РМЖ	50	Мать - РМЖ	T1N0 M0	ER+, PR+	0	CK5/6-, EGFR-	Luminal A	2	MSS, интактный (A9) повтор, отсутствие LOH в локусе BLM	
BC819	РМЖ	46	Не отягощен	T1N1 Mx	ER+, PR+	0	CK5/6-, EGFR-	Luminal A	1	MSS, интактный (A9) повтор, отсутствие LOH в локусе BLM	

BC828	PMЖ	51	Мать – ХЛЛ	T2N0 M0	ER+, PR+	1+	нд	Luminal A	2	MSS	
BC960	PMЖ, РЯ	68	Сестра - PMЖ	T2N0 M0	ER-, PR-	0	CK5/6+, EGFR+	Basal-like	2	MSS, MSS, интактный (A9) повтор, отсутствие LOH в локусе BLM и BRCA1	Носитель мутации BRCA1 5382insC
BC1008	Метахро- нный билатера- льный PMЖ, базалио- ма	47	Мать – РЖ	нд	ER+, PR+	0	CK5/6+, EGFR-	Luminal A или гетерогенный	нд	MSS, отсутствие LOH в локусе BLM	
		57		T2N0 M0	ER+, PR+	0	CK5/6-, EGFR-	Luminal A	3	нд	
BC1158	PMЖ	36	Мать - PMЖ	T1N1 M0	ER+, PR+	1+	CK5/6-, EGFR-	Luminal A	2	MSS, интактный (A9) повтор, отсутствие LOH в локусе BLM	Мать – носитель ица <i>BLM</i> p.Q548*

BC1166	Синхронный билатеральный РМЖ, базалиома, иммунобластная лимфома	77	Не отягощен	T1N0 M0	ER+, PR+	0	CK5/6-, EGFR-	Luminal A	1	MSS, интактный (A9) повтор, отсутствие LOH в локусе BLM	
		77		T1N0 M0	ER+, PR+	0	CK5/6-, EGFR-	Luminal A	1	MSS, интактный (A9) повтор, отсутствие LOH в локусе BLM	
BC1444	РМЖ, болезнь Вальденстрёма	67	Мать – РЖ, отец – РЛ, тетя по отцу - РМЖ	T2N0 M0	ER-, PR-	1+	CK5/6+, EGFR+	Basal-like	3	MSS, интактный (A9) повтор	
BC1526	РМЖ	43	Не отягощен	T2N0 Mx	ER+, PR+	2+	CK5/6-, EGFR-	Luminal A	1	MSS, интактный (A9) повтор, отсутствие LOH в BLM	

BC1627	PMЖ	48	He отягощен	T1N1 M0	ER-, PR-	0	CK5/6-, EGFR+	Basal-like	3	MSS, интактный (A9) повтор	Частичны й ответ после 6 циклов неoadъюв антной схемы AT
BC1646	PMЖ	52	He отягощен	T1N0 M0	ER+, PR+	1+	CK5/6-, EGFR-	Luminal A	нд	MSS, интактный (A9) повтор, отсутствие LOH в локусе BLM	Полный патологич еский ответ после 6 циклов неoadъюв антной схемы AT

BC1660	PMЖ	41	Сестра - PMЖ	T1N1 M0	ER-, PR-	0	CK5/6+, EGFR+	Basal-like	нд	MSS, интактный (A9) повтор, отсутствие LOH в локусе BLM	Практичес кий полный патологич еский ответ после 4 циклов неoadъюв антной схемы TAC и лучевой терапии
BC1672	PMЖ	48	Бабушка – РТК	T2N0 Mx	ER-, PR+	3+	CK5/6-, EGFR-	HER2-like или luminal B	2	MSS, интактный (A9) повтор	

BC1730	PMЖ	37	Двоюродная сестра по матери – PMЖ, двоюродная сестра по отцу – PMЖ	T2N2 Mx	ER+, PR+	0	nd	Luminal A	2	нд	
BC1841	PMЖ	43	Бабушка по отцу – РЖ	T3N1 M0	ER+, PR+	1+	nd	Luminal A	1	нд	Частичный опухолевый ответ после 4 циклов неoadъювантной схемы FEC

BC1983	PMЖ	49	Мать - PMЖ	T3N1 M0	ER-,PR-	0	нд	Basal-like (?)	нд	нд	Практичес кий полный патологич еский ответ после 4 циклов неoadъюв антной схемы FAC и лучевой терапии
--------	-----	----	---------------	------------	---------	---	----	----------------	----	----	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

AT: антрациклины + таксаны; PЖ – рак желудка; PЛ – рак легких; PTK – рак толстой кишки; FAC: 5-фторурацил + антрациклины + циклофосфамид; FEC: 5-фторурацил + эпирубицин + циклофосфамид; MSS: отсутствие микросателлитной нестабильности; TAC: таксаны + антрациклины + циклофосфамид; нд – нет данных

Связь мутаций *BLM* с предрасположенностью к РМЖ была позже независимо подтверждена с помощью экзомного секвенирования, а также исследований «случай-контроль» [Prokofyeva et al., 2013; Thompson et al., 2012].

Ограничением настоящего исследования является использование госпитальной выборки случаев РМЖ. Дело в том, что НМИЦ онкологии им. Петрова является клиникой, специализирующейся на ведении больных с наследственными формами рака, поэтому может иметь место необычно частое направление пациентов с семейным РМЖ и / или ранним началом и / или билатеральным РМЖ даже в ходе последовательного набора больных. Следовательно, показатели риска $OR = 6.28$ (95% ДИ: 1,52 - 42,18), рассчитанные в этом исследовании для носителей аллеля p.Q548* (Табл. 11), вероятно, являются несколько завышенными, что косвенно подтверждается результатами исследования, проведенного в Новосибирске [Anisimenko et al., 2014].

Табл. 11. Гетерозиготные мутации *BLM* у больных РМЖ и здоровых доноров.

Исследование	РМЖ	Здоровые доноры	OR (95% CI)	<i>p</i>
Gruber et al., 2002	5/375 (1.3%)	14/1839 (0.8%)	1.76 (0.55 – 5.27)	0.274
Cleary et al., 2003	4/294 (1.4%)	8/944 (0.8%)	1.61 (0.41 – 5.94)	0.433
Настоящее исследование*	10/879 (1.1%)	2/1093 (0.2%)	6.28 (1.52 – 42.18)	0.007
Mantel-Haenzel метаанализ			2.49 (1.29 – 4.78)	0.006

*только последовательно набранные случаи РМЖ использовались для подсчета величины OR

В двух более ранних исследованиях, сравнивающих частоту мутаций *BLM* у пациентов с РМЖ и в контрольной группе, наблюдалась тенденция к связи между гетерозиготностью *BLM* и риском заболевания (Табл. 11); однако, в

этих работах не оценивались связи между статусом *BLM* и клиническими характеристиками РМЖ [Cleary et al., 2003; Goss et al., 2002].

Карциномы молочной железы, ассоциированные с дефектом *BLM*, не демонстрировали потерь гетерозиготности (LOH) локуса *BLM*. Ранние исследования описывали потерю аллеля дикого типа в качестве особенности опухолей, связанных с наследственными мутациями *BRCA1/2* [Collins et al., 1995; Neuhausen and Marshall, 1994], хотя некоторые относительно недавние работы подвергают роль соматических LOH в патогенезе этой разновидности РМЖ сомнению [Beristain et al., 2010; King et al., 2007].

Потеря нормального аллеля также нехарактерна для опухолей молочной железы, возникающих у носителей мутаций *CHEK2*, *NBS1* и *RAD50* [Buslov et al., 2005; Heikkinen et al., 2003; Sodha et al., 2002]; до настоящего времени существуют противоречивые данные о статусе LOH при *PALB2*-ассоциированном РМЖ [Casadei et al., 2011; Tischkowitz et al., 2007]. По всей видимости, имеют место другие механизмы соматической инактивации этих генов; возможно, системная гаплонедостаточность, вызванная уменьшением «дозы гена», способствует накоплению опухолеспецифических онкогенных мутаций [Dumon-Jones et al., 2003; Goss et al., 2002; Jekimovs et al., 2005; Santarosa and Ashworth, 2004].

Наблюдение об отсутствии потерь гетерозиготности в *BLM* – ассоциированных опухолях представляется очень важным с практической точки зрения. Соматическая инактивация оставшегося аллеля является характерной особенностью новообразований, возникающих у носителей мутаций *BRCA1* и *BRCA2*, что определяет их беспрецедентную чувствительность к некоторым ДНК-повреждающим агентам. Редкость инактивации нормальной копии гена в *BLM*-ассоциированных РМЖ демонстрирует их существенное биологическое отличие от рака, связанного с мутациями *BRCA1/2*, и, по - видимому, делает их малоперспективными для клинических испытаний препаратов платины и PARP ингибиторов.

В ходе исследования была выявлена одна больная с сочетанием гетерозиготных мутаций *BLM* и *BRCA1* (BC960, Табл. 10). Примечательно, что опухолевая ткань этой пациентки сохраняла гетерозиготность как в локусе *BRCA1*, так и *BLM*; её принадлежность к базальному экспрессионному типу скорее свидетельствует в пользу доминирующей роли *BRCA1* в развитии новообразования. Комбинация гетерозигот, включающая инактивацию зародышевой линии *BRCA1*, неоднократно описывалась для носителей мутации *BRCA2*, *CHEK2*, *NBS1* и *BLM* [Koren-Michowitz et al., 2005; Leegte et al., 2005; Porhanova et al., 2008].

3.3. Исследование пациентов с туберозным склерозом (ТС)

Мутации *TSC1/2* были выявлены у 53 из 61 пациентов пациенты с клиническими признаками туберозного склероза (87%), что хорошо соответствует данным большинства подобных исследований [Au et al., 2007; Dabora et al., 2002; van Eeghen et al., 2012; Jones et al., 1999]. Относительно невысокий процент выявленных мутаций (46%) в одной из российских работ [Аношкин и соавт., 2018] вероятно может быть объяснен недостаточно жесткими критериями отбора пациентов, что подчеркивает целесообразность следования современным рекомендациям по клинической диагностике [Northrup et al., 2013]. В то же время, самое крупное на сегодняшний день исследование российских пациентов с ТС [Аношкин и др., 2020] позволило добиться обнаружения мутаций в 96.5% случаев. Столь высокая эффективность молекулярной диагностики, по-видимому, связана с применением высокопроизводительного секвенирования, что позволило выявить мозаичные мутации у 6% обследованных, причем минимальная представленность патогенного аллеля составила 0.6%. В нашем исследовании базовым методом служило секвенирование по Сэнгеру, порогом возможности

которого является 20% представленность альтернативного варианта [Brewer и др., 2020], чем и объясняется более низкий процент выявления мутаций.

Дефекты *TSC2* обнаруживались значительно чаще, чем мутации *TSC1*; наблюдаемое соотношение мутаций *TSC2/TSC1* 70:30% отмечено и в другой работе, посвященной исследованию российских пациентов [Аношкин и соавт., 2018].

В соответствии с литературными данными [Au et al., 2007; Dabora et al., 2002; Niida et al., 1999; Sancak et al., 2005] повреждения *TSC1* и *TSC2* сильно различаются по спектру мутаций: если дефекты *TSC1* представлены исключительно транкирующими мутациями (*de novo* стоп-кодоны, сдвиг рамки считывания), то в *TSC2* наблюдается значительно большее разнообразие генетических повреждений (Табл. 12).

Табл.12. Типы мутаций, выявленные в генах туберозного склероза

Тип мутации	<i>TSC1</i>	<i>TSC2</i>
Нонсенс	8 (57%)	6 (15%)
Сдвиг рамки считывания	6 (43%)	8 (20%)
Делеция без сдвига рамки	0	1 (3%)
Нарушение сайта сплайсинга	0	9 (23%)
Миссенс-мутация	0	9 (23%)
Крупные делеции/дупликации	0	6 (15%)
	14 (100%)	39 (100%)

Необходимо отметить значительный вклад масштабных перестроек в общую структуру мутаций *TSC2*: на крупные делеции/дупликации приходится 15% от всех повреждений гена *TSC2* и 11% от общего числа мутаций *TSC1/2*. Таким образом, 10% пациентов с ТС имеют подобные дефекты, что заметно выше, чем в других исследованиях [Kozlowski et al., 2007; Rendtorff et al.,

2005]; в то же время, в работах российских авторов [Аношкин и др., 2018; Аношкин и др., 2020] отмечена сходная (7-9%) частота протяженных делеций.

Комбинация секвенирования по Сэнгеру и MLPA позволила выявить патогенные мутации у 52 из 61 пациентов. Кроме того, в одном из 5 образцов, проанализированных полноэкзомным секвенированием, была идентифицирована ранее пропущенная мутация *TSC2*. Повторная оценка исходного протокола высокоточного плавления фрагментов ПЦР (HRM) показала, что это была ошибка, связанная с человеческим фактором. Примеры того, что полноэкзомное секвенирование даёт возможность обнаружить дефекты *TSC1/2*, пропущенные в ходе стандартного генетического анализа, ранее описаны в литературе [Qin et al ., 2010].

Клинические и молекулярно-генетические характеристики пациентов с выявленными мутациями представлены в Табл.13.

Табл.13. Клинические и молекулярно-генетические характеристики пациентов с признаками ТС

Пациент	Возраст	Пол	Диагностические критерии			Мутации	Примечания
			Большие критерии	Малые критерии	Другие признаки		
4972	1 г 7 мес	м	4 (гипопигментные пятна, туберы, субэпендимальные узлы, рабдомиомы сердца)	-	эпилепсия, задержка речевого развития	<i>TSC1</i> с.1525C>T (p.R509*)	у отца и деда пациента был несомненный диагноз ТС. У отца обнаружена мутация; ДНК деда недоступна
5579	2 г 2 мес	м	2 (гипопигментные пятна, СЭГА)	-	эпилепсия, задержка речевого развития	<i>TSC2</i> с.4763insC (p.Q1588Pfs*15)	de novo
6093	10 л	м	2 (гипопигментные пятна, “шагреновая бляшка”)	-	эпилепсия	<i>TSC1</i> с.2074C>T (p.R629*)	ДНК родителей недоступна
5170	9 мес	м	2 (гипопигментные пятна, рабдомиомы сердца)	-	эпилепсия	wt	экзомное секвенирование: мутации не найдены
6570	18 л	ж	1 (ангиомиолипомы почек, ЛАМ)	-	белый локон на лбу, пятна «кофе с молоком»	wt	экзомное секвенирование: мутации не найдены

6644	2 г 7 мес	ж	2 (гипопигментные пятна, рабдомиомы сердца)	-	эпилепсия	<i>TSC2</i> с.4569+2T>C	de novo
6592	12 л	м	2 (гипопигментные пятна, субэпендимальные узлы)	-	эпилепсия, кисты мозга	<i>TSC2</i> с.1443+5G>C	вероятно патогенный вариант. Не выявлен у здорового отца, ДНК матери недоступна
6695	13 л	ж	3 (ангиомиолипомы почек, множественные гамартомы сетчатки, рабдомиомы сердца)	2 (множественные кисты почек, ангиомиолипомы печени)	аутистические черты, хронические головные боли напряжения	<i>TSC2</i> с.2743-1G>A	мать: возможный ТС (одно гипопигментное пятно, 2 околоногтевые фибромы, абсанс-эпилепсия); мутация не найдена
6853	2 г	ж	2 (гипопигментные пятна, ангиофибромы)	-	эпилепсия	<i>TSC2</i> с.3351delG (p.G1117fs*73)	de novo
6910	2 г 11 мес	м	5 (гипопигментные пятна, рабдомиомы сердца, туберы, субэпендимальные узлы, СЭГА)	1 (множественные кисты почек)	эпилепсия	del 16p13.3 (<i>TSC2</i> ex37-42+PKD1)	de novo

7049	5 л 11 мес	ж	4 (гипопигментные пятна, ангиофибромы, фиброзная бляшка на лбу, ангиомиолипомы почек)	1 (множественные кисты почек)	эпилепсия, задержка речевого развития	TSC2 с.600-2A>G	de novo
7131	5 л	м	5 (гипопигментные пятна, рабдомиомы сердца, ангиофибромы, “шагреновая бляшка”, субэпендимальные узлы)	-	эпилептиформная активность на ЭЭГ, задержка речевого развития	TSC2 с.138+1G>A	de novo
7134	4 г	м	3 (СЭГА, рабдомиомы сердца, ангиомиолипомы почек)	1 (множественные кисты почек)	эпилепсия, задержка речевого развития	TSC2 с.4537G>T (p.E1513*)	de novo
7323	5 мес	м	1 (гипопигментные пятна)	-	эпилепсия; белый локон на лбу	TSC2 с.1832G>A (p.R611Q)	de novo

7209	2 г 3 мес	м	3 (гипопигментные пятна, рабдомиомы сердца, ангиомиолипомы почек)	1 (множественные кисты почек)	эпилепсия	<i>TSC1</i> с.1958insT (I653Ifs*53)	de novo
7444	11 л	ж	2 (гипопигментные пятна, ангиомиолипомы почек)	1 (множественные кисты почек)	хронические головные боли напряжения	<i>TSC1</i> с.1119C>G (p.Y373*)	de novo
7451	3 г	м	3 (ангиофибромы, фиброзная бляшка на лбу, рабдомиомы сердца)	-	эпилепсия, задержка речевого развития. Киста правой почки	<i>TSC2</i> с.4663_4664delAG (p.S1555Efs10*)	de novo
7459	32 г	м	2 (ангиофибромы, ангиомиолипомы почек)	-	-	wt	-

7551	4 г 6 мес	ж	2 (гипопигментные пятна, рабдомиомы сердца)	-	эпилепсия, задержка речевого развития; белый локон на лбу	<i>TSC2</i> с.5238_5255delCATC AAGCGGCTCCGCC A (p.H1746del6)	de novo
7703	5 л	ж	2 (гипопигментные пятна, туберы)	-	эпилепсия	<i>TSC1</i> с.2678_2682delGCCA T (p.S893Sfs9*)	мутация у матери не обнаружена; ДНК отца недоступна
7774	43 г	ж	4 (гипопигментные пятна, фиброзная бляшка на лбу, околоногтевые фибромы, туберы)	-	-	<i>TSC1</i> с.682C>T (p.R228*)	образцы родителей недоступны
7831	4 г	м	1 (гипопигментные пятна)	-	эпилепсия	<i>TSC1</i> с.585C>A (p.Y195*)	de novo
7968	28 л	ж	4 (ангиофибромы, “шагреновая бляшка”, ангиомиолипомы почек, околоногтевые фибромы)	-	-	<i>TSC2</i> с.1839+1G>T	de novo
8110	11 л	м	3 (гипопигментные пятна, ангиофибромы, рабдомиомы сердца)	-	-	<i>TSC1</i> с.1434delA (p.E478Efs54*)	de novo

MG8	6 л	ж	6 (гипопигментные пятна, ангиофибромы, рабдомиомы сердца, туберы, ангиомиолипомы почек, гамартома сетчатки)	2 (множественные кисты почек, ангиомиолипомы печени)	эпилепсия	<i>TSC2</i> с.4938_4939delGT (p.V1646Vfs6*)	de novo
MG24	16 л	ж	2 (ангиофибромы, СЭГА)	-	-	<i>TSC2</i> dup ex10-20	de novo
MG31	5 мес	ж	2 (гипопигментные пятна, рабдомиомы сердца)	-	-	<i>TSC2</i> с.774+2T>A	de novo
MG67	18 мес	ж	8 (гипопигментные пятна, околоногтевые фибромы, фиброзная бляшка на лбу, “шагреновая бляшка”, ангиофибромы, ангиомиолипомы почек, субэпидимальные узлы, ЛАМ)	-	остеосклероз подвздошной кости, полипы желудка	<i>TSC2</i> del ex1-15	de novo

MG71	3 г	м	1 (гипопигментные пятна)	-	-	wt	-
MG73	6 мес	м	1 (рабдомиомы сердца)	-	эпилепсия, задержка речевого развития; единичное пятно гипопигмента ции	<i>TSC2</i> с.2021delA (p.K464Rfs21*)	de novo
MG86	37 л	ж	2 (ангиомиолипомы почек, ЛАМ, ангиофибромы)	-	белый локон на лбу	wt	экзомное секвенирование: мутации не найдены
MG87	3 г	м	5 (гипопигментные пятна, рабдомиомы сердца, туберы, гамартомы сетчатки, ангиомиолипомы почек)	1 (множественн ые кисты почек)	-	<i>TSC2</i> с.3316A>T (p.K1106*)	de novo
MG99	1 г 5 мес	ж	3 (гипопигментные пятна, гамартомы сетчатки, субэпендимальны е узлы)	-	-	<i>TSC2</i> с.2590C>T (p.E864*)	de novo

MG102	34 г	ж	4 (ангиомиолипомы почек, ЛАМ, фиброзная бляшка на лбу, околоногтевые фибромы)	-	-	wt	экзомное секвенирование: мутации не найдены
MG113	2 г	ж	3 (гипопигментные пятна, туберы, ангиофибромы)	-	эпилепсия	<i>TSC2</i> с.3442C>T (p.Q1148*)	мутация у матери не обнаружена; ДНК отца недоступна
MG148	1 г 3 мес	м	2 (гипопигментные пятна, рабдомиомы сердца)		эпилепсия	<i>TSC2</i> с.2639+1G>T	de novo
MG150	4 г	м	4 (гипопигментные пятна, рабдомиомы сердца, ангиофибромы, ангиомиолипомы почек)		аутистические черты, эпилепсия, задержка речевого развития; солитарная киста почки	<i>TSC2</i> с.133_136delCTGA (p.L45Efs3*)	de novo
MG164	1 г 6 мес	ж	4 (гипопигментные пятна, рабдомиомы сердца, ангиомиолипомы почек, туберы)	-	эпилепсия, задержка речевого развития	<i>TSC2</i> del ex 1-27	de novo

MG179	1 г 5 мес	ж	3 (гипопигментные пятна, рабдомиомы сердца, туберы)	-	эпилепсия	<i>TSC2</i> с.3388_3392insTCCG T (p.M1131Vfs195*)	de novo
MG187	5 л 6 мес	м	3 (гипопигментные пятна, субэпендимальные узлы, рабдомиомы сердца)	-	эпилепсия, задержка речевого развития	<i>TSC2</i> с. 5227C>T (p.R1743W)	Вероятно патогенный вариант; de novo (выявлен экзомным секвенированием)
MG208	3 г	м	3 (гипопигментные пятна, рабдомиомы сердца, туберы)	-	задержка речевого развития	<i>TSC2</i> с.1474C>T (p.Q492*)	de novo
MG219	6 мес	ж	1 (гипопигментные пятна)	-	эпилепсия	<i>TSC2</i> с.908 T>C (p.L303P)	de novo
MG233	33 г	ж	2 (ангиофибромы, гамартомы сетчатки)	-	единичное пятно гипопигментации	wt	-
MG244	8 л	ж	1 (туберы)	1 (пятна на коже в виде конфетти)	эпилепсия, единичное пятно гипопигментации	<i>TSC1</i> с.2356C>T (p.R786*)	de novo

MG255	1 г 8 мес	м	2 (гипопигментные пятна, рабдомиомы сердца)	1 (множественные кисты почек)	эпилепсия	<i>TSC2</i> с.3240Adup (p.L1081T)	de novo
MG259	7 л	м	3 (гипопигментные пятна, ангиофибромы, СЭГА)	-	эпилепсия	<i>TSC1</i> с.1580-1581delAG (p.Q527Rfs7*)	de novo
MG272	10 л	м	2 (гипопигментные пятна, рабдомиомы сердца)	-	кисты хороидного сплетения	<i>TSC2</i> с.5011G>A (p.V11671M)	Вариант не упоминается в доступных базах данных; присутствует у здорового отца. VUS?
MG279	2 г 9 мес	м	4 (гипопигментные пятна, рабдомиомы сердца, туберы, субэпендимальные узлы)	-	диссомния, эпилептиформная активность на ЭЭГ	<i>TSC2</i> с.138+1G>A	de novo
MG301	13 л	м	4 (гипопигментные пятна, “шагреновая бляшка”, околоногтевые фибромы, туберы)	-	эпилепсия	<i>TSC1</i> с.Q100*	мутация у матери не обнаружена; ДНК отца недоступна

MG306	7 л	м	2 (рабдомиомы сердца, туберы)	-	-	<i>TSC2</i> с.1865G>C (p.R622P)	мутация упоминается в базе данных <i>TSC2</i> LOVD как вероятно патогенная; присутствует у здоровой матери, не найдена у здоровой сестры и тёти по матери; ДНК отца недоступна
MG312	19 л	ж	4 (ангиофибромы, “шагреновая бляшка”, ангиомиолипомы почек, субэпидимальные узлы)	-	эпилепсия	<i>TSC2</i> с.2540T>C (p.L847Pro)	мутация у матери не обнаружена; ДНК отца недоступна
MG317	10 л	м	3 (гипопигментные пятна, ангиофибромы, субэпидимальные узлы)	-	аутизм	<i>TSC2</i> del ex26-27	У матери - ангиофибромы лица и одно гипопигментное пятно; мутация не обнаружена; ДНК отца недоступна
MG399	15 л	ж	4 (ангиофибромы, “шагреновая бляшка”, гамартомы сетчатки, ангиомиолипомы почек)	1 (ангиомиолипомы правого надпочечника и печени)	эпилепсия; кисты мозга, 2 пятна гипопигментации	<i>TSC2</i> с.1832G>A (p.R611E)	de novo
MG433	28 л	ж	3 (ангиофибромы, фиброзная бляшка на лбу, ангиомиолипомы почек)	1 (ангиомиолипомы печени)	эпилепсия, аутизм; умственная отсталость	wt	-

MG448	15 л	м	2 (туберы, СЭГА)	-	эпилепсия	<i>TSC1</i> c.272C>A (p.S91*)	de novo
MG464	3 мес	ж	1 (рабдомиомы сердца)	-	-	<i>TSC2</i> c.3691_3694delCTGT (p.S1232Tfs*92)	de novo
MG472	8 мес	м	2 (гипопигментные пятна, туберы)	-	-	del 16p13.3 (<i>TSC2</i> ex37-42+PKD1)	de novo
MG478	4 г	м	4 (рабдомиомы сердца, СЭГА, гамартомы сетчатки, ангиомиолипомы почек)	1 (кисты почек)	эпилепсия, задержка речевого развития, аутизм	<i>TSC2</i> c.2157T>A (p.Y719*)	de novo
MG492	9 л	м	3 (рабдомиомы сердца, СЭГА, гамартомы сетчатки)	2 (кисты почек; ангиомиолипомы печени)	эпилепсия, аутизм, умственная отсталость	<i>TSC2</i> c.2083C>T (p.Q693*)	de novo
MG504	6 л	м	2 (гипопигментные пятна, субэпендимальные узлы)	-	эпилепсия, аутистические черты	<i>TSC1</i> c.195delA (p.E66Sfs*33)	de novo
MG506	3 мес	м	2 (рабдомиомы сердца, туберы)	-	эпилепсия	<i>TSC1</i> c.155del5 (p.K518Rfs15*)	de novo

СЭГА – субэпендимальная гигантоклеточная астроцитома; ЛАМ – лимфангиолейомиоматоз; wt – мутация не обнаружена

Некоторые мутации были выявлены неоднократно (Табл.13): в частности, у двух больных (7131, MG279) обнаружен аллель *TSC2* с.138 + 1G>A. Еще два пациента (6910, MG472) имели крупные делеции, охватывающие экзоны 37-42 гена *TSC2*, а также часть гена *PKD1*, расположенного по соседству. Кроме того, два случая ТС (7323, MG393) были связаны с мутацией *TSC2* с.1832G>A (p.R611Q). Все эти мутации неоднократно описаны в предыдущих исследованиях [Beauchamp et al., 1998; Dabora et al., 2002; Kwiatkowski et al., 2015; Rendtorff et al., 2005; Sancak et al., 2005]. Примечательно, что эти 6 мутаций *TSC2* возникли de novo, что указывает на то, что они представляют скорее «горячие точки» мутагенеза, нежели циркулирующие в генофонде патогенные аллели. Эти результаты согласуются с некоторыми другими сообщениями [Dabora et al., 2002], хотя также сообщалось и о вертикальной передаче некоторых из этих вариантов [Beauchamp et al., 1998; Jones et al., 1999; Sancak et al., 2005].

Сравнение результатов настоящего исследования с данными, полученными другими авторами, приведено в Табл.14.

Табл. 14. Географические и этнические различия в распределении мутаций в генах TSC1 и TSC2: обзор исследований

Страна	Мутации /n пациентов (%)	TSC1/TSC2	Крупные перестройки	Семейные случаи, %	% наследственных мутаций	Повторяющиеся мутации	Ссылка
Австралия	33/45 (73%)	TSC1 9/33 (27%); TSC2 24/33 (73%)	Нет данных	5/45 (11%)	TSC1: 4/9 (44%) TSC2: 1/24 (4%)	Нет данных	[Chopra et al., 2011]
Австрия	14/15 (93%)	TSC1 4/14 (29%); TSC2 10/14 (71%)	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	[Samueli et al., 2016]
Китай	117/117 (100%)	TSC1 16/117 (14%); TSC2 101/117 (86%)	Нет данных	14/117 (12%)	TSC1 – 4/16 (25%); TSC2 -10/101 (10%)	TSC2 с.5227C>T (p.R1743W); с.5228G>A (p.R1743W); с.1831C>T (p.R611W); с.2251C>T (p.R751*); с.3412C>T (p.R1138*)	[Yang et al., 2017]
Дания	51/65 (78%)	TSC1 11/51 (22%); TSC2 40/51 (78%)	4/51 (8%), все в гене TSC2	10/65 (15%)	TSC1 – 1/2 (50%); TSC2 – 6/23 (26%)	TSC1 с.2074C>T (p.R692*); TSC2 с.1832G>A (p.R611Q); с.5228G>A (p.R1743W)	[Rendtorff et al., 2005]

Германия	31/68 (46%)	TSC1 2/31 (7%); TSC2 29/31 (93%)	3/31 (10%), все в гене TSC2	9/68 (13%)	TSC1 - 0/2 (0); TSC2 – 4/29 (14%)	TSC2 с.286C>T (p.Q90*); с.5042C>T (p.P1675L); с.5256_5273del	[Langkau et al., 2002]
Индия	12/24 (50%)	TSC1 1/12 (8%) TSC2 11/12 (92%)	Нет данных	7/24 (29%)	TSC1 1/1 (100%); TSC2 1/11 (9%)	Не найдено	[Ali et al., 2005]
Япония	31/57 (54%)	TSC1 11/31 (35%); TSC2 20/31 (65%)	2/31 (6.5%): 1 в гене TSC1, 1 в TSC2	8/57 (14%)	TSC1 – 2/11 (18%); TSC2 – 2/20 (10%)	TSC2 с.5238_5255del18	[Niida et al., 2013]
	16/21 (76%)	TSC1 9/16 (56%); TSC2 7/16 (44%)	Нет данных	6/16 семейные (38%)	Нет данных	TSC1 с.971T>A (p.L250*)	[Sasongko et al., 2008]
	10/27 (37%)	TSC1 4/10 (40%); TSC2 6/10 (60%)	Нет данных	4/27 (15%)	Нет данных	Не найдено	[Yamashita et al., 2000]
Корея	11/11 (100%)	TSC1 5/11 (45%); TSC2 6/11 (55%)	2/11 (18%): 1 в гене TSC1; 1 в TSC2	Нет данных	Нет данных	Не найдено	[Jang et al., 2012]
	13/44 (29%)	TSC1 2/13 (15%); TSC2 11/13 (85%)	Нет данных	9/35 (26%)	TSC1 2/2 (100%); TSC2 3/11 (27%)	TSC2 с.5227_5244del18 (p.R1743_K1748del)	[Choi et al., 2006]
Малайзия	27/34 (79%)	TSC1 6/27 (22%); TSC2 21/27 (78%)	3/27 (11%), все в TSC2	7/34 (21%)	TSC1 1/6 (17%); TSC2 6/21 (29%)	TSC2 с.3755C>A (p.S1252*)	[Ismail et al., 2017]

Нидерланды	362/490 (74%)	TSC1 82/362 (23%); TSC2 280/362 (77%)	20/362 (6%), все в TSC2	63/200 (33%)	TSC1 20/42 (48%); TSC2 43/158 (27%)	TSC1 c.1719C>T (p.R500*); TSC2 c.1850G>A (p.R611Q); c.1849C>T (p.R611W)	[Sancak et al., 2005]
Польша	83/105 (79%); данные только о микромутац иях	TSC1 8/83 (10%); TSC2 75/83 (90%)	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	[Dabora et al., 2011], [Józwiak et al., 2013]
Россия	53/61 (87%)	TSC1 14/53 (26%); TSC2 39/53 (74%)	6/53 (11%), все в TSC2	3/61 (5%) включая 1 однозначно семейный случай и 2 вероятно семейных случая	TSC1 1/12 (8%) TSC2 0/34 (0)	TSC2 c.138+1G>A; c.1832G>A (p.R611Q); del ex37-42 TSC2+PKD1	Данное исследовани е [Suspitsin et al., 2018]
	32/76 (43%)	TSC1 10/32 (31%); TSC2 22/32 (69%)	TSC1 1/11 (9%) TSC2 2/24 (8%)	Не выявлены	0/32	TSC2 c.5227_5244del (p.1743_1748del)	[Аношкин и соавт., 2018]

Страна	Мутации / n пациентов (%)	TSC1/TSC2	Крупные перестройки	Семейные случаи, %	% наследственных мутаций	Повторяющиеся мутации	Ссылка
Россия	195/202 (96%)	TSC1 24%; TSC2 73%	TSC1 3% TSC2 8%	Не указано	Не указано	Не указано	[Аношкин и др., 2020]
Тайвань	64/84 (76%)	TSC1 9/64 (14%); TSC2 55/64 (86%)	Нет данных	Нет данных	TSC1 2/9 (22%); TSC2 8/55 (15%)	TSC2 c.1513C>T (p.R505*); c.2251C>T (p.R751*); c.5227C>T (p.R1743W); c.5238_5255del18	[Hung et al., 2006]
Великобритания	120/150 (80%)	TSC1 22/120 (18%); TSC2 98/120 (82%)	2/120 (2%), все в TSC2	19/150 (13%)	TSC1 9/22 (41%); 9/98 (9%)	TSC1 c.2577C>T (p.R786*); TSC2 c.1531C>T (p.R505*); c.2269C>T (p.R751*); c.3592C>T (p.Q1192*); c.4393C>T (p.R1459*); c.1850G>A (p.R611Q); c.1849C>T (p.R611W); c.5042C>T (p.P1675L); c.5256del18bp	[Jones et al., 1999]

США	74/126 (59%)	TSC1 16/74 (22%); TSC2 58/74 (78%)	Нет данных	40/126 (32%)	TSC1 11/16 (69%); TSC2 16/58 (28%)	TSC1 c.2295C>T (p.R692*)	[Niida et al., 1999]
США	252/325 (78%)	TSC1 61/243 (25%) TSC2 182/243 (75%)	3/252 (1%), все в гене TSC2	68/352 (19%)	TSC1 25/61 (41%) TSC2 28/182 (15%)	TSC2 c.1831C>T (p.R611W); c.1832G>A (p.R611Q); c.5238_5255del	[Au et al., 2007]
США	116/137 (85%)	TSC1 35/116 (30%) TSC2 81/116 (70%)	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	[van Eeghen et al., 2012]

США и Польша	186/224 (83%)	TSC1 28/186 (15%); TSC2 158/186 (85%) Включая американцев, данные только о микромутациях TSC1 36/136 (27%); TSC2 100/136 (73%)	20/186 (11%), все в гене TSC2	38/224 (17%)	TSC1 5/27 (19%); TSC2 22/136 (16%); данные только о микромутациях	TSC1 c.954C>T (p.R245*); c.1746C>T (p.R509*); c.2109_2112delAAAG; c.432-1G>A. TSC2 c.972C>G (p.Y324*); c.1372C>T (p.R458*); c.1849C>T (p.R611W); c.1850G>A (p.R611Q); c.2251C>T (p.R751*); c.3094C>T (p.R1032*); c. 3098insA; c.3412C>T (p.R1138*); c.3685C>T (p.Q1229*); c.4375C>T (p.R1459*); c.5042C>T (p.P1675L); c.5126C>G (p.P1709R); c.5238_5255del118; c.5252_5229+19del27; c.976-15G>A; c.2743-2A>G; c.4663-1G>A; c.5161-1G>A; deletion of exons 4,7, 16, 25, 26, 32; deletion of exon 36; deletion of exons 25, 26 and 36.	[Dabora et al., 2002]
--------------	---------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------	--------------	-------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------

США и Польша	54/261 (21%) Данные только о крупных мутациях	TSC1 4/54 (7%); TSC2 50/54 (93%)	Мутации, обнаруженные с помощью MLPA, составляют 6.1% всех мутаций у пациентов с ТС. 6% геномных перестроек TSC2 и 0.5% - TSC1	Не указано	Не указано	Не указано	[Kozlowski et al., 2007]
--------------	--------------------------------------------------	-------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------	------------	------------	--------------------------

Ассоциации между генотипом и фенотипом

Мутации гена *TSC1/2* были обнаружены у 47/53 (89%) и 6/8 (75%) пациентов с несомненным и возможным диагнозом ТС, соответственно. Сравнение клинических особенностей пациентов с ТС, имеющих мутацию *TSC1*, *TSC2* или отсутствие наследственных дефектов в этих генах (No Mutation Identified, NMI), выявило некоторые интересные тенденции (Табл. 15). Для пациентов из группы без выявленных мутаций (NMI) характерен наиболее старший возраст на момент постановки диагноза, тогда как больные с мутациями *TSC2* были самыми молодыми (*TSC1* по сравнению с *TSC2*: $p = 0.004$; *TSC1* по сравнению с NMI: $p = 0.035$; *TSC2* по сравнению с NMI: $p = 0.002$). Эти данные хорошо согласуются с другими работами [Dabora et al., 2002; Kothare et al., 2014; Staley et al., 2011]. У пациентов из группы NMI отсутствовали кортикальные туберы и субэпендимальные узлы, что подтверждает наблюдения Camposano et al., 2009 и Voronat et al., 2014. Кроме того, случаи NMI характеризовались статистически более низкой частотой приступов, наличием рабдомиом сердца и множественных гипомеланотических пятен. Эти наблюдения хорошо согласуются с результатами нескольких предыдущих исследований, в которых признается более мягкий фенотип пациентов с NMI по сравнению с генетически подтвержденными случаями ТС [Au et al., 2007; Dabora et al., 2002; Qin et al., 2010; Sancak et al., 2005; Van Eeghen et al., 2012; Camposano et al., 2009]. С другой стороны, пациенты без мутаций имели значительно более высокую частоту почечных ангиомиолипом и лимфангиолейомиоматоза; о сходных тенденциях сообщили Staley et al, 2011 и Camposano et al, 2009.

Носители мутации *TSC1*, как правило, имели более низкое соотношение мужчин и женщин и более низкую частоту рабдомиом сердца, чем пациенты с мутацией *TSC2*, однако различия не достигали порога статистической значимости (Табл.15).

Табл. 15. Сравнение клинических характеристик пациентов с мутациями TSC1, TSC2, и без выявленных мутаций (NMI).

Характеристики		<i>TSC1</i> (n = 14)	<i>TSC2</i> (n = 39)	NMI (n = 8)	Всего (n=61)	Корреляции
Возраст	Средний возраст	9.8 (3 мес – 43 г)	5.5 (3 мес – 28 л)	23.2 (9 мес – 37 лет)	8.8 (3 мес – 43 г)	
	Медиана возраста, лет	7.5	3.0	30.0		TSC1 vs. TSC2: p = 0.004 TSC1 vs. NMI: p = 0.035 TSC2 vs. NMI: p = 0.002
Пол	Женский	11 (79%)	18 (46%)	5 (63%)	34 (56%)	ns
	Мужской	3 (21%)	21 (54%)	3 (37%)	27 (44%)	ns
Неврологические проявления	Эпилепсия	11 (73%)	26 (67%)	2 (25%)	39 (63%)	TSC1 vs. NMI: p = 0.026 TSC2 vs. NMI: p = 0.047
	Аутизм / аутичное поведение	1 (7%)	5 (13%)	1 (13%)	7 (11%)	ns
	Задержка речевого развития	1 (7%)	12 (31%)	0	13 (21%)	ns
Головной мозг	Субэпендимальные узлы	2 (13%)	9 (23%)	0	11 (18%)	ns
	Туберсы коры	7 (47%)	10 (26%)	0	17 (27%)	TSC1 vs. NMI: p = 0.023
	Субэпендимальная гигантоклеточная астроцитома	2 (13%)	6 (15%)	0	8 (13%)	ns

Почки	Множественные кисты почек	2 (13%)	9 (23%)	0	11 (18%)	ns
	Ангиомиолипомы почек	2 (13%)	12 (31%)	5 (63%)	19 (31%)	TSC1 vs. NMI: p = 0.052
Кожа	Множественные пятна гипопигментации	11 (79%)	27 (69%)	2 (25%)	40 (66%)	ns
	1-2 пятна гипопигментации	1 (7%)	2 (5%)	1 (13%)	4 (6%)	ns
	Ангиофибромы лица	2 (13%)	12 (31%)	4 (50%)	18 (30%)	ns
	Пятна на коже в виде конфетти	1 (7%)	0	0	1 (2%)	ns
	Фиброзная бляшка на лбу	1 (7%)	3 (8%)	2 (25%)	6 (10%)	ns
	Участок шагренево́й кожи	2 (13%)	5 (13%)	0	7 (11%)	ns
	Околоногтевая фиброма	2 (13%)	2 (5%)	1 (13%)	5 (8%)	ns
Волосы	Белый локон волос на лбу	0	2 (5%)	2 (25%)	4 (6%)	ns
Печень	Ангиомиолипомы печени	0	4 (10%)	1 (13%)	5 (8%)	ns
Сердце	Рабдомиомы сердца	4 (27%)	23 (59%)	1 (13%)	28 (45%)	TSC2 vs. NMI: p = 0.023
Легкие	Лимфангиолейомиоматоз	0	2 (5%)	3 (38%)	5 (8%)	TSC1 vs. NMI: p = 0.036 TSC2 vs. NMI: p = 0.029
Глаза	Гамартомы сетчатки	0	7 (18%)	1 (13%)	7 (11%)	ns

NMI – No mutation identified, образцы без мутации; ns – nonsignificant (p>0.05)

После корректировки с учётом множественных сравнений оставались значимыми только различия в возрасте пациентов. Вместе с тем, выявленные тенденции хорошо согласуются с другими опубликованными исследованиями; это свидетельствует о том, что наблюдаемые корреляции генотип-фенотип действительно характерны для туберозного склероза.

Исследование мутаций у родителей пациентов

Образцы ДНК родителей были доступны для 46 пациентов. В 44 из 46 (96%) мутации *TSC1/2*, выявленные у детей, отсутствовали у родителей. Вертикальная передача потенциально патогенной мутации была зарегистрирована только в двух из 46 (4%) проанализированных семей. Только в одной из семей был обнаружен родитель (отец), имеющий признаки ТС (случай 4972, Табл.13). В другой семье (MG306) заболевание, по-видимому, было связано с наличием мутации *TSC2* с.1865G>C (p.R622P). Этот мутантный аллель был унаследован по материнской линии, однако мать не имеет видимых признаков ТС. Существуют некоторые данные, свидетельствующие о том, что аллель с.1865G>C (p.R622P) [Farach et al., 2019] и некоторые другие мутации *TSC1/2* [Jansen et al., 2006] связаны с более легким течением заболевания. В другой семье (MG317, Табл. 13) у матери пациента наблюдались некоторые клинические особенности (лицевые ангиофибромы и единичное гипопигментное пятно), однако результат исследования на предмет наличия делеции экзонов 26 - 27 *TSC2*, выявленной у пробанда, был отрицательным. Нельзя исключить наличия у этой женщины мозаичной формы дефекта *TSC2*; известно, что такого рода мутации плохо обнаруживаются с помощью рутинного MLPA - анализа [van Veghel-Plandsoen Van et al., 2011].

Полноэкзомное секвенирование

Пять пациентов были подвергнуты секвенированию экзома. Двое из этих пациентов имели несомненный диагноз ТС, установленный в детском возрасте, тогда как остальные трое были взрослыми женщинами с почечными ангиомиолипомами и лимфангиолейомиоматозом. Как упомянуто выше, секвенирование экзома выявило ранее пропущенный *TSC2* с.5227C>T (p.R1743W) у пациента MG187; эта мутация классифицируется базой данных LOVD как вероятно патогенная. Далее мы проанализировали гены, которые, в соответствии с базой данных BioGrid, участвуют во взаимодействии с *TSC1*, *TSC2* или *MTOR*. Было идентифицировано 8 редких вариантов, имеющих высокий (более 20) интегральный CADD score (Табл.16); все они были миссенс-мутациями и не встречались у более чем одного пациента. В случае MG102 обнаружен потенциально релевантный вариант *CCND2* с.455C>A (p.A152E); однако он также выявлен у здоровой матери и сестры пробанда, что является аргументом против его патогенности.

Функциональная оценка вышеуказанных вариантов в настоящей работе не проводилась, т.е., для выяснения их значения требуются дальнейшие исследования.

Табл.16. Редкие варианты, обнаруженные в ходе полноэкзомного секвенирования

CADD score	Название гена	Функция	Транскрипт / нуклеотидная замена	Аминокислотная замена	dbSNP, rs	Образец	MAF, GnomAD
26.5	<i>CCND2</i>	cyclin D2	ENST00000261254.8 c.455C>A	p.Ala152Gly	199719393	MG102	0.0000657
23	<i>CD274</i>	CD274 molecule	ENST00000381577.4 c.437C>G	p.Pro146Arg	17718883	MG86	0.00355
32	<i>HERC1</i>	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin-protein ligase family member 1	NM_003922.4 c.11336G>T	p.Gly3779Val	-	5170	-
24.7	<i>MRPS9</i>	mitochondrial ribosomal protein S9	NM_182640.3 c.992C>A	p.Thr331Lys	-	MG86	-
34	<i>NEK1</i>	NIMA-related kinase 1	ENST00000507142.6 c.782G>A	p.Arg261His	200161705	MG86	0.00215
20.6	<i>RPS6KA1</i>	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 1	NM_002953.4 c.1153G>A	p.Gly385Ser	140901694	5170	0.00104
27.5	<i>SMAD2</i>	SMAD family member 2	ENST00000262160.11 c.1268G>C	p.Gly423Ala	879124898	MG187	-

3.4. Исследование первичных иммунодефицитных состояний (ПИД)

Обоснование принципов набора пациентов

К участию в исследовании были привлечены 409 детей. Первоначально набор пациентов базировался на соответствии критериям подозрения на наличие первичного иммунодефицита (критерии Jeffrey Modell Foundation (JMF) для детей; <http://www.info4pi.org/library/educational-materials/10-warning-signs>). 208 пациентов соответствовали этим критериям; число наблюдаемых признаков составляло от 1 до 5; при этом 39 пациентов (19%) имели 3 и более признаков возможного ПИД.

Вместе с тем манифестация ПИД может проявляться симптомами, не укладывающимися в критерии JMF. Поэтому мы сознательно включили в исследование больных с другими клиническими признаками, которые также могут наблюдаться при наследственном дефекте иммунитета ($n = 192$). В качестве дополнительных критериев отбора использовались следующие характеристики:

- наличие эпизодов периодических лихорадок в отсутствие выявленных инфекционных причин; $n = 63$;

- сочетание инфекционных проявлений с лабораторным феноменом аутоиммунной цитопении (тромбоцитопеническая пурпура, аутоиммунная гемолитическая анемия, синдром Фишера-Эванса; $n = 31$; у 16 детей он сопровождался лимфопролиферативным синдромом (аутоиммунный лимфопролиферативный синдром);

- наличие лабораторного феномена аномально повышенного IgE (>3000 U/mL); $n = 6$;

- необычно тяжелое течение инфекционного заболевания (например, тяжелый менингит, деструктивная пневмония и т.д.); $n = 21$;

- высокое число эпизодов острых респираторных инфекций (8 и более в течение года); n = 54.

Кроме того, несмотря на наличие критериев JMF, мы посчитали целесообразным выделить в отдельную группу пациентов (n = 17) с вероятным диагнозом атаксии - телеангиэктазии (АТ). У всех пациентов обнаружены клинические признаки классической атаксии-телеангиэктазии: с возраста 1-4 лет они страдали от прогрессирующей мозжечковой атаксии и других характерных проявлений АТ, таких как дизартрия и/или телеангиэктазия. Все больные имели славянское происхождение, кроме брата и сестры из одной семьи (пациенты 188 и 189), которые имели алтайские корни. Повышение уровня АФП наблюдалось у всех пациентов, кроме одного (172), у которого этот параметр не исследовался.

Также в отдельную подгруппу были выделены пациенты с «синдромальными» формами ПИД. Согласно данным историй болезни, у ряда больных инфекционные проявления сочетались с наличием множественных микроаномалий развития (стигм дизэмбриогенеза) и/или врожденных пороков развития (n = 18). У всех детей этой категории также наблюдались положительные критерии JMF. В некоторых случаях пациентам проводилось рутинное кариотипирование (пациенты 41, 193, 237) и были выявлены хромосомные аномалии (делеция 5p, кольцевая хромосома 15 и добавочный фрагмент хромосомы 8); такие пациенты были исключены из дальнейшего генетического исследования.

Общий алгоритм исследования представлен на Рис.5.



Рис.5. Алгоритм исследования пациентов с подозрением на ПИД

Остальные пациенты были проанализированы на предмет наличия распространенных микроделеционных синдромов с помощью MLPA; аномалии (микродупликация Xq28, микродупликация 17q21.31, микродупликация 4p16.3 и делеция 22q11.2) были выявлены у четырех пациентов (194, 290, MG550, 527); у пациентов 194, 290 и 527 наличие дупликаций было подтверждено методом хромосомного микроматричного анализа (Табл. 17).

Табл.17. Хромосомные повреждения, выявленные у пациентов с синдромальными ПИД

ID	Возраст, лет	Пол	Симптоматика	Выявленные аномалии
41	4	ж	Задержка психоречевого развития. Мышечная гипотония, страбизм, микроцефалия, гипертелоризм, низкопосаженные ушные раковины, широкая спинка носа. Рекуррентные пневмонии	Делеция 5p. Синдром «кошачьего крика»
193	6	ж	Задержка речевого развития. Снижение прибавки роста и массы. Хроническая диарея	Кольцевая хромосома 15
237	12	м	Задержка умственного развития, дизартрия. Лимфаденопатия, рекуррентные респираторные инфекции, хронический кожно-слизистый кандидоз, синуситы	Добавочный фрагмент хромосомы 8
194	2	ж	ЗВУР, двухсторонний врожденный вывих бедра, задержка психомоторного развития, мышечная гипотония. Плоское лицо, глазной гипертелоризм, плоская переносица, короткий нос, микростомия, V-образная форма верхней губы, короткая шея. Гипоплазия мозолистого тела. Снижение прибавки роста и массы. Хронический обструктивный бронхолит	MLPA: синдром микродупликации Xq28 arrayCGH: arr [hg19] Xq27.3q28(144 495 493-154 908 471)x3
290	11	м	Задержка умственного развития, дизартрия, брахицефалия, гипертелоризм глаз, птоз, толстый завиток ушной раковины. В анамнезе энцефалит, рекуррентная пневмония	MLPA: микродупликация 17q21.31 arrayCGH: arr [hg19] 17q21.31(44188441_44 694283)X3
MG 550	6	м	Задержка психоречевого развития, врожденный порок сердца, гипоплазия тимуса, пахово-мошоночная грыжа, необычная форма ушей, эпистаксис, кандидоз, тяжело протекающие ОРВИ	MLPA: делеция 22q11.2 (синдром Ди Джорджи)
527	9 мес	ж	Гипертелоризм, готическое нёбо, поперечная складка на ладони, низкопосаженные уши, макроглоссия, короткая шея. ВПС: открытый артеральный проток. Снижение прибавок по росту и массе, нейросенсорная тугоухость, петехиальная сыпь на коже; тромбоцитопения, анемия, лейкопения, низкий IgA	MLPA: делеция 4p16.3 arrayCGH: arr[hg19] 4p16.3(1159060_19928 26)X3

У трех пациентов на основании фенотипических особенностей (микроцефалия, покатый лоб, крупный нос) лечащими врачами был заподозрен диагноз синдрома Ниймеген; нами проведен анализ на мажорную «славянскую» мутацию *NBN del5*. Диагноз подтвержден у двух пациентов с подозрением на это заболевание: секвенирование по Сэнгеру показало наличие мутации NM_002485.4 (NBN): c.657_661delACAAA (p.K219Nfs) в гомозиготном состоянии.

Итого, на предварительном этапе исследования значимые генетические дефекты были обнаружены у 9 из 18 пациентов с «синдромальными» ПИД. Очевидно, что при условии назначения необходимого объема исследований больные этой группы имеют высокие шансы на выявление причин заболевания, что, в свою очередь, открывает новые возможности в области медико-генетического-консультирования семей. С другой стороны, следует иметь в виду, что многие пациенты с комплексом множественных врожденных аномалий нуждаются в консультации иммунолога и исследовании иммунного статуса.

3.4.1. Эффективность таргетного мультигенного секвенирования

Таргетному секвенированию подвергались образцы 400 пациентов, соответствующих критериям подозрения на наличие ПИД. В это число вошли и больные с атаксией-телеангиэктазией, а также дети с «синдромальными» ПИД после исключения случаев с хромосомными аномалиями и синдромом Ниймеген. В одном случае (пациентка 527) выявленная микрохромосомная аномалия (микродупликация 4p16.3) не вполне соответствовала наблюдаемым лабораторным феноменам (панцитопения и низкий уровень IgA), поэтому образец был подвергнут дальнейшему анализу (таргетному секвенированию).

Эффективность использования таргетного секвенирования нового поколения в разных группах пациентов отражена в Табл.18.

Список патогенных/вероятно патогенных вариантов, выявленных у пациентов с подозрением на ПИД, и расцениваемых в качестве генетической детерминанты заболевания, представлены в Табл.19. Кроме того, был обнаружен ряд вариантов, связь которых с фенотипом больных по ряду причин не представляется очевидной (Табл. 20). В частности, выявленный генетический вариант может принципиально не соответствовать фенотипу пациента или типу наследования, характерному для конкретного заболевания. Применение таргетного высокопроизводительного секвенирования позволило нам выявить вероятную причину заболевания у 18% всех детей с рекуррентными инфекциями и у 21% больных, соответствующих JMF-критериям подозрения на наличие ПИД. Такая эффективность обнаружения мутаций сравнима с данными предыдущих исследований, в которых применялся такой же методический подход [Stoddard et al., 2014; Al-Mousa and Al-Saud, 2017; Bisgin et al., 2018; Gallo et al., 2016; Moens et al., 2014; Nijman et al., 2014; Rae et al., 2018].

Табл. 18. Эффективность применения таргетного секвенирования в различных группах

Группа пациентов	n	Патогенные / вероятно патогенные варианты	Варианты с неясным значением	Всего
Один или более позитивных критериев JMF без дизморфий	198	42 (21%)	7 (4%)	49 (25%)
Один или более позитивных критериев JMF в сочетании с дизморфиями («синдромальные ПИД»)	10	4 (40%)	0	4 (40%)
Атаксия – телеангиэктазия (АТ)	17	17 (100%)	0	0
Все пациенты с позитивными критериями JMF	208	44 (21%)	7 (3%)	51 (24%)
- включая АТ	225	62 (27%)	7 (3%)	69 (30%)
Периодические лихорадки (ПЛ)	63	16 (25%)	10 (16%)	26 (41%)
Аутоиммунные цитопении (АИГА, ИТП, синдром Фишера-Эванса) без лимфопролиферативного синдрома	15	1 (7%)	1 (7%)	2 (13%)
Аутоиммунные цитопении в сочетании с лимфопролиферативным синдромом (АЛПС)	16	3 (19%)	0	3 (19%)
Изолированный лабораторный феномен повышенного IgE	6	0	0	0
Рекуррентные респираторные инфекции (8 и более эпизодов в год)	54	3 (6%)	3 (6%)	6 (11%)
Необычно тяжелое протекание инфекций	21	1 (5%)	2 (10%)	3 (14%)
Все пациенты, за исключением АТ	383	70 (18%)	23 (6%)	93 (24%)
Все пациенты, включая АТ	400	88 (22%)	23 (6%)	111 (28%)

АИГА – аутоиммунная гемолитическая анемия; АЛПС - аутоиммунный лимфопролиферативный синдром; ИТП – идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура

Табл.19. Патогенные / вероятно патогенные варианты в генах ПИД

Группа пациентов	ID	Возраст, лет	Пол	Симптомы	Вариант	Диагноз
ПИД	373	8	ж	АЛПС, спленомегалия, пневмония, внутривенное применение антибиотиков	<i>FAS</i> NM_000043 с.580G>A (p.E194K)	Аутоиммунный лимфопролиферативный синдром типа 1a
ПИД	155	9	м	Деструктивная пневмония с бронхоэктазами, гнойный эндобронхит, рекуррентный синусит, бронхиальная астма, атопический дерматит, длительный субфебрилитет контагиозный моллюск	<i>SEMA3E</i> NM_012431 с.2108C>T (p.S703L) de novo	Атипичный синдром CHARGE?
ПИД	156 (одной цевый близнец 155)	9	м	Деструктивная пневмония с бронхоэктазами, абсцесс правого легкого, гнойный эндобронхит, рекуррентный синусит, бронхиальная астма, атопический дерматит, длительный субфебрилитет, контагиозный моллюск, папилломы		

ПИД	213	15	м	Хроническая диарея, внутривенное применение антибиотиков	<i>CYBB</i> NM_000397 с.1016C>T (p.P339L)	Хроническая грануломатозная болезнь
ПИД	439	4	ж	Рецидивирующие пневмонии, внутривенное применение антибиотиков. Хроническая грануломатозная болезнь?	<i>NCF2</i> NM_001127651 с.550C>T (p.R184*) + с.1156delC (p.R386fs)	Хроническая грануломатозная болезнь
ПИД	225	18	м	Вирусный энцефалит, хроническая диарея, внутривенное применение антибиотиков; снижение IgG	<i>STAT1</i> NM_007315 с.796G>A (p.V266I)	Иммунодефицит 31С
ПИД	392	5	ж	Хронический кожный папилломатоз	<i>IRAK4</i> NM_016123 с.377G>A (p.G126D) + с.800G>A (p.R267H)	Дефицит IRAK4
ПИД	395	1	м	ЦМВ инфекция с поражением ЖКТ, органов кроветворения, анемия, нейтропения, повышение СОЭ. Аллергическая энтеропатия	<i>PSTPIP1</i> NM_003978 с.748G>A (p.E250K)	Синдром PAMI (PSTPIP1-associated myeloid-related proteinemia inflammatory)

ПИД	322	9	м	Рекуррентный синусит и этмоидит, плохой ответ на антибиотикотерапию	<i>BTK</i> NM_000061 с.1581_1584del (p.C527fs)	Агаммаглобулинемия Брутона
ПИД	452	13	м	Рекуррентные инфекции дыхательных путей, лейкопения, гипогаммаглобулинемия	<i>BTK</i> NM_000061 с.1103-1G>C	Агаммаглобулинемия Брутона
ПИД	MG538	4	м	Рекуррентные инфекции дыхательных путей, гипогаммаглобулинемия	<i>BTK</i> NM_000061 с.1619G>A (p.C540Y)	Агаммаглобулинемия Брутона
ПИД	142	3	м	Рекуррентные отиты, пневмонии, сепсис, снижение прибавки роста и массы, агаммаглобулинемия	<i>BTK</i> NM_000061 с.776+1G>A	Агаммаглобулинемия Брутона
ПИД	587	2	м	Рекуррентные инфекции дыхательных путей, две пневмонии на 2-м году жизни, гипогаммаглобулинемия	<i>BTK</i> NM_000061 с.1574G>A (p.R525Q)	Агаммаглобулинемия Брутона
ПИД	471	5	ж	Пневмония, рекуррентные синуситы, контагиозный моллюск, внутривенное применение антибиотиков	<i>PIK3CD</i> NM_005026 с.3061G>A (p.E1021K)	Синдром активации фосфоинозитид 3-киназы δ

ПИД	125	2	м	Тяжелый атопический дерматит, хронический кожно-слизистый кандидоз	<i>SPINK5</i> NM_006846 с.2611C>T (p.R871*); с.410+1G>A	Синдром Нетертон
ПИД	453	10	м	Рекуррентные пневмонии и отиты, контагиозный моллюск, внутривенное применение антибиотиков	<i>CD40LG</i> NM_000074 с.466-1_466-2delAG	Синдром гипер IgM
ПИД	152	1	м	Неонатальный сахарный диабет, хроническая диарея, плохой ответ на антибактериальную терапию	<i>FOXP3</i> NM_014009 с.1190G>T (p.R397L)	Синдром IPeX
ПИД	48	18	м	Хроническая диарея, кандидоз, отставание прибавок по массе и росту, внутривенное применение антибиотиков, плохой ответ на антибактериальную терапию	<i>FOXP3</i> NM_014009 с.1190G>A (p.R397Q)	Синдром IPeX
ПИД	387	10	м	Рекуррентный афтозный стоматит, пневмонии	<i>TNFAIP3</i> NM_006290 с.811C>T (p.R271*)	Бехчетоподобный аутовоспалительный синдром
ПИД	463	1	м	Отставание прибавок по массе и росту, хроническая диарея	<i>RAG1</i> NM_000448 с.1180C>T (p.R394W); с.740G>A (p.R247H)	Синдром Оменн

ПИД	150	10	м	Отставание прибавок по массе и росту, хроническая диарея, кандидоз, афтозный стоматит, ониходистрофия, гиперпигментации кожи	<i>DKC1</i> NM_001363 с.1058C>T (p.A353V)	Врожденный X-сцепленный дискератоз
ПИД	161	8	ж	Отставание прибавок по массе и росту, хроническая диарея, периодические лихорадки, стоматит, миопатия	<i>G6PC3</i> NM_138387 с.925delT (p.F309fs) гомозигота	Тяжелая врожденная нейтропения (SCN4)
ПИД	175	2	м	Хроническая диарея, кандидоз, сепсис, внутривенное применение антибиотиков	<i>WAS</i> NM_000377 с.631C>T (p.R211*)	Синдром Вискотта-Олдрича
ПИД	303	9	м	Хронический кожно-слизистый кандидоз, анемия	<i>G6PD</i> NM_000402 с.653C>T (p.S218F) <i>STAT1</i> NM_007315 с.604A>G (p.M202V)	Дефицит глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы. Иммунодефицит 31С
ПИД	339	4	м	Рецидивирующие афтозные стоматиты, хронический кандидоз, дискератоз	<i>STAT1</i> NM_007315 с.69T>G (p.D23E) ранее не описан	Иммунодефицит 31С
ПИД	265	3	ж	Отставание прибавок по массе и росту, рекуррентная пневмония, синдром Фишера-Эванса	<i>RAG1</i> NM_000448 с.424C>T (p.R124*); с.1430C>G (p.T477S)	Тяжелая комбинированная иммунная недостаточность, недостаточность RAG1

ПИД	357	8	м	Поражение кожи, рецидивирующие стоматиты, пневмония с тяжелым течением, внутривенное применение антибиотиков	<i>IL2RG</i> NM_000206 с.555C>G (p.H185Q)	X-сцепленная тяжелая комбинированная иммунная недостаточность
ПИД	358	13	м	Отставание прибавок по массе и росту, хроническая диарея, кандидоз, поражение кожи, лимфопролиферация, внутривенное применение антибиотиков, отягощенный семейный анамнез	<i>IL2RG</i> NM_000206 с.108delC (p.T36fs)	X-сцепленная тяжелая комбинированная иммунная недостаточность
ПИД	368	2	ж	Пневмония 2 раза в течение первого года жизни, задержка физического развития, кандидоз, внутривенное применение антибиотиков	<i>DCLRE1C</i> NM_001033855 с.103C>G (p.H35D) гомозигота	Тяжелая комбинированная иммунная недостаточность, дефицит Artemis
ПИД	422	1.5	ж	Отставание прибавок по массе и росту, хроническая диарея, пневмония, кандидоз, внутривенное применение антибиотиков	<i>DCLRE1C</i> NM_001033855 с.560T>G (p.L187*) + с.103C>G (p.H35D)	Тяжелая комбинированная иммунная недостаточность, дефицит Artemis

ПИД	148	6	м	Хроническая диарея, пневмония на 1-м году жизни, рекуррентные респираторные инфекции; дефицит подкожной жировой клетчатки; низкие IgA, IgM, IgG; медуллобластома	<i>BLM</i> NM_00057 с.1642C>T (p.Q548*)	Синдром Блума
ПИД	369	5	м	Отставание прибавок по массе и росту, хроническая диарея, кандидоз слизистых. IPЕХ?	<i>AIRE</i> NM_000383 с.769C>T p.R257* гомозигота	Аутоиммунный полигландулярный синдром 1 типа
ПИД	310	7	ж	Хроническая диарея, кандидоз слизистых, болезнь Крона с очень ранним началом	<i>AIRE</i> NM_000383 с.1118C>T (p.A373V) нет сведений о патогенности	Аутоиммунный полигландулярный синдром 1 типа
ПИД	Fu7878	14	ж	Отставание прибавок по массе и росту, хронический кожно-слизистый кандидоз	<i>AIRE</i> NM_000383 с.769C>T (p.R257*); с.32T>C (p.L11P)	Аутоиммунный полигландулярный синдром 1 типа
ПИД	171	6	м	Рекуррентная пневмония, хронический кожно-слизистый кандидоз, хроническая диарея, внутривенное применение антибиотиков	<i>AIRE</i> NM_000383 с.607C>T (p.R203*) гомозигота	Аутоиммунный полигландулярный синдром 1 типа

ПИД	26	4	ж	Хронический кандидоз	<i>AIRE</i> NM_000383 с.1066C>T (p.R356W)	Аутоиммунный полигландулярный синдром 1 типа?
ПИД	372	8	м	АЛПС, отиты, пневмонии, синдром Фишера-Эванса	<i>KRAS</i> NM_033360 с.38G>A (p.G13D)	RAS-ассоциированный лимфопролиферативный синдром (RALD)
ПИД	214	10	ж	Отставание прибавок по массе и росту, рекуррентный синусит, системная красная волчанка	<i>TREX1</i> NM_033629 с.45G>T (p.R15S)	Моногенная форма системной красной волчанки?
ПИД	268	12	ж	ОВИН, пневмония, контагиозный моллюск	<i>TNFRS13B</i> NM_012452 с.310T>C (p.C104R)	Общая переменная иммунная недостаточность
ПИД	267 (брат пац. 268)	9	м	ОВИН, пневмония, контагиозный моллюск	<i>TNFRS13B</i> NM_012452 с.310T>C (p.C104R)	Общая переменная иммунная недостаточность
ПИД	355	4	ж	ОВИН? Отставание прибавок по массе и росту, боли в животе, хроническая диарея, тотальный язвенный колит	<i>TNFRS13B</i> NM_012452 с.310T>C (p.C104R)	Общая переменная иммунная недостаточность

Синдром ПИД	527	9 ме с	ж	<p>Дизморфии (гипертелоризм, готическое нёбо, поперечная складка на ладони, низкопосаженные уши, макроглоссия, короткая шея). ВПС: открытый артеральный проток. Снижение прибавок по росту и массе, нейросенсорная тугоухость, петехиальная сыпь на коже; тромбоцитопения, анемия, лейкопения, низкий IgA. Микроделеция 4p16.3 размером 0.8 Мб</p>	<p>ATM NM_000051 c.1564_1565delGA (p.E522Ifs*43); c.5932G>T (p.E1978*)</p>	Атаксия - телеангиэктазия
-------------	-----	--------------	---	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------

Синдром. ПИД	253	10	м	Низкорослость, расщелина твердого и мягкого нёба, врожденный порок сердца (ДМЖП + ДМПП), подковообразная почка, подвывих коленных чашечек, гипоспадия, неполная синдактилия 3-4 пальцев стопы. Рецидивирующие обструктивные бронхиты, синдром Фишера-Эванса.	<i>KMT2D</i> NM_003482 c.303dup (p.S102Efs)	Синдром грима Кабуки
Синдром. ПИД	MG387	8	ж	Низкорослость, расщелина твердого и мягкого нёба, врожденный порок сердца (двухстворчатый аортальный клапан), поясничная дистопия почек, удвоение правой почки, коарктация аорты, удвоение маки и влагалища. Рекуррентные респираторные инфекции (бронхиты, пневмонии)	<i>KMT2D</i> NM_003482 c.5627_5630delACAG (p.D1876Gfs*38)	Синдром грима Кабуки

Синдром. ПЖД	MG721	5	ж	Низкорослость, расщелина твердого и мягкого нёба, гипертелоризм, страбизм, врожденный порок сердца (ДМЖП + ДМПП), атаксия, задержка психоречевого развития. Рекуррентные респираторные инфекции (бронхиты, пневмонии)	<i>KMT2D</i> NM_003482 с.10183C>T (p.Q3395*)	Синдром грима Кабуки
ПЛ	229	12	м	Периодические лихорадки, боли в мышцах и животе, артрит	<i>MVK</i> NM_000431 с.613A>G (p.N205D); с.604G>T (p.G202*)	Синдром гипериммуноглобулинемии D (HIDS)
ПЛ	MG114 2	7 мес	ж	Периодические лихорадки, боли в животе, артрит	<i>MVK</i> NM_000431 с.118C>T p.R40W; с.206_207del p.S69fs	Синдром гипериммуноглобулинемии D (HIDS)
ПЛ	PID557	10	ж	Периодические лихорадки, боли в животе	<i>MEFV</i> NM_000243 с.2080A>G (p.M694V); с.2040G>C (p.M680I)	Семейная средиземноморская лихорадка
ПЛ	MG115 3	2	м	Периодические лихорадки, боли в животе	<i>MEFV</i> NM_000243 с.2177T>C (p.V726A); с.2080A>G (p.M694V)	Семейная средиземноморская лихорадка

ПЛ	565	5	м	Периодические лихорадки, атопический дерматит, хронический ринит, рекуррентные инфекции, повышенный СРБ, отсутствие эффекта от назначения антибиотиков	<i>NLRP12</i> NM_144687 с.1054C>T (p.R352C)	NLRP12 – ассоциированный аутовоспалительный синдром
ПЛ	558	6	м	Периодические лихорадки, ювенильный идиопатический артрит	<i>NLRP12</i> NM_144687 с.2600G>A (p.R867H)	NLRP12 – ассоциированный аутовоспалительный синдром?
ПЛ	158	2	ж	Снижение прибавок роста и массы, рецидивирующий асептический перитонит, холодовые отеки	<i>NLRP12</i> NM_144687 с.737A>G (p.Y246C)	Семейный холодовой аутовоспалительный синдром (FCAS)
ПЛ	146	4	ж	Периодические лихорадки, спленомегалия, артралгия, боли в животе, повышенный СРБ, эпизодическая уртикарная сыпь, снижение прибавок роста и массы, отсутствие эффекта от назначения антибиотиков	<i>NLRP12</i> NM_144687 с.1054C>T (p.R352C)	NLRP12 – ассоциированный аутовоспалительный синдром

ПЛ	227	7	м	Периодические лихорадки, боли в животе, циклические рвоты, повышенный СРБ	<i>NLRP12</i> NM_144687 с.910C>T (p.H304Y)	NLRP12 – ассоциированный аутовоспалительный синдром
ПЛ	176	6	жен	Периодические лихорадки, увеличение л/у, спленомегалия, аутоиммунная гемолитическая анемия	<i>NLRP12</i> NM_144687 с.910C>T (p.H304Y)	NLRP12 – ассоциированный аутовоспалительный синдром
ПЛ	315	6	жен	Периодические лихорадки, перманентные афтозные стоматиты, боли в животе, снижение прибавок роста и массы	<i>NLRP12</i> NM_144687 с.910C>T (p.H304Y)	NLRP12 – ассоциированный аутовоспалительный синдром
ПЛ	312	6	му ж	Периодические лихорадки, головные боли, холодовые лихорадки, повышенный СРБ. Рекуррентные синуситы, резистентность к применению антибиотиков	<i>NLRP12</i> NM_144687 с.2216_2217del (p.R739fs)	NLRP12 – ассоциированный аутовоспалительный синдром
ПЛ	94	6	му ж	Периодические лихорадки, фарингиты, лимфаденопатия	<i>MEFV</i> NM_000243 с.2300C>T (p.T767I) ранее не описана	Семейная средиземноморская лихорадка? Мутация в 10 экзоне
ПЛ	135	6	жен	Периодические лихорадки, артралгия, рекуррентный стоматит	<i>MEFV</i> NM_000243 с.1060C>T (p.R354W)	Семейная средиземноморская лихорадка? Патогенный вариант в гетерозиготном состоянии

ПЛ	228	6	му ж	Периодические лихорадки	<i>MEFV</i> NM_000243 с.2177T>C (p.V726A)	Семейная средиземноморская лихорадка? Патогенный вариант в гетерозиготном состоянии
ПЛ	MG110 1	17	жен	Периодические лихорадки, боли в животе	<i>MEFV</i> NM_000243 с.2177T>C (p.V726A)	Семейная средиземноморская лихорадка? Патогенный вариант в гетерозиготном состоянии
АЛП С	183	18	жен	АЛПС, аутоиммунный гепатит, аутоиммунная тромбоцитопения	<i>FAS</i> NM_000043 с.786C>G (p.I262M) ранее не описана	Аутоиммунный лимфопролиферативный синдром типа 1a
АЛП С	256	17	му ж	Отставание прибавок по массе и росту, менингит, лимфопролиферативный синдром, синдром Фишера-Эванса	<i>LRBA</i> NM_001199282 с.4544T>C (p.L1515P) гомозигота <i>STAT1</i> NM_007315 с.796G>A (p.V266I)	Иммунодефицит 31С? Общая переменная иммунная недостаточность (ОВИН)?
АЛП С	182	10	жен	АЛПС, язвенный колит	<i>TNFRSF13B</i> NM_012452 с.310T>C (p.C104R)	Общая переменная иммунная недостаточность
Цитопени и	MG124 3	11	жен	ОВИН? АИГА, тромбоцитопения	<i>TNFRSF13B</i> NM_012452 с.310T>C (p.C104R)	Общая переменная иммунная недостаточность
Тяж инф	197	2	жен	Герпетический менингоэнцефалит	<i>TLR3</i> NM_003265 с.889C>G (p.L297V)	Энцефалит, вызванный вирусом простого герпеса
ЧБД	215	13	му ж	Рекуррентные респираторные инфекции, дефицит IgG2	<i>TNFRSF13B</i> NM_012452 с.542C>A (p.A181E)	Риск развития ОВИН
ЧБД	443	10	жен	Рекуррентные бактериальные инфекции	<i>TNFRSF13B</i> NM_012452 с.310T>C (p.C104R)	Риск развития ОВИН
ЧБД	116	8	жен	ОРВИ около 12 раз в год	<i>TNFRSF13B</i> NM_012452 с.310T>C (p.C104R)	Риск развития ОВИН

Табл. 20. Варианты с неизвестной клинической значимостью

Группа	ID	Возраст, лет	Пол	Симптомы	Варианты	Комментарии
ПИД	304	12	жен	Снижение прибавок массы и роста. Рекуррентная пиодермия, кандидоз, энтероколит. Повышенный уровень IgE (9000 – 14000 IU)	<i>STAT5B</i> NM_012448 c.1922G>A (p.W641*)	Описаны gain-of-function варианты [Klammt и др., 2018], но не в SH2-domaine, как в данном случае
ПИД	396	6	муж	Рекуррентная пиодермия, микробная экзема, плохой ответ на антибиотикотерапию	<i>FASLG</i> c.293G>C (p.G98A) вариант ранее не описан	Нет соответствия между клиникой и генотипом
ПИД	241	15	муж	Рекуррентный синусит, пневмония, хроническая диарея	<i>NFKBIA</i> c.539A>C (p.N180T)	Мутация унаследована от здоровой матери
ПИД	4	2	муж	Рекуррентные отиты и синуситы	<i>STAT1</i> NM_139266 c.1622G>A (p.R541K) VUS	Нет соответствия между клиникой и генотипом. Мутация локализуется в нетипичном домене STAT1

ПИД	101	5	жен	Рекуррентные отиты, пиогенный лимфаденит, пневмония, внутривенное применение антибиотиков	<i>PSTPIP1</i> NM_003978 с.307C>T (p.R103W)	Редкий вариант (rs768395688; MAF = 0.00001), значение неизвестно
ПИД	353	16	му ж	Резистентность к применению антибиотиков, внутривенное применение антибиотиков, повторные пневмонии, синуситы, отиты	<i>DKC1</i> NM_001363 с.838A>C (p.S280R)	Нет соответствия между клиникой и генотипом. Данная мутация была ранее выявлена у пациента с врожденным дискератозом
ПИД	149	17	му ж	Снижение прибавок массы и роста, тяжелый язвенный стоматит, язвенное поражение глотки, хроническая диарея	<i>MEFV</i> NM_000243 с.2080A>G (p.M694V)	Патогенная мутация в гетерозиготном состоянии. Нет соответствия между клиникой и генотипом
ПЛ	16	18	жен	Снижение прибавок массы и роста, периодические лихорадки	<i>PSTPIP1</i> с.796G>C (p.D266H) VUS	Описана патогенная мутация в том же кодоне p.Asp266Asn у пациента с аутовоспалительным синдромом (база данных Infevers)

ПЛ	58	4	му ж	Периодические лихорадки, лимфаденопатия	<i>PSTPIP1</i> с.1151A>G (p.D384E) VUS	Мутация описана у пациента с неклассифицированным аутовоспалительным синдромом (база данных Infevers)
ПЛ	233	9	жен	Аутоиммунный тиреоидит, алопеция, увеит, альвеолит, ревматоидный артрит	<i>MEFV</i> NM_000243 с.1105C>T (p.R408Q), сцеплена с <i>MEFV</i> с.1223G>A (p.P369S)	Патогенная мутация (низкопенетрантная) в гетерозиготном состоянии
ПЛ	417	3	му ж	Периодические лихорадки, гепатоспленомегалия, ювенильный идиопатический артрит. CINCA/NOMID?	<i>MEFV</i> NM_000243 с.1105C>T (p.R408Q), сцеплена с <i>MEFV</i> с.1223G>A (p.P369S)	Патогенная мутация (низкопенетрантная) в гетерозиготном состоянии
ПЛ	330	4	му ж	Периодические лихорадки, артрит, панникулит Крисчена- Вебера	<i>ILIRN</i> NM_173841 с.281G>T (p.C94F)	Патогенная мутация, описана при синдроме DIRA [Beck и др., 2011], в гетерозиготном состоянии
ПЛ	402	17	жен	Периодические лихорадки, язвенный колит	<i>TNFRSF13B</i> NM_0012452 с.520G>A (p.V174I)	Вариант ранее не описан, значение неизвестно

ПЛ	MG 114 4	4 мес	му ж	Псевдофурункулёз, артрит, повышенный уровень СРБ	<i>PLCG2</i> NM_002661 с.1144Т>С (р.Y482H) VUS; с.1712А>G (р.N571S) VUS	Значение выявленных мутаций неизвестно
ПЛ	414	14	му ж	Рецидивирующие лихорадки, стоматиты	<i>NLRP3</i> NM_004895 с.1085Т>А (р.L362Q) VUS	Значение выявленного варианта неизвестно
ПЛ	13	7	му ж	Периодические лихорадки, с-м Маршалла?	<i>TRAF3</i> NM_14572 с.352С>Т (р.R118W)	Выявлен патогенный вариант, однако нет соответствия с клиническими проявлениями
ПЛ	92	5	жен	Повторные ангины, лихорадки, высокая лаб. активность	<i>TRAF3</i> NM_14572 с.352С>Т (р.R118W)	Выявлен патогенный вариант, однако нет соответствия с клиническими проявлениями
Цито пени и	449	7	жен	Фурункулёз, лейкопения, нейтропения, рекуррентный стоматит	<i>PSTPIP1</i> NM_003978 с.655С>Т (р.Q219*)	Значение выявленного варианта неизвестно
Тяж инф	288	5	му ж	Рекуррентный вирусный энцефалит, снижение IgA, IgG	<i>CIQA</i> с.307А>С (р.K103Q) <i>CIQC</i> с.556G>А (р.G186S)	Дефицит C1q?

Тяж инф	87	1	жен	Ринофарингиты, отиты. Два курса антибиотиков внутримышечно за первые 6 месяцев жизни, снижение иммуноглобулинов А и М	<i>CASP10</i> NM_032977 с.1400А>Т (р.І406L)	Показана функциональная роль варианта ингибирования апоптоза [Zhu и др., 2006]
ЧБД	103	6	жен	ОРВИ 10 раз в год	<i>CASP10</i> NM_032977 с.1400А>Т (р.І406L)	
ЧБД	157	6	му ж	Рецидивирующие ангины	<i>CASP10</i> NM_032977 с.1400А>Т (р.І406L)	
ЧБД	120	13	му ж	ОРВИ 15-24 раза в год, боли в суставах, головные боли.	<i>NLRP3</i> NM_004895 с.410G>А (р. R137H)	Вариант был ранее описан у пациента с синдромом Маккл-Уэллса [Lainka и др., 2010]. Нет соответствия генотипа и фенотипа

Процент установленных причин заболевания для неселектированных больных с признаками ПИД варьирует от 14 до 46%, в среднем составляя около 25% [Yska и др., 2019]. Выявление патогенных мутаций становится значительно более эффективным при наличии жесткого предварительного отбора: так, в работе Yu et al, 2016, посвящённой исследованию пациентов со сниженными показателями TREC, удалось найти причину заболевания у 14 из 20 пациентов (70%). В то же время, исследование гетерогенных групп больных, как правило, даёт значительно более скромные результаты [Gallo и др., 2016; Kojima и др., 2016].

Следует заметить, что в наше исследование, как правило, вошли пациенты, не прошедшие исследований иммунологического статуса в объеме, необходимом в случае подозрения на первичный иммунодефицит. Иными словами, большая часть больных направлена на генетическое исследование специалистами первичного звена (гастроэнтерологи, ревматологи, эндокринологи, пульмонологи, инфекционисты); подобная специфика отбора пациентов объясняет относительно невысокий процент выявления «истинных» ПИД.

Считается, что более 70% известных форм ПИД имеют аутосомно-рецессивный тип наследования [Picard et al., 2018]; неудивительно, что подобные нозологии доминируют в странах с высоким уровнем близкородственных браков, таких как Саудовская Аравия, Тунис, Египет и т.д. [Al-Mousa et al., 2016; Galal et al., 2016; Mellouli et al., 2015]. В нашем исследовании биаллельные мутации, совместимые с аутосомно-рецессивным наследованием, были выявлены у 17 из 70 пациентов с патогенными мутациями (24%); из них лишь 4 пациента были «чистыми» гомозиготами по какому-либо варианту, что, по-видимому, отражает достаточно низкий уровень инбридинга.

К ограничениям нашей работы следует отнести невозможность детекции вариаций числа копий (CNV) для всех генов, входящих в панель. Выявление этого типа молекулярных повреждений с помощью таргетного секвенирования обычно представляет технические трудности: необходимо либо специально вносить дополнительные референсные участки, либо использовать полногеномное секвенирование; в противном случае, детекция CNV, как правило, ненадежна [Moens et al., 2014]. Следует заметить, что частота CNV, выявляемых в генах ПИД, как правило, очень невелика; нарушения копийности характерны лишь для ограниченного числа генов, таких как IL7R и DOCK8 [Engelhardt et al., 2017; Stray-Pedersen et al., 2017]. Учитывая эти факты, мы ограничились проведением MLPA-анализа при подозрении на аутосомно-рецессивный гипер-IgE синдром, при котором такой вид повреждений встречается довольно часто.

Кроме того, в связи с грандиозным прогрессом в изучении генетических детерминант ПИД отмечается постоянное «отставание» состава таргетной панели от актуального положения дел; в частности, согласно недавно вышедшему очередному пересмотру классификации IUIS на сегодняшний день число известных генов ПИД составляет уже более 480! [Tangye et al., 2022].

Теоретически, использование экзомного секвенирования для диагностики пациентов с признаками ПИД способно охватить более широкий круг нозологий, выходящих за рамки нарушений иммунной системы. Любопытно, что расширение объема исследования до экзома приводит к крайне незначительному увеличению процента выявления мутаций по сравнению с мультигенными панелями [Arts et al., 2019].

Большие перспективы в области ДНК-диагностики имеет полногеномное секвенирование; однако, в настоящий момент его применение, помимо высокой стоимости, ограничивается возможностями интерпретации значения вариантов, расположенных в некодирующих частях генома.

Пациенты, соответствующие критериям JMF

В целом, в этой группе патогенные мутации удалось выявить в 21% (44/208) случаев.

В подгруппе больных с «синдромальными» ПИД таргетное секвенирование позволило установить причину заболевания у четырех из 10 обследованных пациентов (40%). В трех случаях был подтвержден диагноз синдрома грима Кабуки; еще у одной пациентки (527) имела место пресимптоматическая диагностика атаксии-телеангиэктазии.

У всех трех неродственных больных с синдромом грима Кабуки наблюдался характерный фенотип (Рис. 6): длинные глазные щели, низкорослость, расщелина твердого и мягкого нёба, врожденные пороки сердца (дефекты межжелудочковой и межпредсердной перегородок), аномалии мочеполовой системы. Инфекционные проявления были представлены, в основном рецидивирующими обструктивными бронхитами.



Рис.6. Фенотип пациентов (253, MG721) с синдромом Кабуки. Обращает на себя внимание сходство лицевых аномалий у двух разных детей

В двух из трех случаев диагноз не был заподозрен, несмотря на подробное описание наблюдаемых стигм дизэмбриогенеза и пороков развития. Для больных с синдромом Кабуки характерны нарушения терминальной дифференцировки В-лимфоцитов, что ведет к развитию гуморального

иммунодефицита и, иногда, к аутоиммунным проявлениям [Lindsley и др., 2016].

Представляет интерес случай досимптоматической диагностики атаксии-телеангиэктазии (АТ). У девочки 9 месяцев (пациентка 527, Табл. 15), наблюдались множественные врожденные аномалии и двусторонняя нейросенсорная глухота. Проведенный микроматричный анализ показал наличие микродупликации региона 4p16.3 размером 0,8 Мб. Хотя фенотип ребенка в целом соответствовал обнаруженной хромосомной аномалии (Рис. 7), панцитопения и низкий уровень IgA не могли быть удовлетворительно объяснены наличием этого изменения.



Рис.7. Фенотип ребенка 527. Заметны гипертелоризм, макроглоссия

Таргетное секвенирование выявило две патогенные мутации *ATM* (с.1564_1565delGA и с.5932G>A); анализ ДНК родителей подтвердил, что мутации находились в транс - положении. Таким образом, один случай атаксии - телеангиэктазии был выявлен фактически случайно, путем таргетного мультигенного анализа пациента с дизморфиями и положительными критериями JMF.

В некоторых случаях (агаммаглобулинемия Брутона, атаксия - телеангиэктазия, ОВИН, ТКИН) диагноз был установлен самостоятельно на основании клиничко - лабораторных данных и генетический анализ лишь окончательно подтвердил предположения клиницистов. В то же время для

некоторых детей (пациентка 161) данные генетического исследования были абсолютно необходимы для установления редкого диагноза (тяжелая врожденная нейтропения).

У 7-летних однояйцевых близнецов была выявлена редкая мутация гена *SEMA3E* с.2108C>T (p.S703L); последующий анализ родителей показал, что мутация возникла *de novo*. Это изменение первоначально описано у пациента с типичными признаками синдрома CHARGE (радужная колобома, атрезия хоан, ушные аномалии, глухота, тетрада Фалло, умственная отсталость и низкий рост) [Lalani et al., 2004]. Наличие характерного фенотипа в отсутствие мутации *CDH7* и тот факт, что остаток 703 является консервативным у человека, мыши и крысы, позволили авторам заключить, что мутация *SEMA3E* может являться причиной синдрома CHARGE. Наряду с транслокацией *de novo* t(2;7) (p14;q21.11), приводящей к разрыву гена *SEMA3E*, описанной в той же статье, это единственное наблюдение, демонстрирующее связь между *SEMA3E* и CHARGE.

Мальчики развивались нормально до возраста двух лет. Через 2 недели после вакцинации Пневмо-23 у обоих развилась деструктивная пневмония, позднее осложненная бронхоэктазами, а у одного из сибсов - правосторонним абсцессом легкого. С момента начала посещения детского сада они страдают от рецидивирующих синопульмональных инфекций (около 10 эпизодов в год); муковисцидоз исключен с помощью потовой пробы и анализа мутаций *CFTR*. В детстве отмечались проблемы с глотанием. Близнецы страдают атопическим дерматитом, аллергическим ринитом и бронхиальной астмой; в анамнезе многократные эпизоды субфебрильной температуры, кандидоза ротовой полости и контагиозного моллюска. Наблюдается снижение уровня IgA и IgM.

Физикальное обследование не выявило типичного фенотипа, характерного для CHARGE, за исключением слегка раздвоенного язычка мягкого нёба, вероятно, указывающего на подслизистую небную расщелину. Компьютерная томография выявила признаки деформации и стеноза гортани.

Наше наблюдение, по-видимому, свидетельствует против причастности описанной мутации к развитию классического фенотипа CHARGE; при этом нельзя исключить возможную роль гена *SEMA3E* в развитии симптомов или модификации течения заболевания.

Известно, что около половины пациентов с хроническим кожно-слизистым кандидозом имеют гетерозиготные мутации в гене *STAT1* (signal transducer and activator of transcription 1) [Eslami et al., 2017; Toubiana et al., 2016]. Будучи ключевым компонентом интерферонового сигнального каскада, STAT1 обеспечивает защиту против микобактерий, грибов и вирусов, а также участвует в регуляции противоопухолевого иммунитета. Активирующие (gain-of-function) мутации *STAT1* нарушают ответ, опосредуемый Т-хелперами Th17; помимо ассоциации с кандидозом [van de Veerdonk et al., 2011; Liu et al., 2011], они упоминаются в связи с риском энцефалита, вызванного вирусом простого герпеса [Mørk и др., 2015], а также диссеминированного кокцидиомикоза, гистоплазмоза и мукормикоза [Sampaio et al., 2012; Kumar et al., 2014]. Спектр клинических характеристик дефектов *STAT1* очень разнообразен и включает инфекционные, аутовоспалительные, сосудистые и неопластические проявления [Uzel et al., 2013; Toubiana et al., 2016].

В нашей выборке мутации *STAT1* были обнаружены у 5 пациентов. У двух больных выявлена мутация с.796G>A (p.Val266Ile), затрагивающая СС (Coiled-Coil)-домен. Интересно, что клиническая картина одного из наших пациентов с данной мутацией (пациент 225) соответствует IPЕХ-подобному синдрому, тогда как в симптоматике другого пациента (256) фигурируют менингит и аутоиммунный лимфопролиферативный синдром. Следует заметить, что в последнем случае больной также гомозиготен по мутации *LRBA*, что, вероятно, вносит свой вклад в фенотип. Кроме того, функциональные исследования свидетельствуют, что влияние активирующих мутаций *STAT1* очень сильно зависит от конкретной позиции [Ovadia и др., 2018].

У двух пациентов с хроническим кожно-слизистым кандидозом (пациенты 303, 339) выявлены мутации с.604A>G (p.M202V) и с.69T>G (p.D23E). Первая мутация неоднократно описана в связи с моногенными формами кандидоза [Liu et al., 2011, Toubiana et al., 2016], в то время как информация о второй отсутствует. Мутация с.69T>G (p.D23E) расположена в N-терминальном домене *STAT1*; патогенная роль дефектов этого домена хорошо известна [Toubiana et al., 2016]. Это обстоятельство, а также соответствие генетических данных клиническим проявлениям, позволяет расценивать данный аллель как вероятно патогенный. Еще один вариант, с.1622G>A (p.R541K), обнаружен у больного с рекуррентными отитами и синуситами (пациент 4). В данном случае патогенность выявленной мутации неочевидна, так как она расположена в линкерном домене, в котором не описаны активирующие мутации; кроме того, симптоматика нехарактерна для дефектов *STAT1*. Для выяснения роли обнаруженных новых вариантов требуется проведение функциональных экспериментов (анализ ДНК-связывающей способности и фосфорилирования *STAT1*).

3.4.2. Пациенты с атаксией-телеангиэктазией

У всех детей с подозрением на АТ наблюдался повышенный уровень АФП в крови (43.0 – 1571.0, в среднем 361.7 МЕ/мл; норма для лиц старше года 0 - 5.8 МЕ/мл). Секвенирование гена *ATM* подтвердило диагноз АТ у всех 17 пациентов (Табл.21). Три патогенных аллеля, а именно с.5932G>T (p.E1978*); с.450_453delTTCT (p. S151*) и с.1564_1565delGA (p. E522Ilefs*43) были обнаружены более одного раза.

Мутация с.5932G>T была выявлена у 11 из 15 пациентов (73%) славянского происхождения; пациенты 185 и 434 были гомозиготными по этому аллелю. Кроме того, она в составе компаунд-гетерозиготы обнаружена

у пациентки 527 (Табл. 17), которая обследовалась в группе синдромальных ПИД, поскольку у неё отсутствовала атаксия.

Повторяющаяся мутация c.450_453delTTCT выявлена у пациентов 172 и 360; еще трое детей (186, 527, 1191) были обладателями хорошо известного патогенного варианта c.1564_1565delGA. Оба эти аллеля обнаруживались в сочетании с другими транквирующими мутациями *ATM*.

Таргетное секвенирование пациента 438 первоначально выявило только гетерозиготную мутацию c.5932G>T, что недостаточно для подтверждения диагноза аутосомно-рецессивного заболевания. Мы предположили, что оставшийся аллель может быть инактивирован за счет крупной делеции или дупликации. Анализ файла .bam выявил снижение среднего покрытия (т.е., вероятное уменьшение копийности) области генома hg19 11: 108235808 - 108239829, соответствующего экзонам 62 и 63 гена *ATM*. MLPA-тест этого образца подтвердил наличие делеции. Таким образом, в 16 изученных семьях был обнаружен один случай крупной перестройки *ATM* (6%).

Также были выявлены четыре ранее не описанных наследственных варианта *ATM* (Табл. 18). Эти мутации (c.5254_5255insGT, p.(I1752Sfs*5); c.3554T> A, p.(L1185*); c.494T> G, p.(L165*); c.1571G>A, p.(W524*)) были обнаружены в сочетании с известными патогенными аллелями *ATM*. Мутация *ATM* c.3554T>A (p.L1185*) была выявлена у двух пациентов, принадлежащих к одной и той же алтайской семье. Вариант c.1571G>A (p.W524*) ранее упоминался в качестве соматического события в костном мозге человека с мантийноклеточной лимфомой [Eskelund et al., 2017], но никогда не был описан как мутация, вызывающая АТ. Анализ ДНК родителей показал, что у всех пяти пациентов (172, 188, 189, 441 и 1026) мутации располагались в транс-положении. Информация обо всех новых вариантах внесена в базу данных LOVD.

Табл.21. Характеристики пациентов с признаками атаксии-телеангиэктазии

ID	Возраст, лет	Пол	Клинические признаки	АФП, МЕ/мл	Аллель 1	Аллель 2
172	4	м	Атаксия, низкий IgA и IgG	-	c.450_453delTTCT, (p.S151*)	c.5254_5255insGT, (p.I1752Sfs*5)
185	15	м	Атаксия, телеангиэктазия; синуситы, этмоидиты; низкий IgA. Острый лимфобластный лейкоз в возрасте 13 лет	144.8	c.5932G>T, (p.E1978*)	c.5932G>T, (p.E1978*)
186	13	м	Атаксия, телеангиэктазия; пятна «кофе с молоком», хроническая пневмония, синусит, бронхолит, некротический васкулит пальцев кистей и стоп; низкие IgA, IgG, IgM	43.0	c.1564_1565delGA, (p.E522Ifs*43)	c.7240C>T, (p.E2414*)
188	5	ж	Атаксия, телеангиэктазия, дизартрия; хронический обструктивный бронхит; низкие IgA и IgG	110.5	c.2413C>T, (p.R805*)	c.3554T>A, (p.L1185*)
189 (брат паци ентк и 188)	7	м	Атаксия, телеангиэктазия, дизартрия; пятна «кофе с молоком», ринофарингит; низкий IgA	132.0	c.2413C>T, (p.R805*)	c.3554T>A, (p.L1185*)
250	12	м	Атаксия, телеангиэктазия, дизартрия; пятна «кофе с молоком»; низкие IgA, IgM, IgG	371.2	c.1339C>T, (p.R447*)	c.8287C>T, (p.R2763*)

254	11	ж	Атаксия, телеангиэктазия; пятна «кофе с молоком»; снижение прибавок по росту и массе, мигренеподобные головные боли; уровень иммуноглобулинов не снижен	322.0	c.3802delG, (p.V1268*)	c.5932G>T, (p.E1978*)
255	3	ж	Атаксия, телеангиэктазия; пятна «кофе с молоком»; снижение IgA и IgG	93.9	c.5932G>T, (p.E1978*)	NG_009830.1(ATM_v001):c.7630-2A>C
298	17	м	Атаксия, телеангиэктазия, дизартрия; низкий IgA; лимфома Ходжкина в возрасте 15 лет	278.3	NG_009830.1 (ATM_v001): c.5497-1G>A	c.5932G>T, (p.E1978*)
360	3	ж	Атаксия, телеангиэктазия; лейкопения; низкий IgG	84.9	c.450_453delTTCT, (p.S151*)	c.8977C>T, (p.R2993*)
364	10	ж	Атаксия, телеангиэктазия, дизартрия; пятна «кофе с молоком», остеомиелит; снижение числа В-клеток, низкий IgA	139.6	c.5932G>T, (p.E1978*)	c.6095G>A, (p.R2032L)
434	13	ж	Атаксия, телеангиэктазия	1133.0	c.5932G>T, (p.E1978*)	c.5932G>T, (p.E1978*)
438	13	ж	Атаксия, телеангиэктазия; лейкопения, уровень иммуноглобулинов не снижен	845.8	c.5932G>T, (p.E1978*)	NG_009830.1(NM_000051.3):c.(9235+1_9236-1)_(13146+1_13148-1)del

441	6	м	Атаксия, телеангиэктазия; внутривенное применение антибиотиков при инфекциях; лейкопения, низкий IgA	159.2	с.494Т>G, (p.L165*)	с.5932G>T, (p.E1978*)
444	5	м	Атаксия, телеангиэктазия; снижение числа Т-лимфоцитов; низкие IgA, IgM, IgG	1571.0	с.4642_4645delGA TA, (p.D1548Tfs14*)	с.5932G>T, (p.E1978*)
1026	8	м	Атаксия, телеангиэктазия, дизартрия; 2 гипопигментных пятна на коже, окулоmotorная апраксия; снижение числа Т-лимфоцитов, CD3+CD25+ клеток, повышение NK, низкий IgA	288.6	с.5932G>T, (p.E1978*)	с.1571G>A, (p.W524*)
1191	2	м	Атаксия, дизартрия, отиты, пятна «кофе с молоком», снижение IgA, IgG	70.0	с.1564_1565delGA, (p.E522Ifs*43)	с.5188C>T (p.R1730*)

Восточноевропейские славяне, которые составляют большинство населения в Польше, России, Украине и Беларуси, демонстрируют заметную однородность по спектру патогенных аллелей и, по-видимому, образуют крупнейшее в мире сообщество, обладающее «эффектом основателя». Настоящее исследование подтверждает эту тенденцию, продемонстрировав значительный вклад повторяющихся мутаций в заболеваемость АТ в России.

Известно, что аллель с.5932G>T, (p.E1978*), наиболее часто встречающийся в настоящем исследовании, распространен в России [Birrell et al., 2005; Bogdanova et al., 2009; Mitui et al., 2005], Польше [Mitui et al., 2005; Podralska et al., 2014], Чешской Республике [Soukupova et al., 2008; Soukupova et al., 2011], Беларуси и Украине [Bogdanova et al., 2009]. Интересно, что этот вариант был первоначально обнаружен в семьях североамериканских меннонитов [Mitui et al., 2005; Telatar et al., 1998]. Менониты проживали в России до конца XIX века; они были вынуждены покинуть страну в связи с введением обязательной военной службы, которая оказалось несовместимой с их религиозными убеждениями.

Мутация АТМ с.1564_1565delGA неоднократно описывалась во многих популяциях по всему миру [Campbell et al., 2003; Demuth et al., 2011; Stankovic et al., 1998], включая страны с преимущественно славянской популяцией [Birrell et al., 2005; Mitui et al., 2005; Soukupova et al., 2011]. Хотя вышеуказанные мутации хорошо известны из предыдущих исследований, третья повторяющаяся мутация, АТМ с.450_453delТТСТ, (p.S151*), имеет очень низкую частоту в соответствии с базой данных ExAC и никогда не наблюдалась в предыдущих исследованиях с участием славянских пациентов. Этническое и географическое распределение этого аллеля заслуживает дальнейшего изучения. Описаны два других славянских аллеля (с.7630-2A>C и с.6095G>A), которые распространены в Польше [Mitui et al., 2005; Podralska et al., 2014]; однако в нашем исследовании эти варианты не относились к повторяющимся.

Крупные генные перестройки, как правило, редко встречаются у пациентов с АТ [Carranza et al., 2017; Cavalieri et al., 2008; Savitsky et al., 1995; Telatar et al., 1998]. Есть два опубликованных славянских исследования, в которых исследовался этот тип мутаций. Podralska et al., 2014 сообщили о масштабных дефектах *ATM* у 2 из 24 польских пациентов (8%); у одного из них было выявлена делеция экзонов 62-63 гена *ATM*, обнаруженная в настоящем исследовании. Soukurova et al., 2011 проанализировали 11 чешских и словацких семей с АТ и не обнаружили случаев крупных перестроек *ATM*. В соответствии с другими авторами, наша работа подтвердила пригодность таргетного NGS для обнаружения больших делеций/дупликаций [Kerkhof et al., 2017; Sanchez-Navarro et al., 2018].

Таким образом, настоящее исследование демонстрирует, что более половины мутаций *ATM* у российских пациентов представлены повторяющимися патогенными аллелями. Эти данные должны быть приняты во внимание при планировании обследования больных с подозрением на АТ и, возможно, рассмотрении вопроса о целесообразности скрининга данного синдрома.

3.4.3. Синдром Блума

Реестр синдрома Блума описывает несколько десятков различных мутаций в гене Блума, и многие из них, по-видимому, являются повторяющимися [German et al., 2007]. Однако до настоящего времени этническая специфичность вариантов зарегистрирована только у евреев-ашкенази, у которых популяционная частота аллеля с.2207_2212delATCTGAinsTAGATTC (*BLMAsh*) приближается к 0.4-1% [Fares et al., 2008]. Высокая частота варианта *BLM* с.1642C>T (p.Q548*),

выявленная нами при поиске новых генов наследственного РМЖ, подразумевает его возможную роль в качестве славянской founder-мутации.

Люди славянского происхождения проживают в России, Польше, Украине, Белоруссии, Литве и некоторых других европейских странах, а также составляют значительную часть жителей Северной Америки. Для славян характерен удивительно сильный эффект основателя [Balanovsky et al., 2008; Ferla et al., 2007; Iyevleva et al., 2010; Sokolenko et al., 2007], что имеет большое практическое значение для медицинской генетики.

Проведенные исследования свидетельствуют, что частота гетерозиготных носителей *BLM* с.1642C>T (p.Q548*) в славянских популяциях обычно находится в пределах 0.2-0.6% (Табл. 22). Если предположить, что общее число славян в мире близко к 300 миллионам человек, причем почти половина из них проживает в России, можно ожидать, что в настоящее время синдромом Блума могут страдать от 300 до 2700 человек славянского происхождения.

Табл. 22. Частота мутации *BLM* с.1642C>T (p.Q548*) у людей славянского происхождения

Ссылка	Страна/регион	Частота гетерозигот
Sokolenko et al., 2012 (настоящее исследование)	Санкт-Петербург	5/2184* (0.23%)
Prokofyeva et al., 2013	Белоруссия, только женщины	2/1235* (0.16%)
Antczak et al., 2013	Польша, только мужчины	15/2604* (0.58%)
Anisimenko et al., 2014	Новосибирск	35/7920 (0.44%)
Bogdanova et al., 2014	Уфа	0/604* (0)

*не страдающие злокачественными новообразованиями

Возможно, фактическое число распространенных случаев несколько ниже, учитывая сокращение продолжительности жизни у пациентов [Arora et al., 2014; Cunniff et al., 2017; German et al., 2007]

Исходя из полученных сведений о высокой частоте мутации *BLM* с.1642С>Т у жителей Российской Федерации [Sokolenko et al., 2012], мы предпринимали попытки поиска пациентов с синдромом Блума в основных медико–генетических центрах России, однако они не увенчались успехом. Тем не менее, два случая синдрома Блума были впоследствии выявлены случайно.

Первый ребенок (Рис.8) родился от родителей, проживающих в Республике Татарстан; его мать имела смешанные русские и татарские корни, а отец был этническим русским. Мальчик постоянно наблюдался в эндокринологическом центре в связи с низкорослостью. Несмотря на то, что он получил генетическое консультирование, диагноз синдрома Блума не был заподозрен; врач–генетик предположил наличие синдрома Корнелии де Ланге. В возрасте 5 лет его случайно привели в кабинет врача-иммунолога только потому, что его нельзя было оставить дома одного. Врач обратил внимание на особенности его лица, собрал соответствующую клиническую информацию и, в конечном итоге, предложил диагноз синдрома Блума.



Рис. 8. Пациент 1 в возрасте 5 и 12 лет.

Второй ребенок, родившийся от неродственных российских родителей, происходящих из разных регионов России (Архангельск и Краснодар),

постоянно наблюдался иммунологами, клиническими генетиками и эндокринологами по поводу низкого роста и рецидивирующих инфекций (Рис.9). Иммунологическое исследование показало снижение уровня иммуноглобулинов всех классов.



Рис. 9. Пациент 2 в возрасте 1 года и 6 лет.

Сравнительные характеристики пациентов представлены в Табл.23.

Табл.23. Характеристики обследованных пациентов с синдромом Блума

Пациент	При рождении	Трудности при кормлении	Рост	Лицо	Кожные покровы	Инфекции	Иммунный статус	Опухоли	Другие симптомы
#1, муж, 12 л., Казань	ЗВУР; длина 44 см, масса 1765 г, окружность головы 28 см, Апгар 7-8	+	138 см (-1.6 SD)	Удлиненное лицо, крупные нос и уши	Множественные пятна «кофе с молоком», эритема около носа, индуцированная инсоляцией; себорейный дерматит на месте эритемы с 9 лет	Рекуррентные респираторные инфекции, 2 эпизода пневмонии (в 10 и 12 лет), хронический ринит	Низкий IgM	-	Дефицит подкожной жировой клетчатки в препубертате; преждевременное половое созревание с избытком массы тела
#2, муж, 6 л., Санкт-Петербург	ЗВУР, длина 50 см, масса 2850 г, окружность головы 33.5 см, Апгар 7-8	+	105 см (-2.1 SD)	Удлиненное лицо, крупный нос	-	Пневмония на 1-м году жизни, рекуррентные респираторные инфекции; энтероколит и пневмония в ходе химиотерапии	Низкие IgA, IgM, IgG Снижение TREC	Медуллобластома в возрасте 5 лет	Дефицит подкожной жировой клетчатки; хроническая диарея, непереносимость лактозы

ЗВУР – задержка внутриутробного развития

Вызывает удивление, что, по крайней мере, двое из клинических генетиков, участвовавших в его консультировании, знали о существовании founder-мутаций *BLM* в России, но все же не рассматривали синдром Блума в качестве возможного диагноза. Генетическое обследование (таргетное секвенирование нового поколения) было проведено в связи с наличием признаков подозрения на первичный иммунодефицит (хроническая диарея, частые респираторные инфекции); была обнаружена мутация *BLM* с.1642C>T (p.Q548*) в гомозиготном состоянии. К сожалению, в возрасте 6 лет у мальчика развилась десмопластическая медуллобластома, которая, несмотря на проводимую химиотерапию, стала причиной смерти.

Генетическое тестирование пациента 1 было проведено в возрасте 12 лет; поскольку у пациента 2 была выявлена гомозигота по аллелю (p.Q548*), анализ начали с исследования этой мутации; она была обнаружена в гетерозиготном состоянии. Для выявления второй мутации пришлось прибегнуть к секвенированию всей последовательности *BLM*. В итоге обнаружена вторая мутация - с.2512C>T (p.Q838*). Учитывая, что мать мальчика имеет «славянский» аллель с.1642C>T (p.Q548*), замена с.2512C>T почти наверняка была передана ребенку от ее мужа; мы не смогли подтвердить этот факт, так как этот человек погиб несколько лет назад в результате несчастного случая. Вариант *BLM* с.2512C>T (p.Q838*) ранее не описан; он затрагивает домен хеликазы DEAH. Нам не удалось обнаружить этот аллель в группе 575 здоровых жителей Санкт-Петербурга. Учитывая, что отец пациента происходил из семьи, проживающей в Татарстане, целесообразно изучение популяционной частоты варианта в этом географическом регионе.

Общими для пациентов характеристиками были наличие задержки внутриутробного развития, микроцефалия, низкорослость умеренной степени (-2SD), трудности при кормлении. Фенотипически оба ребенка имели удлиненное лицо, крупный нос. В обоих случаях наблюдалось снижение уровня одного или нескольких классов иммуноглобулинов, а также

рекуррентные респираторные инфекции, которые были основным поводом для обследования.

Длительное, как правило, многолетнее, опоздание с установлением правильного диагноза является типичной проблемой для большинства орфанных заболеваний [Schieppati et al, 2008; Dharssi et al, 2017]. Реестр пациентов с синдромом Блума [<http://weill.cornell.edu/bsr/>] не даёт информации о других случаях этого заболевания в странах с преимущественно славянским населением. Представляется вероятным, что больные могут быть пропущены из-за отсутствия надлежащей бдительности среди медицинских работников. Диагноз СБ может быть непростым, учитывая, что единственными относительно постоянными признаками являются низкорослость и эритема, индуцированная инсоляцией, тогда как наличие других характеристик заболевания может варьировать [German et al., 2007]. Кроме того, большинство пациентов с СБ, описанных в литературе, являются носителями аллеля *BLMAsh*, характерного для евреев-ашкенази [German et al., 2007; Arora et al., 2014; Cunniff et al., 2016]. Предстоит выяснить, влияет ли локализация инактивирующей мутации *BLM* на клиническую картину заболевания. Например, у второго ребенка, описанного в нашем исследовании, наблюдалась неполная картина СБ, то есть у него отсутствовала лицевая эритема, вызванная солнечными лучами (Рис. 8). У ребенка 1 (Рис. 7) эритема наблюдалась, но была выражена достаточно слабо и не имела характерного вида «бабочки». Важно признать, что диагноз СБ у описанных нами больных был установлен исключительно по факту биаллельной инактивирующей мутации *BLM*; к сожалению, анализ обмена сестринских хроматид, который является стандартным инструментом для диагностики СБ, был недоступен для этих пациентов.

Неясно, связано ли отсутствие кожных симптомов с низкой инсоляцией, фенотипическим эффектом мутации *BLM* с.1642C>T (Q548*) или другими факторами. Если атипичный вариант синдрома, с отсутствием кожных

проявлений, действительно характерен для гомозиготных носителей мутации *BLM* с.1642C>T (p.Q548*), это может правдоподобно объяснить низкую эффективность диагностики СБ в славянских странах. В поддержку такой точки зрения свидетельствует описание трех сибсов с признаками синдрома Блума из Словакии [Vojtková et al, 2016]: все они были гомозиготны по мутации p.Q548* и у всех отсутствовала лицевая эритема. По всей видимости, отсутствие кожных проявлений встречается не только у обладателей славянской мутации. В частности, описана 36-летняя женщина из Нидерландов с низкорослостью, микроцефалией, врожденным гипотиреозом, преждевременной менопаузой и носоглоточной карциномой. Генетический анализ выявил у неё компаунд-гетерозиготу по аллелям *BLM* с.2207_2212delinsTAGATTC (p.Tyr736Leufs*5) и с.3681del (p.Lys1227Asnfs*52); лицевая эритема у неё отсутствовала на момент обследования и не наблюдалась никогда ранее [Vouman et al, 2018].

Учитывая, что тестирование на рецидивирующую мутацию *BLM* с.1642C>T (Q548*) отличается простотой и невысокой стоимостью, мы считаем целесообразным выполнять анализ всех индивидуумов славянского происхождения, даже имеющих хотя бы один из признаков СБ (низкий рост, необычная чувствительность кожи к инсоляции, дефицит подкожного жира, рецидивирующие инфекции, развитие злокачественной опухоли в молодом возрасте и т. д.), на наличие этого аллеля. Ожидаемо, спектр мутаций гена *BLM* не ограничивается *BLM* с.1642C>T даже в славянских популяциях, поэтому следует всегда проводить секвенирование всего гена у субъектов с гетерозиготной мутацией *BLM* с.1642C>T (Q548*) и/или комбинацией клинических признаков СБ. Эти усилия помогут выявить новых пациентов с СБ, а также уточнить частоту атипичных вариантов с неполными фенотипическими проявлениями.

3.4.4. Прочие иммунодефициты

Пациенты с периодическими лихорадками (ПЛ)

В группе пациентов с периодическими лихорадками (ПЛ) генетическое исследование способствовало установлению точного диагноза в 16/63 (25%) случаев; еще в 16% выявлены варианты, связь которых с развитием фенотипических проявлений заболевания нуждается в дальнейшем изучении.

Отмечены случаи выявления биаллельных мутаций, несомненно, приводящих к развитию аутосомно-рецессивных заболеваний (семейная средиземноморская лихорадка, синдром HIDS; пациенты 229, MG1142, 557, MG1153). Гораздо сложнее поддается интерпретации соответствие генотипа и фенотипа при обнаружении гетерозиготных мутаций. В частности, у 4 пациентов (149, 135, 228, MG1101, Табл.17) выявлены моноаллельные мутации *MEFV* p.M694V, p.R354W и p.R726A, ранее описанные как патогенные. При этом у пациента 149 отсутствуют периодические лихорадки, но отмечаются позитивные JMF-критерии (снижение прибавок массы и роста, хроническая диарея); в данном случае трактовка связи генотипа и фенотипа затруднительна. В одном случае (пациент 94) найден новый аллель гена *MEFV*. Еще у двух детей с периодическими лихорадками (пациенты 233, 417) обнаружены сцепленные варианты p.R408Q и p.P369S, сведения о причастности которых к развитию заболевания противоречивы: по-видимому, они представляют собой мутации с неполной пенетрантностью [Ryan et al., 2010; Yamagami et al., 2017; Karacan et al., 2019].

Накапливается всё больше свидетельств в пользу того, что наследование семейной средиземноморской лихорадки не укладывается в рамки традиционного аутосомно-рецессивного механизма [Gangemi et al., 2018; Stella et al., 2019]. Хотя симптоматика пациентов с гетерозиготными

мутациями, как правило, не соответствует классической картине периодической болезни, моноаллельные дефекты *MEFV*, по-видимому, связаны с развитием аутовоспалительных проявлений [Koné-Paut et al., 2009; Ryan et al., 2010; Para et al., 2017].

В качестве случайных находок, напрямую не связанных с клиническими проявлениями, следует упомянуть обнаружение аллеля *TRAF3* с.352C>T (p.R118W) у двух больных с периодическими лихорадками (пациенты 13 и 92). Ген *TRAF3* функционально связан с рецептором TLR3 (Toll-like receptor 3), участвующим в распознавании двунигетовой РНК - побочного продукта репликации большинства вирусов, включая ВПГ1 [Lim et al., 2014]. Упомянутый вариант был описан у пациентов с энцефалитом, вызванным вирусом простого герпеса [Pérez de Diego et al., 2010], однако, судя по всему, обладает неполной пенетрантностью и расценивается как фактор риска развития ВПГ1-ассоциированного энцефалита. Патогенная мутация *TLR3* [Mørk et al., 2015] была найдена у девочки, перенесшей подтвержденный тяжелый герпетический менингоэнцефалит (пациентка 197).

Пациенты с аутоиммунными цитопениями

В группе детей с аутоиммунными цитопениями (аутоиммунная гемолитическая анемия, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, синдром Фишера-Эванса) эффективность выявления мутаций оказалась весьма низкой: патогенные варианты удалось выявить лишь у четырех из 31 больных (13%), причем в трех случаях феномен цитопении сочетался с лимфопролиферативным синдромом. В частности, у пациентки 183 была обнаружена новая мутация *FAS* с.786C>G (p.I262M).

Следует заметить, что в эту группу не входили те пациенты, у которых аутоиммунные цитопении наблюдались в сочетании с положительными критериями ЛМФ; таких случаев было еще два (Табл.19, пациенты 372 и 373), и у обоих были выявлены патогенные мутации, подтверждающие диагноз лимфопролиферативного заболевания. Таким образом, если бы за основной критерий отбора было выбрано подозрение на аутоиммунный лимфопролиферативный синдром (лимфопролиферация, гепатоспленомегалия, аутоиммунные цитопении), то патогенные мутации были бы выявлены у 4 из 18 пациентов (22%).

Нередко у пациентов с первичными иммунодефицитами, в первую очередь, с ОВИН, наблюдается сочетание инфекционных проявлений с лабораторным феноменом аутоиммунной цитопении (тромбоцитопеническая пурпура, аутоиммунная гемолитическая анемия, синдром Фишера-Эванса) [Azizi et al., 2017; Ghosh and Seidel, 2016; Martínez-Valdez et al., 2017]. Результаты нашего исследования свидетельствуют, что шансы обнаружения генетических дефектов в группе больных с аутоиммунными цитопениями выше в случае наличия у них лимфопролиферативного синдрома. Так, все пациенты, у которых были найдены патогенные мутации, соответствовали критериям диагноза аутоиммунного лимфопролиферативного синдрома, т.е., помимо лимфопролиферации и цитопении имели двойные негативные Т-лимфоциты в периферической крови. Стоит отметить, что хотя цитопении во много раз чаще встречаются у пациентов с ПИД, а также нередко бывают первыми причинами иммунодефицитов, их причины отнюдь не ограничены состояниями, входящими в современную классификацию IUIS [Fischer et al., 2017; Glaubach et al., 2014; Locatelli and Strahm, 2018].

Пациенты с повышенным уровнем IgE

Из 6 пациентов с изолированным феноменом повышенного уровня иммуноглобулина Е патогенные/вероятно патогенные варианты не были выявлены ни в одном случае. Известно, что повышенное содержание IgE (>3000 U/mL) может наблюдаться как при ряде первичных иммунодефицитов (гипер-IgE синдром, синдромы Вискотта-Олдрича, Нетертон, Оменн), так и при atopическом дерматите, синдроме Чарга-Стросса (эозинофильный васкулит) и т.д. [Ponsford et al, 2018]. Полученные нами результаты свидетельствуют, что изолированное повышение этого параметра само по себе не свидетельствует о наличии генетического дефекта иммунной системы. Однако, в 2020-2021 году открыто несколько новых генов, ассоциированных с гипер-IgE синдромом [Tangye et al., 2022], которые не входят в состав использованной нами панели.

Дети с рекуррентными респираторными инфекциями

В исследование также были включены существенно более трудно формализуемые группы детей с рекуррентными инфекциями, а именно, дети с высокой частотой инфекционных эпизодов («часто болеющие дети», ЧБД) и пациенты с тяжелым течением инфекций. Очевидно, что большинство детей из этих групп не являются обладателями наследственных дефектов иммунитета, однако, характер и частота инфекционных эпизодов вызывают тревогу родителей и существенно снижают качество жизни семей.

Неудивительно, что частота патогенных мутаций, выявленных в группе часто болеющих, оказалась невелика - 3/54 (6%). Эти результаты согласуются с современными представлениями об особенностях ЧБД. Известно, что частота инфекционных эпизодов сама по себе не является надежным признаком ПИД [Wågström et al., 2015]. Нередко феномен рекуррентных ОРВИ является отражением процесса функционального созревания иммунной

системы. Повышенную частоту заболеваний у детей в первую очередь связывают с нахождением в детских учреждениях, где они впервые встречаются с большим скоплением людей и, соответственно, активно контактируют с новыми микроорганизмами. Причинами частых инфекций также могут быть проблемы питания и нерациональное применение антибиотиков.

Показательным в этом отношении является исследование Зиновьевой и соавт., в котором у детей с частыми инфекциями проводилось исследование основных иммунологических показателей (IgA, IgM, IgG, подклассы IgG2 и т.д.). Оказалось, что среди детей с изолированными рецидивирующими вирусными инфекциями иммунологические изменения выявляются редко. При сочетании рецидивирующих вирусных и бактериальных инфекций или наличии тяжелых бактериальных инфекций могут обнаруживаться «малые» дефекты В-клеток, такие как селективный дефицит IgA, дефицит субклассов IgG, селективный дефицит специфических антител, транзиторная гипогаммаглобулинемия детского возраста [Зиновьева и соавт., 2007]. В нашей работе у детей из этой группы не установлено ни одной мутации, четко свидетельствующей о наличии ПИД; все обнаруженные варианты относятся к слабопенетрантным. Выявленные аллели *TNFRSF13B* с.310T>C (p.Cys104Arg) и с.542C>A (p.Ala181Glu) часто расцениваются в качестве факторов риска развития ОВИН; в настоящий момент иммунологических признаков этого заболевания у носителей мутаций не наблюдается. По-видимому, такие дети нуждаются в динамическом наблюдении, так как упомянутые варианты с существенно более высокой частотой встречаются у больных ОВИН [Salzer et al, 2005].

Многие дети формально не укладываются в критерии JMF, однако страдают тяжело протекающими вирусными инфекциями. Необычная уязвимость по отношению к вирусам может иметь генетическую основу - например, наблюдаться при дефекте Toll-like рецепторов, натуральных

киллеров, рецепторов IFN- γ или других компонентов врожденного иммунитета [Dropulic and Cohen, 2011; Rezaei et al., 2011]. В этой группе единственным выявленным генетическим повреждением оказалась мутация *TLR3*; она привела к развитию тяжелого менингоэнцефалита, вызванного вирусом простого герпеса (ВПГ). При этом, еще у двух пациентов были случайно выявлены ранее описанные патогенные варианты *TRAF3*, ассоциированные с риском ВПГ-ассоциированного энцефалита, но никак не проявляющие себя.

3.4.5. Оценка популяционной частоты повторяющихся мутаций

Некоторые варианты генов ПИД были обнаружены у двух и более пациентов. Всего выявлено 13 повторяющихся вариантов: *AIRE* p.R257*, *ATM* p.E1978*, *NBN* c.657del5, *DCLRE1C* p.L187*, *MEFV* p.M694V, *MEFV* p.V726A, *MEFV* p.R408Q, *STAT1* p.V266I, *TNFRSF13B* p.C104R, *CASP10* p.I406L, *NLRP12* p.H304Y, *NLRP12* c.R352C и *TRAF3* p.R118W.

Мутация *AIRE* p.R257* была обнаружена у двух больных (пациенты 369, Fu7878), в гомозиготном состоянии и в виде компаунд-гетерозиготы. Этот вариант хорошо известен в европейских популяциях [Heino и др., 2001], в том числе и в России [Orlova et al., 2010, 2017]; он приводит к развитию аутоиммунного полиэндокринного синдрома типа 1 (APECED), который характеризуется сочетанием полиэндокринопатии, кандидоза и признаков эктодермальной дисплазии. У одного из пациентов обнаружение этой мутации оказалось неожиданным, поскольку клиническая картина, за исключением кандидоза, не позволяла заподозрить APECED. В данном случае обнаружение мутации привело к изменению стратегии лечения, поэтому этот вариант тестирования следует рекомендовать всем пациентам с хроническим кандидозом слизистых оболочек.

У двух пациентов обнаружена мажорная «славянская» мутация *NBN* с.657_661del (657del5), популяционная частота которой в России была оценена ранее [Buslov et al., 2005; Resnick et al., 2003]. Примечательно, что фенотипические особенности больных были своевременно распознаны и ДНК-диагностика синдром Ниймеген проводилась с использованием простого и недорогого ПЦР-теста.

Мутация *ATM* с.5932G>T, доминирующая в группе пациентов с атаксией-телеангиэктазией, не была обнаружена в группе из 673 здоровых доноров.

Варианты *TNFRSF13B* с.310T>C (р.С104R), *CASP10* с.1216A>C (р.І406L) и *TRAF3* с.352C>T (р. R118W), сведения о патогенности которых не всегда однозначны, были проверены на предмет их встречаемости у здоровых индивидуумов (Табл. 24). Сравнение частот этих аллелей в группе пациентов с рекуррентными инфекциями и здоровых доноров не продемонстрировало статистически значимых различий.

Вызывает интерес «обогащение» группы детей с высокой частотой инфекционных эпизодов («часто болеющих детей», ЧБД) в отношении некоторых аллелей. Так, вариант *CASP10* с.1216A>C (р.І406L) обнаружен у 3 из 54 ЧБД и лишь у 1 из 500 здоровых доноров ($p = 0.0033$). Существует описание данного варианта у пациентов с аутоиммунным лимфопролиферативным синдромом (АЛПС) и продемонстрирована его функциональная роль в ингибировании апоптоза [Zhu и др., 2006]. В нашем исследовании этот аллель не был выявлен у больных с АЛПС; его связь с частыми инфекционными эпизодами нуждается в объяснении.

Аллель *TNFRSF13B* с.310T>C (р.С104R) наблюдался в исследуемой группе в 6 случаях (у трех пациентов из группы ПИД и трех детей из группы ЧБД); частота существенно отличается между группами ЧБД (2/54, 4%) и здоровых доноров (2/500, 0.4%), $p = 0.0493$). При этом клинико-лабораторные признаки соответствовали диагнозу ОВИН только у больных из группы ПИД.

Табл. 24. Повторяющиеся варианты в генах первичных иммунодефицитов: сравнение с группой здоровых доноров

Ген (OMIM)	Нуклеот. позиция	АК позиция	dbSNP, rs	Частота редкого аллеля, ExAC	Ассоциированное заболевание	Данные о патогенности (ClinVar)	Частота в группе ПИД	Частота в группе здоровых доноров	p
<i>ATM</i> (*607585)	c.5932G>T	p.E1978*	587779852	0.00007	Атаксия – телеангиэктазия	Патогенная мутация	11/17 ¹ (65%)	0/623	ns
<i>TNFRSF13B</i> (*604907)	c.310T>C	p.C104R	34557412	0.00321	Общая варибельная иммунная недостаточность	Фактор риска	6/383 (2%) 2/54 ² (4%)	2/500 (0.4%)	ns 0.0493
<i>CASP10</i> (*601762)	c.1216A>T	p.I406L	80358239	0.00494	Аутоиммунный лимфопролиферативный синдром	Неоднозначная информация о патогенности	3/383 (0,8%)	1/500 (0.2%)	ns
<i>TRAF3</i> (*601896)	c.352C>T	p.R118W	143813189	0.00121	Энцефалит, вызванный вирусом простого герпеса	Фактор риска	2/383 (0,5%)	0/559	ns
<i>NLRP12</i> (*609648)	c.1054C>T	p.R352C	199881207	0.00035	<i>NLRP12</i> -ассоциированный аутовоспалительный синдром / FCAS	Патогенная мутация (FCAS)	2/383 (0,5%) 2/63 ³ (3%)	0/559	ns
	c.910C>T	p.H304Y	141245482	0.00424	<i>NLRP12</i> -ассоциированный аутовоспалительный синдром	Неоднозначная информация о патогенности	5/383 (1%) 5/63 ³ (8%)	3/500 (0.6%)	ns 0.0006

¹частота в группе пациентов с атаксией-телеангиэктазией; ²частота в группе ЧБД; ³частота в группе пациентов с периодическими лихорадками; FCAS – семейный холодовой аутовоспалительный синдром

Часто болеющие дети, несущие гетерозиготный вариант *TNFRSF13B*, очевидно, заслуживают дальнейшего наблюдения, включая регулярное иммунологическое обследование.

Ген *TNFRSF13B* кодирует клеточный рецептор TACI, расположенный на поверхности В-лимфоцитов. Последний, взаимодействуя с лигандами, играет роль в обеспечении жизнеспособности и дифференцировки В-клеток. Молекула *TNFRSF13B/TACI* относится к суперсемейству рецепторов фактора некроза опухоли (TNF); она связывает BAFF (B-cell Activating Factor) и APRIL (AProliferation-Inducing Ligand), необходимые для переключения классов иммуноглобулина человека с IgM на IgA и IgG [Romberg et al., 2013]. Мутации *TNFRSF13B* выявляются у пациентов с селективным дефицитом IgA (частота 1:600) и с менее распространённым, но более тяжёлым заболеванием - общей вариабельной иммунной недостаточностью (ОВИН) [Salzer et al., 2005]. Первое состояние нередко бывает бессимптомным, тогда как второе связано с повышением частоты длительно персистирующих и рекуррентных инфекций уха, носовых пазух, бронхолегочной системы и желудочно-кишечного тракта.

Следует заметить, что и популяционная частота p.C104R достаточно высока [Pan-Hammarstrom et al, 2007]. При этом информация о медицинской значимости, полученная в различных исследованиях, нередко противоречива, что требует осторожности при интерпретации результатов генетического тестирования [Pulvirenti et al, 2016]. По-видимому, наиболее целесообразно расценивать варианты *TNFRSF13B* в качестве генетических факторов, повышающих риск развития ОВИН. Обнаружение мутации в отсутствие соответствующих клинических и лабораторных признаков не может служить достаточным основанием для постановки диагноза.

Редкие варианты *NLRP12* p.H304Y и p.R352C были ранее описаны у пациентов с семейным холодовым аутовоспалительным синдромом (FCAS) [Jéru

et al., 2011; Zaki et al., 2014]. В нашем исследовании эти варианты существенно чаще встречались в группе больных с периодическими лихорадками.

Первый был обнаружен у 5 из 63 пациентов с периодическими лихорадками и только у трех из 500 здоровых доноров (0.6%) ($p = 0.0006$). Второй вариант наблюдался у двух пациентов и не встречался в группе здоровых индивидуумов. Полученные данные являются дополнительными аргументами в пользу связи этих мутаций с риском болезни.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Поскольку большинство орфанных заболеваний имеет генетическую природу, их спектр в разных странах может варьировать в очень широких пределах, что отражает особенности различных популяций. Результаты изучения генетического груза тех или иных народов крайне важны в практической работе не только врачей-генетиков, но и онкологов. Нередко сведения об этническом происхождении пациента могут способствовать своевременному установлению диагноза редкого заболевания.

Главной задачей настоящего исследования было описание спектра мутаций, приводящих к развитию некоторых наследственных заболеваний у российских пациентов, а также выявление молекулярно-генетических особенностей, характерных именно для нашей страны. При этом акцент делался на изучение болезней, в клиническую картину которых входят новообразования. Следует подчеркнуть, что к этой группе нозологий принадлежат не только наследственные формы карцином (наследственный неполипозный рак толстой кишки), полипозов (синдром Пейтца-Егерса) или гамартом (туберозный склероз), но и ряд редких синдромов, при которых, наряду с другими симптомами у больных наблюдается очень высокий риск развития солидных или гематологических новообразований. Последние представляют особый интерес: поскольку обычно первоочередное внимание врачей обращено на другие симптомы (необычно выраженная предрасположенность к инфекциям, отставание в физическом развитии, дизморфии и т.д.), необходимость онкологической настороженности подчеркивается далеко не всегда.

Восточноевропейские славяне, которые составляют большинство населения Польши, России, Украины и Беларуси, демонстрируют заметную однородность по спектру патогенных аллелей и, по-видимому, образуют крупнейшее в мире сообщество, обладающее «эффектом основателя». В

частности, славянские повторяющиеся мутации были описаны при наследственном раке молочной железы, синдроме Ниймеген, муковисцидозе, мукополисахаридозе типа VI, изолированном гипогонадотропном гипогонадизме и др. [Sokolenko et al., 2014; Bogdanova et al., 2015; Seemanova et al., 2016; Dörk et al., 2000; Jurecka et al., 2014; Choi et al., 2015; Zernov et al., 2016]. Настоящее исследование подтверждает эту тенденцию, продемонстрировав значительный вклад «мажорных» вариантов в заболеваемость атаксией - телангиэктазией, синдромом Блума и наследственным раком молочной железы. Напротив, результаты изучения пациентов с синдромом Линча свидетельствуют о слабой выраженности «эффекта основателя» в отношении этого заболевания.

Установлено, что у российских пациентов с туберозным склерозом доминируют спорадические случаи, связанные с *de novo* мутациями; при этом, значительная доля этих мутаций представлена крупными перестройками *TSC2*. Случаи ТС без мутаций в известных генах имели более мягкий фенотип, чем у субъектов с обнаруженными дефектами *TSC1/2*. По-видимому, некоторые из пациентов с клиническим диагнозом ТС, но без мутаций *TSC1* и *TSC2*, могут иметь другую нозологическую форму (фенокопию) заболевания, однако, выявить генетическую причину с помощью полноэкзомного секвенирования не удалось.

Среди наследственных заболеваний нередко встречается ситуация, когда развитие симптомов связано с дефектами в одном из целого ряда генов (локусная гетерогенность). В условиях выраженной гетерогенности единственным эффективным подходом к диагностике является высокопроизводительное секвенирование нового поколения (NGS). Учитывая постепенное снижение стоимости NGS, использование этой методики вполне оправдано и в случаях, когда секвенирование индивидуальных генов отличается трудоемкостью ввиду их большой протяженности – например, при атаксии – телеангиэктазии и синдроме Линча. Можно привести и обратный пример: синдром Пейтца-Егерса

ассоциирован с единственным геном, *STK11*, имеющим небольшие размеры. В такой ситуации методом выбора является секвенирование по Сэнгеру.

Несмотря на возможности, предоставляемые новыми технологиями ДНК-анализа, эффективность выявления наследственных мутаций по-прежнему напрямую зависит от качества отбора пациентов. Сформулировать показания к проведению дорогостоящих генетических исследований во многих случаях достаточно непросто, учитывая, например, многочисленность нозологических форм и разнообразие их клинических проявлений. Применение слишком строгих критериев ведёт к снижению чувствительности исследования, а чрезмерное их ослабление – к снижению специфичности.

Обнаружение славянской founder – мутации в гене *BLM* (p.Q548*) является примером успешного использования так называемого кандидатного подхода к поиску причин наследственных заболеваний. Имеющиеся сведения о связи генов, вовлеченных в процессы репарации повреждений ДНК (*NBN*, *CHEK2*, *BRCA1*, *BRCA2*, *RAD51* и т.п.), с риском рака молочной железы мотивировали нас к выбору функционально сходного гена, *BLM*, в качестве объекта исследования. Секвенирование кодирующей последовательности *BLM* в группе высокого генетического риска (пациентки с выраженными признаками наследственного РМЖ) позволило выявить повторяющуюся патогенную мутацию; исследование «случай – контроль» подтвердило, что этот вариант ассоциирован с высоким риском развития РМЖ у людей славянского происхождения.

Следует иметь в виду, что реальная клиническая картина многих редких заболеваний может существенно отличаться от описанной в литературе. В частности, диагноз пациента с синдромом Блума был установлен лишь благодаря высокопроизводительному секвенированию, проведенному в связи с подозрением на наличие первичного иммунодефицита. Отсутствие типичных

проявлений в данном случае, по - видимому, было связано с гомозиготностью по славянской founder – мутации [Vojtková et al., 2016; Trizuljak et al., 2020].

Следует еще раз подчеркнуть, что многие выявленные разновидности ПИД (атаксия – телеангиэктазия, ТКИН, синдром Ниймеген, синдром Блума, врожденный дискератоз, синдром Вискотта-Олдрича, X-сцепленная агаммаглобулинемия и др.) характеризуются высоким риском возникновения злокачественных новообразований. Информацию об этом необходимо обязательно доводить до сведения родителей и лечащих врачей пациентов. Своевременно проведенное медико-генетическое консультирование семей позволяет оценить прогноз потомства и открывает возможность пренатальной ДНК-диагностики.

ВЫВОДЫ

1. Молекулярно-генетический анализ подтвердил диагноз синдрома Линча у 38 из 53 (72%) пациентов, у которых наблюдались клинические признаки этого заболевания в сочетании с феноменом микросателлитной нестабильности (MSI-H) в опухолевой ткани. Комбинация секвенирования по Сэнгеру и MLPA обладает сходной эффективностью выявления мутаций генов mismatch – репарации (MMR) по сравнению с комбинацией таргетного NGS и MLPA (14/21 (71%) vs. 26/35 (72%)).
2. Процент выявления наследственных мутаций генов MMR у пациентов с MSI-позитивными опухолями толстой кишки значительно выше, чем у больных с MSI-позитивными карциномами эндометрия ((20/24 (83%) vs. 3/8 (38%); $p = 0.023$)).
3. Повторяющиеся варианты генов MMR редко встречаются у российских пациентов с синдромом Линча. У двух и более индивидуумов выявлены только варианты *MLH1* с.677G>T и *MSH2* с.1906G>C. В то же время, у 10.5% пациентов с подозрением на синдром Линча обнаружены крупные генные перестройки (делеции отдельных экзонов) *MLH1* и *MSH2*, что свидетельствует об обязательности использования метода MLPA при анализе подобных больных.
4. Клинико-морфологические критерии синдрома Пейтца-Егерса обладают высокой степенью информативности: они дают возможность выявления наследственных патогенных вариантов *STK11* у 80% пациентов. Наличие повторяющихся патогенных вариантов *STK11* нехарактерно для российских пациентов с синдромом Пейтца-Егерса.
5. Частота мутации *BLM* с.1642C>T (p.Q548*) значительно выше в группе пациентов с РМЖ по сравнению со здоровыми донорами (10/879 (1.1%) vs.

2/1093 (0.2%), $p = 0.007$). Относительный риск развития РМЖ составил 6.28 (ДИ 1.52 – 42.18). Таким образом, *BLM* относится к категории генов, ассоциированных с повышенным риском наследственного РМЖ.

6. Для карцином молочной железы, возникающих у пациенток с наследственными мутациями *BLM*, нехарактерен феномен соматической утраты интактного аллеля. Потеря гетерозиготности не была обнаружена ни в одном из 10 исследованных случаев, т.е., наиболее вероятным механизмом развития опухолей представляется гаплонедостаточность.
7. У российских пациентов с туберозным склерозом (ТС) наблюдается доминирование спорадических форм, связанных с мутациями *de novo*; процент семейных случаев существенно ниже по сравнению с данными других авторов (5% против 11-38%). К возможным объяснениям можно отнести плохую социальную адаптацию пациентов, недостаточно эффективную диагностику легких форм ТС или низкую популяционную частоту наследственных мутаций. Значительная доля (11%) мутаций, выявленных у пациентов с ТС, представлена крупными перестройками *TSC2*, что свидетельствует о необходимости включения МЛРА-тестирования или аналогичных методов в стандарт генетического обследования.
8. Больные ТС без выявленных мутаций *TSC1/2* имели более лёгкое течение заболевания по сравнению с теми, у кого дефекты этих генов были обнаружены. В частности, характерны более поздний возраст на момент диагноза, отсутствие кортикальных туберов и субэпендимальных узлов, а также низкая частота эпилептических приступов.
9. Среди детей с рекуррентными инфекциями патогенные мутации в генах первичных иммунодефицитов (ПИД) удалось выявить у 88 из 400 (22%) проанализированных пациентов. Эффективность таргетного

секвенирования зависит от использованных критериев отбора больных. В группе детей, соответствующих критериям JMF, частота обнаружения мутаций составила 44/208 (21%), а у пациентов с периодическими лихорадками – 16/63 (25%). В то же время, у пациентов с аутоиммунными цитопениями эта цифра составляла 4/31 (13%), у часто болеющих детей – 3/54 (6%), у пациентов с необычно тяжелым течением инфекций – 1/21 (5%), а при наличии изолированного повышения уровня IgE – 0 (0/6).

10. В группе пациентов с подозрением на атаксию-телеангиэктазию (АТ) мутации *ATM* были выявлены у 17 из 17 человек, что свидетельствует о надежности существующих клинико-лабораторных критериев этого заболевания. Мутация *ATM* с.5932G>Т была обнаружена у 12 из 16 пациентов славянского происхождения (75%) с атаксией–телеангиэктазией; кроме того, выявлены еще два повторяющихся аллеля – с.450_453delTTCT и с.1564_1565delGA.

11. Гомозиготная «славянская» мутация *BLM* с.1642C>Т (p.Q548*) ассоциирована с редким фенотипом синдрома Блума, характеризующимся отсутствием лицевой эритемы. Такая особенность клинических проявлений данного заболевания может служить объяснением низкой эффективности диагностики этого синдрома у жителей Российской Федерации.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Тестирование российских пациентов с клиническими признаками синдрома Линча и феноменом микросателлитной нестабильности на наличие повторяющихся мутаций неэффективно вследствие низкой распространенности founder-вариантов. С учетом необходимости анализа нескольких генов, рекомендовано проведение таргетного высокопроизводительного секвенирования; частое обнаружение крупных делеций *MLH1/MSH2* свидетельствует о необходимости включения в алгоритм обследования метода MLPA.
2. Для диагностики синдрома Пейтца-Егерса рекомендуется использование секвенирования по Сэнгеру гена *STK11*, дополненное использованием метода MLPA.
3. Рекомендуется включить исследование аллеля *BLM* с.1642C>T (p.Q548*) в диагностическую панель, направленную на диагностику наследственного рака у российских пациенток с опухолями молочной железы.
4. Диагностика туберозным склероза должна включать не только стандартное секвенирование генов *TSC1* и *TSC2*, но и анализ крупных перестроек гена *TSC2*.
5. Генетическое тестирование мутаций в генах ПИД методом таргетного мультигенного секвенирования целесообразно рекомендовать детям, отвечающих хотя бы одному из следующих требований: а) соответствие критериям JMF; б) наличие периодических лихорадок; в) наличие аутоиммунного лимфопролиферативного синдрома.
6. Повышенная частота инфекционных эпизодов у детей (более 8 в год), а также лабораторный феномен изолированного повышения IgE более 2000

МЕ/мл в отсутствие инфекционных проявлений, не являются показаниями для поиска мутаций в генах ПИД.

7. Больные, у которых рекуррентные инфекции сочетаются с множественными аномалиями развития, нуждаются в консультации клинического генетика и генетическом обследовании для исключения хромосомных/микроделеционных синдромов.
8. Российским пациентам с признаками атаксии–телеангиэктазии процесс ДНК–диагностики целесообразно начинать с тестирования трех повторяющихся мутаций *ATM*: с.5932G>T (p.E1978*), с.1564_1565delGA (p.E522Ilefs*43) и с.450_453delTTCT (p.S151*).
9. Рекомендуется генетическое обследование с целью исключения синдрома Блума всем детям с сочетанием низкорослости, рекуррентных инфекций и задержкой внутриутробного развития в анамнезе. У пациентов славянского происхождения тестирование целесообразно начинать с анализа повторяющейся мутации *BLM* с.1642C> T (p.Q548*).

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Планируется продолжение изучения наследственного неполипозного рака толстой кишки, синдромов Пейтца-Егерса и Блума, атаксии – телеангиэктазии за счет привлечения большего числа пациентов. Относительная редкость этих заболеваний влечет за собой необходимость многолетнего создания коллекций образцов.

Требуется продолжение поиска новых генов, ассоциированных с высоким риском развития рака молочной железы. Возможные успехи в этой области могут быть связаны с улучшением биоинформатической обработки результатов высокопроизводительного секвенирования – в частности, оптимизацией способов детекции нарушений копийности (CNV) и выявления патогенных вариантов, располагающихся в некодирующих областях генома.

Также необходимо дальнейшее изучение генетического груза российской популяции в отношении наследственных дефектов иммунитета. Одним из перспективных подходов к исследованию может стать анализ данных экзомного секвенирования российских пациентов с целью выявления повторяющихся вариантов, связанных с развитием аутосомно – рецессивных и X – сцепленных болезней.

Большой интерес представляет изучение молекулярно-генетических особенностей опухолей, развившихся на фоне наследственного дефекта иммунитета, в частности, в рамках синдромов с хромосомной нестабильностью.

Наконец, еще одним важным направлением для разработки является внедрение экспериментальных методик, направленных на уточнение функциональной значимости генетических вариантов, обнаруженных в результате проведения таргетного и экзомного секвенирования.

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АВЗ – аутовоспалительное заболевание

АИГА – аутоиммунная гемолитическая анемия

АЛПС – аутоиммунный лимфопролиферативный синдром

АТ – атаксия – телеангиэктазия

ВПС – врожденный порок сердца

ДИ – доверительный интервал

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ЗВУР – задержка внутриутробного развития

ОВИН – общая вариабельная иммунная недостаточность

ОРВИ – острые респираторные вирусные заболевания

ПИД – первичный иммунодефицит

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РМЖ – рак молочной железы

СЛ – синдром Линча

СРБ – С-реактивный белок

ТКИН – тяжелая комбинированная иммунная недостаточность

ТС – туберозный склероз

ЭС – экзомное секвенирование

LOH – Loss of Heterozygosity

MLPA - Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

MMR-D – дефицит репарации неспаренных оснований

MSI – Microsatellite Instability, микросателлитная нестабильность

MSI-H – высокий уровень микросателлитной нестабильности

HRM - High Resolution Melting

NGS – Next Generation Sequencing

SNP – Single Nucleotide Polymorphism

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abel L., Alcaïs A., Schurr E. The dissection of complex susceptibility to infectious disease: Bacterial, viral and parasitic infections // *Curr. Opin. Immunol.* 2014. Vol. 30. № 1. P. 72–78.
2. Adar T., Rodgers L.H., Shannon K.M. et al. A tailored approach to BRAF and MLH1 methylation testing in a universal screening program for Lynch syndrome // *Mod. Pathol.* 2017. Vol. 30. № 3. P. 440–447.
3. Al-Hammadi S, Al-Reyami E, Al-Remeithi S. et al. Attentiveness of pediatricians to primary immunodeficiency disorders // *BMC Res. Notes.* 2012. Vol. 5. № 1. P. 1.
4. Al-Herz W., Notarangelo L.D. Classification of primary immunodeficiency disorders: One-fits-all does not help anymore // *Clin. Immunol.* 2012. Vol. 144. № 1. P. 24–25.
5. Ali M, Girimaji SC, Markandaya M. et al. Mutation and polymorphism analysis of TSC1 and TSC2 genes in Indian patients with tuberous sclerosis complex // *Acta Neurol. Scand.* 2005. Vol. 111(1). P. 54-63.
6. Álvarez K, Orellana P, De la Fuente M., et al. Spectrum and Frequency of Tumors, Cancer Risk and Survival in Chilean Families with Lynch Syndrome: Experience of the Implementation of a Registry // *J. Clin. Med.* 2020; Vol. 9(6):1861.
7. Agarwal R, Liebe S, Turski ML, et al. Targeted therapy for hereditary cancer syndromes: hereditary breast and ovarian cancer syndrome, Lynch syndrome, familial adenomatous polyposis, and Li-Fraumeni syndrome // *Discov. Med.* 2014. Vol. 18(101)/ P. 331-339.
8. Al-Mousa H, Abouelhoda M, Monies DM. Et al. Unbiased targeted next-generation sequencing molecular approach for primary immunodeficiency diseases // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2016. Vol. 137. № 6. P. 1780–1787.
9. Al-Mousa H., Al-Saud B. Primary immunodeficiency diseases in highly consanguineous populations from Middle East and North Africa: Epidemiology, diagnosis, and care. *Front Immunol.* 2017. Vol. 26. №8. P.678.
10. Anheim M., Tranchant C., Koenig M. The Autosomal Recessive Cerebellar Ataxias // *N. Engl. J. Med.* 2012. Vol. 366(7). P.636-646.
11. Anisimenko MS, Kozyakov AE, Paul GA, Kovalenko SP. The frequency of the BLM p.Q548X (c.1642C>T) mutation in breast cancer patients from Russia is

- no higher than in the general population // *Breast Cancer Res. Treat.* 2014. Vol. 148. № 3. P. 689–690.
12. Arkwright P.D., Gennery A.R. Ten warning signs of primary immunodeficiency: A new paradigm is needed for the 21st century // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2011. Vol. 1238. P.7-14.
 13. Arora H, Chacon AH, Choudhary S, McLeod MP, Meshkov L, Nouri K, Izakovic J. Bloom syndrome // *Int. J. Dermatol.* 2014. Vol. 53(7). P. 798-802.
 14. Arslan S, Ucar R, Caliskaner AZ, Reisli I. et al. How effective are the 6 European Society of Immunodeficiency warning signs for primary immunodeficiency disease? // *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2016. Vol. 116(2). P. 151-155.
 15. Arts P, Simons A, AlZahrani MS. et al. Exome sequencing in routine diagnostics: A generic test for 254 patients with primary immunodeficiencies // *Genome Med.* 2019. Vol.11(1). P. 38.
 16. Attarbaschi A, Carraro E, Abla O. Non-Hodgkin lymphoma and pre-existing conditions: Spectrum, clinical characteristics and outcome in 213 children and adolescents // *Haematologica.* 2016. Vol 101(12). P. 1581-1591
 17. Au KS, Williams AT, Roach ES. Genotype/phenotype correlation in 325 individuals referred for a diagnosis of tuberous sclerosis complex in the United States // *Genet. Med.* 2007. Vol. 9(2). P. 88-100.
 18. Auerbach A.D. Fanconi anemia and its diagnosis // *Mutat. Res.* 2009. Vol. 668 (1-2). P. 4-10.
 19. Azizi G, Abolhassani H, Mahdavian SA. et al. Clinical, immunologic, molecular analyses and outcomes of iranian patients with LRBA deficiency: A longitudinal study // *Pediatr. Allergy Immunol.* 2017. Vol. 28(5):478-484.
 20. Babaei M, Mitui M, Olson ER, Gatti RA. ATM haplotypes and associated mutations in Iranian patients with ataxia-telangiectasia: Recurring homozygosity without a founder haplotype // *Hum. Genet.* 2005. Vol. 117. № 2–3. P. 101–106.
 21. Baglietto L, Lindor NM, Dowty JG. et al. Risks of lynch syndrome cancers for msh6 mutation carriers // *J. Natl. Cancer Inst.* 2010. Vol. 102(3). P. 193-201.
 22. Baker E., Jeste S.S. Diagnosis and management of autism spectrum disorder in the era of genomics. rare disorders can pave the way for targeted treatments. // *Pediatr. Clin. North Am.* 2015. Vol. 62(3). P. 607-18.
 23. Balanovsky O, Rootsi S, Pshenichnov A. et al. Two Sources of the Russian Patrilineal Heritage in Their Eurasian Context // *Am. J. Hum. Genet.* 2008. Vol. 82(1). P. 236-50.

24. Balashova MS, Tuluzanovskaya IG, Glotov OS., et al. The spectrum of pathogenic variants of the ATP7B gene in Wilson disease in the Russian Federation // *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2020. Vol. 59. P. 126420.
25. Bannon SA, Montiel MF, Goldstein JB, et al. High Prevalence of Hereditary Cancer Syndromes and Outcomes in Adults with Early-Onset Pancreatic Cancer // *Cancer Prev Res (Phila)*. 2018. Vol. 11(11). P. 679-686.
26. Bapat B, Lindor NM, Baron J, et al. The association of tumor microsatellite instability phenotype with family history of colorectal cancer // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2009. Vol. 18(3). P. 967-975.
27. Barbitoff YA, Skitchenko RK, Poleshchuk OI. et al. Whole-exome sequencing provides insights into monogenic disease prevalence in Northwest Russia // *Mol. Genet. Genomic Med.* 2019. Vol. 7. № 11. P. e964–e964.
28. Barnetson RA, Tenesa A, Farrington SM., et al. Identification and survival of carriers of mutations in DNA mismatch-repair genes in colon cancer // *N. Engl. J. Med.* 2006. Vol. 354(26). P. 2751-63
29. Bartkova J, Tommiska J, Oplustilova L., et al. Aberrations of the MRE11-RAD50-NBS1 DNA damage sensor complex in human breast cancer: MRE11 as a candidate familial cancer-predisposing gene // *Mol. Oncol.* 2008. Vol. 2(4)/ P. 296-316.
30. Beauchamp RL, Banwell A, McNamara P et al. Exon scanning of the entire TSC2 gene for germline mutations in 40 unrelated patients with tuberous sclerosis // *Hum. Mutat.* 1998. Vol. 12(6). P. 408-416.
31. Beck C, Girschick HJ, Morbach H, et al. Mutation screening of the IL-1 receptor antagonist gene in chronic non-bacterial osteomyelitis of childhood and adolescence // *Clin. Exp. Rheumatol.* 2011. Vol. 29. № 6. P. 1040–1043.
32. Beggs AD, Latchford AR, Vasen HF, et al. Peutz-Jeghers syndrome: a systematic review and recommendations for management // *Gut.* 2010. Vol. 59. P. 975–986.
33. Ben Aim L., Pigny P., Castro-Vega L.J. et al. Targeted next-generation sequencing detects rare genetic events in pheochromocytoma and paraganglioma // *J. Med. Genet.* 2019. Vol. 56 (8). P. 513–520.
34. Bennett JA, Young RH, Howitt BE, et al. A Distinctive Adnexal (Usually Paratubal) Neoplasm Often Associated With Peutz-Jeghers Syndrome and Characterized by STK11 Alterations (STK11 Adnexal Tumor): A Report of 22 Cases // *Am J Surg Pathol.* 2021. Vol. 45(8). P. 1061-1074.

35. Beristain E, Guerra I, Vidaurrazaga N., et al. LOH analysis should not be used as a tool to assess whether UVs of BRCA1/2 are pathogenic or not // *Fam. Cancer*. 2010. Vol. 9(3). P. 289-90.
36. Berwick M, Satagopan JM, Ben-Porat L, et al. Genetic heterogeneity among Fanconi anemia heterozygotes and risk of cancer // *Cancer Res*. 2007. Vol. 67. P. 9591-9596.
37. Birrell GW, Kneebone K, Nefedov M., et al. ATM mutations, haplotype analysis, and immunological status of Russian patients with ataxia telangiectasia // *Hum. Mutat*. 2005. Vol. 25. № 6. P. 593.
38. Bisgin A, Boga I, Yilmaz M, Bingol G., et al. The Utility of Next-Generation Sequencing for Primary Immunodeficiency Disorders: Experience from a Clinical Diagnostic Laboratory // *Biomed Res. Int*. 2018. Vol. 2018. P. 9647253.
39. Bogdanova N, Cybulski C, Bermisheva M. et al. A nonsense mutation (E1978X) in the ATM gene is associated with breast cancer // *Breast Cancer Res. Treat*. 2009. Vol. 118. № 1. P. 207–211.
40. Bogdanova N, Feshchenko S, Schürmann P., et al. Nijmegen Breakage Syndrome mutations and risk of breast cancer // *Int. J. Cancer*. 2008. Vol. 122(4). P. 802-806.
41. Bohr V.A. Rising from the RecQ-age: the role of human RecQ helicases in genome maintenance // *Trends Biochem. Sci*. 2008. Vol. 33(12). P. 609-620.
42. Boland C.R., Goel A. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer // *Gastroenterology*. 2010. Vol. 138(6). P. 2073-2087.
43. Boland PM, Yurgelun MB, Boland CR. Recent progress in Lynch syndrome and other familial colorectal cancer syndromes // *CA. Cancer J. Clin*. 2018. Vol. 68(3). P. 217-231.
44. Bomken S, van der Werff Ten Bosch J, Attarbaschi A., et al. Current Understanding and Future Research Priorities in Malignancy Associated With Inborn Errors of Immunity and DNA Repair Disorders: The Perspective of an Interdisciplinary Working Group // *Front Immunol*. 2018. Vol. 12(9). P. 2912.
45. Bonadona V, Bonaïti B, Olschwang S., et al. Cancer risks associated with germline mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 genes in lynch syndrome // *JAMA - J. Am. Med. Assoc*. 2011. Vol. 305(22). P. 2304-2310.
46. Boronat S, Caruso P, Thiele EA. Absence of subependymal nodules in patients with tubers suggests possible neuroectodermal mosaicism in tuberous sclerosis complex // *Dev Med Child Neurol*. 2014. Vol. 56 (12). P. 1207-1211.

47. Bousfiha AA, Jeddane L, Ailal F., et al. Primary immunodeficiency diseases worldwide: More common than generally thought // *J. Clin. Immunol.* 2013. Vol. 33(1). P. 1-7.
48. Brewer CJ, Gillespie M, Fierro J., et al. The Value of Parental Testing by Next-Generation Sequencing Includes the Detection of Germline Mosaicism // *J. Mol. Diagnostics.* 2020. Vol. 22. № 5. P. 670–678.
49. Brown GR, Simon M, Wentling C, Spencer DM, Parker AN, Rogers CA. A review of inherited cancer susceptibility syndromes // *JAAPA.* 2020. Vol. 33(12). P. 10-16.
50. Bruin C. De, Dauber A. Insights from exome sequencing for endocrine disorders // *Nat. Rev. Endocrinol.* 2015. Vol. 11(8). P. 455-464.
51. Burn J, Gerdes AM, Macrae F., et al. Long-term effect of aspirin on cancer risk in carriers of hereditary colorectal cancer: An analysis from the CAPP2 randomised controlled trial // *Lancet.* 2011. Vol. 378(9809). P. 2081-2087.
52. Buslov KG, Iyevleva AG, Chekmariova EV, et al. NBS1 657del5 mutation may contribute only to a limited fraction of breast cancer cases in Russia // *Int. J. Cancer.* 2005. Vol. 114. № 4. P. 585-589.
53. Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Abel L, Casanova JL. Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: Genetic, immunological, and clinical features of inborn errors of IFN- γ immunity // *Semin. Immunol.* 2014. Vol. 26(6). P. 454-470.
54. Calasanz M.J., Cigudosa J.C. Molecular cytogenetics in translational oncology: When chromosomes meet genomics // *Clin. Transl. Oncol.* 2008. Vol. 10(1). P. 20-29.
55. Calin G, Herlea V, Barbanti-Brodano G, Negrini M. The coding region of the bloom syndrome BLM gene and of the CBL proto- oncogene is mutated in genetically unstable sporadic gastrointestinal tumors // *Cancer Res.* 1998. Vol. 58(17). P. 3777-3781.
56. Campbell C, Mitui M, Eng L., et al. ATM mutations on distinct SNP and STR haplotypes in ataxia-telangiectasia patients of differing ethnicities reveal ancestral founder effects // *Hum. Mutat.* 2003. Vol. 21. № 1. P. 80–85.
57. Campbell MB, Campbell WC, Rogers J. Bloom syndrome: Research and data priorities for the development of precision medicine as identified by some affected families // *Cold Spring Harb. Mol. Case Stud.* 2018. Vol. 4. № 2. P. 1–11.
58. Camposano SE, Greenberg E, Kwiatkowski DJ, Thiele EA. Distinct clinical characteristics of Tuberous Sclerosis Complex patients with no mutation identified // *Ann. Hum. Genet.* 2009. Vol. 73(2). P. 141-146.

59. Carranza D, Vega AK, Torres-Rusillo S. Molecular and Functional Characterization of a Cohort of Spanish Patients with Ataxia-Telangiectasia // *NeuroMolecular Med.* 2017. Vol. 19. № 1. P. 161–174.
60. Carsillo T., Astrinidis A., Henske E.P. Mutations in the tuberous sclerosis complex gene TSC2 are a cause of sporadic pulmonary lymphangioliomyomatosis // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002. Vol. 97(11). P. 6085-6090.
61. Casadei S, Norquist BM, Walsh T. Contribution of inherited mutations in the BRCA2-interacting protein PALB2 to familial breast cancer // *Cancer Res.* 2011. Vol. 71(6). P. 2222-2229.
62. Casadevall A, Pirofski LA. What is a host? Attributes of individual susceptibility // *Infect. Immun.* 2018. Vol. 86. № 2. P. 1–12.
63. Casanova J.L. Severe infectious diseases of childhood as monogenic inborn errors of immunity // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2015. Vol. 112(51). E. 7128-7137.
64. Casanova JL, Abel L, Quintana-Murci L. Immunology taught by human genetics // *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2013. Vol. 78. P. 157-172.
65. Casanova JL, Conley ME, Seligman SJ, Abel L, Notarangelo LD. Guidelines for genetic studies in single patients: Lessons from primary immunodeficiencies // *J. Exp. Med.* 2014. Vol. 211(11). P. 2137-2149.
66. Cavalieri S, Funaro A, Pappi P. Large genomic mutations within the ATM gene detected by MLPA, including a duplication of 41 kb from exon 4 to 20 // *Ann. Hum. Genet.* 2008. Vol. 72. № 1. P. 10–18.
67. Chandler MR, Bilgili EP, Merner ND. A Review of Whole-Exome Sequencing Efforts Toward Hereditary Breast Cancer Susceptibility Gene Discovery // *Hum. Mutat.* 2016/ Vol. 37(9). P. 835-846.
68. Chaganti R.S.K., Schonberg S., German J. A manyfold increase in sister chromatid exchanges in Bloom's syndrome lymphocytes // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1974. Vol. 71(11). P. 4508-4512.
69. Charrow J. Ashkenazi Jewish genetic disorders // *Fam. Cancer.* 2004. Vol. 3(3-4). P. 201-206.
70. Chessa L, Piane M, Magliozzi M. Founder effects for ATM gene mutations in Italian ataxia telangiectasia families // *Ann. Hum. Genet.* 2009. Vol. 73. № 5. P. 532–539.
71. Choi JE, Chae JH, Hwang YS, Kim KJ. Mutational analysis of TSC1 and TSC2 in Korean patients with tuberous sclerosis complex // *Brain Dev.* 2006. Vol. 28(7). P. 440-446.

72. Choi JH, Balasubramanian R, Lee PH, et al. Expanding the Spectrum of Founder Mutations Causing Isolated Gonadotropin-Releasing Hormone Deficiency // *J Clin Endocrinol Metab.* 2015. Vol. 100(10). E1378-1385.
73. Choi YH, Cotterchio M, McKeown-Eyssen G. Penetrance of colorectal cancer among MLH1/MSH2 carriers participating in the colorectal cancer familial registry in Ontario // *Hered. Cancer Clin. Pract.* 2009. Vol. 7(1). P. 14.
74. Chopra M, Lawson JA, Wilson M. An Australian tuberous sclerosis cohort: Are surveillance guidelines being met? // *J. Paediatr. Child Health.* 2011. Vol. 47(10):711-716.
75. Chu W.K., Hickson I.D. RecQ helicases: Multifunctional genome caretakers // *Nat. Rev. Cancer.* 2009. Vol. 9(9). P. 644-654.
76. Ciara E, Piekutowska-Abramczuk D, Popowska E. Heterozygous germ-line mutations in the NBN gene predispose to medulloblastoma in pediatric patients // *Acta Neuropathol.* 2010. Vol. 119(3). P. 325-334.
77. Cleary SP, Zhang W, Di Nicola N. Heterozygosity for the BLM^{Ash} mutation and cancer risk // *Cancer Res.* 2003. Vol. 63(8). P. 1769-1771.
78. Cohen JI, Kimura H, Nakamura S, Ko YH, Jaffe ES. Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disease in non-immunocompromised hosts: A status report and summary of an international meeting, 8-9 September 2008 // *Ann. Oncol.* 2009. Vol. 20(9). P. 1472-1482.
79. Collins N, McManus R, Wooster R., et al Consistent loss of the wild type allele in breast cancers from a family linked to the BRCA2 gene on chromosome 13q12-13 // *Oncogene.* 1995. Vol. 10(8). P. 1673-1675.
80. Concannon P, Haile RW, Børresen-Dale AL. et al. Variants in the ATM gene associated with a reduced risk of contralateral breast cancer // *Cancer Res.* 2008. Vol. 68(16). P. 6486-6491.
81. Corthay A. Does the immune system naturally protect against cancer? // *Front. Immunol.* 2014. Vol. 5. P. 197.
82. Costa-Carvalho BT, Grumach AS, Franco JL., et al. Attending to warning signs of primary immunodeficiency diseases across the range of clinical practice // *J. Clin. Immunol.* 2014. Vol. 34. № 1. P. 10–22.
83. Cox VL, Saeed Bamashmos AA, Foo WC. Lynch syndrome: Genomics update and imaging review // *Radiographics.* 2018. Vol. 38(2). P. 483-499.
84. Cremers S, Aronson JK. Drugs for rare disorders // *Br J Clin Pharmacol.* 2017. Vol. 83(8). P.1607-1613.

85. Cunniff C, Djavid AR, Carrubba S., et al. Health supervision for people with Bloom syndrome // *Am. J. Med. Genet. Part A*. 2018. Vol. 176. № 9. P. 1872–1881.
86. Cunniff C., Bassetti J.A., Ellis N.A. Bloom's syndrome: Clinical spectrum, molecular pathogenesis, and cancer predisposition // *Mol. Syndromol*. 2017. Vol. 8. № 1. P. 4–23.
87. Curatolo P, Moavero R, Roberto D, Graziola F. Genotype/Phenotype Correlations in Tuberous Sclerosis Complex // *Semin. Pediatr. Neurol*. 2015. Vol. 22(4). P. 259-273.
88. Cybulski C, Górski B, Debniak T., et al. NBS1 is a prostate cancer susceptibility gene // *Cancer Res*. 2004. Vol. 64(4). P. 1215-1219.
89. Cybulski C, Carrot-Zhang J, Kluźniak W., et al. Germline RECQL mutations are associated with breast cancer susceptibility // *Nat. Genet*. 2015. Vol. 47. P. 643-646.
90. Dabora SL, Franz DN, Ashwal S., et al. Multicenter phase 2 trial of sirolimus for tuberous sclerosis: Kidney angiomyolipomas and other tumors regress and VEGF- D levels decrease // *PLoS One*. 2011. Vol. 6(9). e23379.
91. Dabora SL, Jozwiak S, Franz DN., et al. Mutational Analysis in a Cohort of 224 Tuberous Sclerosis Patients Indicates Increased Severity of TSC2, Compared with TSC1, Disease in Multiple Organs // *Am. J. Hum. Genet*. 2002. Vol. 68(1). P. 64-80.
92. Daniell J, Plazzer JP, Perera A, Macrae F. An exploration of genotype-phenotype link between Peutz-Jeghers syndrome and STK11: a review // *Fam Cancer*. 2018. Vol. 17. P. 421–427.
93. Dantas EO, Aranda CS, Rêgo Silva AM., et al. Doctors' awareness concerning primary immunodeficiencies in Brazil // *Allergol. Immunopathol. (Madr)*. 2015. Vol. 43(3). P. 272-278.
94. De Boeck K, Amaral MD. Progress in therapies for cystic fibrosis. *Lancet Respir Med*. 2016. Vol. 4(8). P. 662-674.
95. de Vries E, European Society for Immunodeficiencies (ESID) members. Patient-centred screening for primary immunodeficiency: a multi-stage diagnostic protocol designed for non-immunologists // *Clin Exp Immunol*. 2006. Vol. 167 (1). P. 108-119.
96. Deamer D, Akeson M, Branton D. Three decades of nanopore sequencing // *Nat Biotechnol*. 2016. Vol. 34 (5). P. 518-524.
97. Demuth I, Dutrannoy V, Marques W Jr., et al. New mutations in the ATM gene and clinical data of 25 at patients // *Neurogenetics*. 2011. Vol. 12(4). P. 273-282.

98. Desai DC, Lockman JC, Chadwick RB., et al. Recurrent germline mutation in MSH2 arises frequently de novo // *J Med Genet.* 2000. Vol. 37 (9). P. 646-652.
99. Dharssi S, Wong-Rieger D, Harold M, Terry S. Review of 11 national policies for rare diseases in the context of key patient needs // *Orphanet J Rare Dis.* 2017. Vol. 12 (1). P. 63.
100. Dillon JL, Gonzalez JL, DeMars L., et al. Universal screening for Lynch syndrome in endometrial cancers: frequency of germline mutations and identification of patients with Lynch-like syndrome // *Hum. Pathol.* 2017. Vol. 70. P. 121-128.
101. Dionisi-Vici C, Rizzo C, Burlina AB, Caruso U, Sabetta G, Uziel G, Abeni D. Inborn errors of metabolism in the Italian pediatric population: a national retrospective survey // *J Pediatr.* 2002. Vol. 140(3). P. 321-7.
102. Dörk T, Macek M Jr, Mekus F. et al. Characterization of a novel 21-kb deletion, CFTRdele2,3(21 kb), in the CFTR gene: A cystic fibrosis mutation of Slavic origin common in Central and East Europe // *Hum. Genet.* 2000. Vol. 106(3). P. 259-268.
103. Dowty JG, Win AK, Buchanan DD., et al. Cancer Risks for MLH1 and MSH2 Mutation Carriers // *Hum. Mutat.* 2013. Vol. 34(3). P. 490-497.
104. Driessen GJ, Ijspeert H, Weemaes CM., et al. Antibody deficiency in patients with ataxia telangiectasia is caused by disturbed B- and T-cell homeostasis and reduced immune repertoire diversity // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2013. Vol. 131(5). P. 1367-1375.
105. Dropulic LK, Cohen JI. Severe viral infections and primary immunodeficiencies // *Clin. Infect. Dis.* 2011. Vol. 53 (9). P. 897-909.
106. Dumon-Jones V, Frappart PO, Tong WM. NBN Heterozygosity Renders Mice Susceptible to Tumor Formation and Ionizing Radiation-Induced Tumorigenesis // *Cancer Res.* 2003. Vol. 63(21). P. 7263-7269.
107. Dunn G.P., Koebel C.M., Schreiber R.D. Interferons, immunity and cancer immunoediting // *Nat. Rev. Immunol.* 2006. Vol. 6 (11). P. 836-848.
108. DuPage M, Mazumdar C, Schmidt LM, Cheung AF, Jacks T. Expression of tumour-specific antigens underlies cancer immunoediting // *Nature.* 2012. Vol. 482 (7385). P. 405-409.
109. Dymerska D, Gołębiewska K, Kuświk M., et al. New EPCAM founder deletion in Polish population // *Clin Genet.* 2017. Vol. 92 (6). P. 649-653.
110. Edelstein DL, Axilbund J, Baxter M., et al. Rapid Development of Colorectal Neoplasia in Patients With Lynch Syndrome // *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2011. Vol. 9 (4). P. 340-343.

111. Eisensmith RC, Goltsov AA, O'Neill C., et al. Recurrence of the R408W mutation in the phenylalanine hydroxylase locus in Europeans // *Am. J. Hum. Genet.* 1995. Vol. 56 (1). P. 278-286.
112. Ekong R, Nellist M, Hoogeveen-Westerveld M., et al. Variants Within TSC2 Exons 25 and 31 Are Very Unlikely to Cause Clinically Diagnosable Tuberous Sclerosis // *Hum. Mutat.* 2016. Vol. 37(4). P. 364-70.
113. Emens LA, Ascierto PA, Darcy PK., et al. Cancer immunotherapy: Opportunities and challenges in the rapidly evolving clinical landscape // *Eur. J. Cancer.* 2017. Vol. 81. P. 116-129.
114. Engel C, Loeffler M, Steinke V., et al. Risks of less common cancers in proven mutation carriers with lynch syndrome // *J. Clin. Oncol.* 2012. Vol. 30 (35). P. 4409-4415.
115. Engelhardt KR, Xu Y, Grainger A. et al. Identification of Heterozygous Single- and Multi-exon Deletions in IL7R by Whole Exome Sequencing // *J. Clin. Immunol.* 2017. Vol. 37(1). P. 42-50.
116. Eskelund CW, Dahl C, Hansen JW., et al. TP53 mutations identify younger mantle cell lymphoma patients who do not benefit from intensive chemoimmunotherapy // *Blood.* 2017. Vol. 130 (17). P. 1903-1910.
117. Eslami N, Tavakol M, Mesdaghi M., et al. A gain-of-function mutation of STAT1: A novel genetic factor contributing to chronic mucocutaneous candidiasis // *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 2017. Vol. 64 (2). P. 191-201.
118. Fackenthal JD, Olopade OI. Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations // *Nat. Rev. Cancer.* 2007. Vol. 7(12). P. 937-948.
119. Fallik D, Borrini F, Boige V., et al. Microsatellite instability is a predictive factor of the tumor response to irinotecan in patients with advanced colorectal cancer // *Cancer Res.* 2003. Vol. 63(18):5738-5744.
120. Fang M, Abolhassani H, Lim CK, Zhang J, Hammarström L. Next Generation Sequencing Data Analysis in Primary Immunodeficiency Disorders – Future Directions // *J. Clin. Immunol.* 2016. Vol. 36. P. 68–75.
121. Farach LS, Pearson DA, Woodhouse JP., et al. Tuberous Sclerosis Complex Genotypes and Developmental Phenotype // *Pediatr. Neurol.* 2019. Vol. 96. P. 58-63.
122. Fares F, Badarneh K, Abosaleh M., et al. Carrier frequency of autosomal-recessive disorders in the Ashkenazi Jewish population: Should the rationale for mutation choice for screening be reevaluated? // *Prenat. Diagn.* 2008. Vol. 28 (3). P. 236-241.

123. Felicio PS, Grasel RS, Campacci N., et al. Whole-exome sequencing of non-BRCA1/BRCA2 mutation carrier cases at high-risk for hereditary breast/ovarian cancer // *Hum. Mutat.* 2021 Vol. 42(3). P. 290-299.
124. Ferla R, Calò V, Cascio S., et al. Founder mutations in BRCA1 and BRCA2 genes // *Annals of Oncology.* 2007. Suppl. 6. vi93-98.
125. Fischer A, Provot J, Jais JP., et al. Autoimmune and inflammatory manifestations occur frequently in patients with primary immunodeficiencies // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2017. Vol. 140 (5). P. 1388-1393.
126. Fokkema IF, Taschner PE, Schaafsma GC, Celli J, Laros JF, den Dunnen JT. LOVD v.2.0: the next generation in gene variant databases // *Hum. Mutat.* 2011 Vol. 32 (5). P. 557-563.
127. Forman J, Taruscio D, Llera VA., et al. The need for worldwide policy and action plans for rare diseases // *Acta Paediatr.* 2012. Vol. 101 (8). P. 805-807.
128. Fostira F, Kostantopoulou I, Apostolou P., et al. One in three highly selected Greek patients with breast cancer carries a loss-of-function variant in a cancer susceptibility gene // *J. Med. Genet.* 2020. Vol. 57(1). P. 53-61.
129. Foulkes WD, Thiffault I, Gruber SB., et al. The founder mutation MSH2*1906G-->C is an important cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in the Ashkenazi Jewish population // *Am. J. Hum. Genet.* 2002. Vol. 71 (6). P. 1395-1412.
130. Foulkes WD. Inherited susceptibility to common cancers // *N. Engl. J. Med.* 2008. Vol. 359. P. 2143–2153.
131. Francescatto L., Katsanis N. Newborn screening and the era of medical genomics // *Semin. Perinatol.* 2015. Vol. 39 (8). P. 617-622.
132. Franz DN, Lawson JA, Yapici Z, et al. Everolimus for treatment-refractory seizures in TSC: Extension of a randomized controlled trial // *Neurol. Clin. Pract.* 2018. Vol. 8 (5). P. 412-420.
133. Freire BL, Homma TK, Funari MFA., et al. Multigene sequencing analysis of children born small for gestational age with isolated short stature // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2019. Vol. 104 (6). P. 2023-2030.
134. Froggatt NJ, Green J, Brassett C., et al. A common MSH2 mutation in English and North American HNPCC families: origin, phenotypic expression, and sex specific differences in colorectal cancer // *J. Med. Genet.* 1999. Vol. 36 (2). P. 97-102.
135. Gage M, Wattendorf D, Henry LR. Translational advances regarding hereditary breast cancer syndromes // *J. Surg. Oncol.* 2012. Vol. 105 (5). P. 444-451.

136. Galal N, Meshaal S, Elhawary R., et al. Patterns of Primary Immunodeficiency Disorders Among a Highly Consanguineous Population: Cairo University Pediatric Hospital's 5-Year Experience // *J. Clin. Immunol.* 2016. Vol. 36 (7). P. 649-655.
137. Gallo V, Dotta L, Giardino G., et al. Diagnostics of primary immunodeficiencies through next-generation sequencing // *Front. Immunol.* 2016. Vol. 7. P. 1–10.
138. Gangemi S, Manti S, Procopio V., et al. Lack of clear and univocal genotype-phenotype correlation in familial Mediterranean fever patients: A systematic review // *Clin. Genet.* 2018. Vol. 94 (1). P. 81-94.
139. Garg AD, Agostinis P. Cell death and immunity in cancer: From danger signals to mimicry of pathogen defense responses // *Immunol. Rev.* 2017. Vol. 280 (1). P. 126-148.
140. Garraway L.A., Lander E.S. Lessons from the cancer genome // *Cell.* 2013. Vol. 153 (1). P. 17-37.
141. Ge D, Fellay J, Thompson AJ., et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance // *Nature.* 2009. Vol. 461 (7262). P. 399-401
142. Gennery A.R. The Evolving Landscape of Primary Immunodeficiencies // *J. Clin. Immunol.* 2016. Vol. 36. № 4. P. 339–340.
143. German J, Sanz MM, Ciocci S, Ye TZ, Ellis NA. Syndrome-causing mutations of the BLM gene in persons in the Bloom's syndrome registry // *Hum. Mutat.* 2007. Vol. 28 (8). P. 743-753.
144. German J., Archibald R., Bloom D. Chromosomal breakage in a rare and probably genetically determined syndrome of man // *Science.* 1965. Vol. 148 (3669). P. 506-507.
145. Ghaoui R, Cooper ST, Lek M., et al. Use of whole-exome sequencing for diagnosis of limb-girdle muscular dystrophy: Outcomes and lessons learned // *JAMA Neurol.* 2015. Vol. 72 (12). P. 1424-1432.
146. Ghosh S., Seidel M.G. Editorial: Current Challenges in Immune and Other Acquired Cytopenias of Childhood // *Front. Pediatr.* 2016. Vol. 2. 4. P. 3.
147. Giannikou K, Malinowska IA, Pugh TJ., et al. Whole Exome Sequencing Identifies TSC1/TSC2 Biallelic Loss as the Primary and Sufficient Driver Event for Renal Angiomyolipoma Development // *PLoS Genet.* 2016. Vol. 12 (8). e1006242.
148. Giardiello FM, Allen JJ, Axilbund JE., et al. Guidelines on genetic evaluation and management of lynch syndrome: A consensus statement by the

- us multi-society task force on colorectal cancer // *Gastroenterology*. 2014. Vol. 57 (8). P. 1025-1048.
149. Giardiello FM, Trimbath JD. Peutz-Jeghers syndrome and management recommendations // *Clin. Gastroenterol. Hepatol*. 2006. Vol. 4(4). P. 408-415.
150. Gilad S, Bar-Shira A, Harnik R., et al. Ataxia-telangiectasia: founder effect among north African Jews // *Hum. Mol. Genet*. 1996. Vol. 5 (12). P. 2033-2037.
151. Gilissen C, Hoischen A, Brunner HG, Veltman JA. Unlocking Mendelian disease using exome sequencing // *Genome Biol*. 2011. Vol. 12. P. 228.
152. Glaubach T., Minella A.C., Corey S.J. Cellular stress pathways in pediatric bone marrow failure syndromes: Many roads lead to neutropenia // *Pediatr. Res*. 2014. Vol. 75 (1-2). P. 189-195.
153. Goldberg Y, Barnes-Kedar I, Lerer I., et al. Genetic features of Lynch syndrome in the Israeli population // *Clin. Genet*. 2015. Vol. 87 (6). P. 549-553.
154. Gonzalez RS, Riddle ND. Syndrome-Associated Tumors by Organ System // *J. Pediatr. Genet*. 2016. Vol. 5 (2). P. 105-115.
155. Gorodnova TV, Sokolenko AP, Ivantsov AO., et al. High response rates to neoadjuvant platinum-based therapy in ovarian cancer patients carrying germline BRCA mutation // *Cancer Lett*. 2015. Vol. 369 (2). P. 363-367.
156. Gorostidi A, Martí-Massó JF, Bergareche A., et al. Genetic Mutation Analysis of Parkinson's Disease Patients Using Multigene Next-Generation Sequencing Panels // *Mol. Diagnosis Ther*. 2016. Vol. 20 (5). P. 481-491.
157. Górski B, Debniak T, Masojć B., et al. Germline 657del5 mutation in the NBS1 gene in breast cancer patients // *Int. J. Cancer*. 2003. Vol. 106 (3). P. 379-381.
158. Goss KH, Risinger MA, Kordich JJ., et al. Enhanced tumor formation in mice heterozygous for Bln mutation // *Science*. 2002. Vol. 297 (5589). P. 2051-2053.
159. Gould GM, Grauman PV, Theilmann MR., et al. Detecting clinically actionable variants in the 3' exons of PMS2 via a reflex workflow based on equivalent hybrid capture of the gene and its pseudogene // *BMC Med. Genet*. 2018. Vol. 19 (1). P. 176.
160. Gracia-Aznarez FJ, Fernandez V, Pita G., et al. Whole exome sequencing suggests much of non-BRCA1/BRCA2 familial breast cancer is due to moderate and low penetrance susceptibility alleles // *PLoS One* 2013. Vol. 8:e55681.
161. Grandval P, Fabre AJ, Gaildrat P., et al. UMD-MLH1/MSH2/MSH6 databases: description and analysis of genetic variations in French Lynch syndrome families // *Database (Oxford)*. 2013. Vol. 2013. bat036.

162. Gratia M, Rodero MP, Conrad C., et al. Bloom syndrome protein restrains innate immune sensing of micronuclei by cGAS // *J. Exp. Med.* 2019. Vol. 216 (5). P. 1199-1213.
163. Greenwood CM, Sun S, Veenstra J., et al. How old is this mutation? - a study of three Ashkenazi Jewish founder mutations // *BMC Genet.* 2010. Vol. 11. P. 39.
164. Gruber SB, Ellis NA, Scott KK., et al. BLM heterozygosity and the risk of colorectal cancer // *Science.* 2002. Vol. 297 (5589). P. 2013.
165. Gryfe R, Kim H, Hsieh ET., et al. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer // *N. Engl. J. Med.* 2000. Vol. 342 (2). P. 69-77.
166. Guerra N, Tan YX, Joncker NT., et al. NKG2D-Deficient Mice Are Defective in Tumor Surveillance in Models of Spontaneous Malignancy // *Immunity.* 2008. Vol. 28 (4). P. 571-580.
167. Gundorova P, Zinchenko RA, Kuznetsova IA, Bliznetz EA, Stepanova AA, Polyakov AV. Molecular-genetic causes for the high frequency of phenylketonuria in the population from the North Caucasus // *PLoS One.* 2018. Vol. 13 (8). e0201489.
168. Haendel M, Vasilevsky N, Unni D, et al. How many rare diseases are there? // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2020. Vol. 19(2). P. 77-78.
169. Haffner ME, Torrent-Farnell J, Maher PD. Does orphan drug legislation really answer the needs of patients? // *Lancet.* 2008. Vol. 371 (9629). P. 2041-2044.
170. Hamel N, Feng BJ, Foretova L., et al. On the origin and diffusion of BRCA1 c.5266dupC (5382insC) in European populations // *Eur. J. Hum. Genet.* 2011 Vol. 19 (3). P. 300-306.
171. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: The next generation // *Cell.* 2011. Vol. 144 (5). P. 646-674.
172. Hauck F, Voss R, Urban C, Seidel MG. Intrinsic and extrinsic causes of malignancies in patients with primary immunodeficiency disorders // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2018. Vol. 141 (1). P. 59-68.
173. Heikkinen K, Karppinen SM, Soini Y., et al. Mutation screening of Mre11 complex genes: indication of RAD50 involvement in breast and ovarian cancer susceptibility. // *J. Med. Genet.* 2003. Vol. 40 (12). e131.
174. Heino M, Peterson P, Kudoh J., et al. APECED mutations in the autoimmune regulator (AIRE) gene // *Hum. Mutat.* 2001. Vol. 18 (3). P. 205-211.

175. Heintz N. Ataxia telangiectasia: Cell signaling, cell death and the cell cycle // *Curr. Opin. Neurol.* 1996. Vol. 9 (2). P.137-140.
176. Hendriks YM, Wagner A, Morreau H., et al. Cancer risk in hereditary nonpolyposis colorectal cancer due to MSH6 mutations: Impact on counseling and surveillance // *Gastroenterology.* 2004. Vol. 127 (1). P. 17-25.
177. Henske EP, Wessner LL, Golden J., et al. Loss of tuberlin in both subependymal giant cell astrocytomas and angiomyolipomas supports a two-hit model for the pathogenesis of tuberous sclerosis tumors. // *Am. J. Pathol.* 1997. Vol. 151 (6). P. 163
178. Hezel AF, Bardeesy N. LKB1; linking cell structure and tumor suppression // *Oncogene.* 2008. Vol. 27(55). P. 6908-6919.
179. Hilbers FS, Wijnen JT, Hoogerbrugge N., et al. Rare variants in XRCC2 as breast cancer susceptibility alleles // *J. Med. Genet.* 2012. Vol. 49. P. 618-620.
180. Hitchins M.P., Ward R.L. Constitutional (germline) MLH1 epimutation as an aetiological mechanism for hereditary non-polyposis colorectal cancer // *J. Med. Genet.* 2009. Vol. 46(12). P. 793-802.
181. Hoischen A., Krumm N., Eichler E.E. Prioritization of neurodevelopmental disease genes by discovery of new mutations // *Nat. Neurosci.* 2014. Vol. 17 (6). P. 764-772.
182. Holmberg M, Kristo P, Chadwicks RB., et al. Mutation sharing, predominant involvement of the MLH1 gene and description of four novel mutations in hereditary nonpolyposis colorectal cancer // *Hum. Mutat.* 1998. Vol. 11(6). P. 482.
183. Humphrey A, Higgins JN, Yates JR, Bolton PF. Monozygotic twins with tuberous sclerosis discordant for the severity of developmental deficits // *Neurology.* 2004. Vol. 63 (9). P. 1764.
184. Hung CC, Su YN, Chien SC., et al. Molecular and clinical analyses of 84 patients with tuberous sclerosis complex // *BMC Med. Genet.* 2006. Vol. 7. P. 72.
185. Irmejs A, Borosenko V, Melbarde-Gorkusa I., et al. Nationwide study of clinical and molecular features of hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) in Latvia. *Anticancer Res.* 2007. Vol. 27 (1B)/ P. 653-638.
186. Ismail NF, Rani AQ, Nik Abdul Malik NM., et al. Combination of Multiple Ligation-Dependent Probe Amplification and Illumina MiSeq Amplicon Sequencing for TSC1/TSC2 Gene Analyses in Patients with Tuberous Sclerosis Complex // *J. Mol. Diagnostics.* 2017. Vol. 19 (2). P. 265-276.

187. Ivanova-Smolenskaya IA, Ovchinnikov IV, Karabanov AV., et al. The His1069Gln mutation in the ATP7B gene in Russian patients with Wilson disease // *J. Med. Genet.* 1999. Vol. 36(2). P. 174.
188. Iyevleva AG, Suspitsin EN, Kroeze K., et al. Non-founder BRCA1 mutations in Russian breast cancer patients // *Cancer Lett.* 2010. T. 298. № 2. P. 258-263.
189. Jacobs JF, Nierkens S, Figdor CG, de Vries IJ, Adema GJ. Regulatory T cells in melanoma: The final hurdle towards effective immunotherapy? // *Lancet Oncol.* 2012. Vol. 13 (1). E. 32-42.
190. Jalanko H. Congenital nephrotic syndrome // *Pediatr. Nephrol.* 2009. Vol. 24 (11). P. 2121-2128.
191. Jang MA, Hong SB, Lee JH., et al. Identification of TSC1 and TSC2 mutations in Korean patients with tuberous sclerosis complex // *Pediatr. Neurol.* 2012. Vol. 46 (4). P. 222-224.
192. Jansen AC, Sancak O, D'Agostino MD., et al. Unusually mild tuberous sclerosis phenotype is associated with TSC2 R905Q mutation // *Ann. Neurol.* 2006. Vol. 60 (5). P. 528-539.
193. Jansen FE, Braams O, Vincken KL., et al. Overlapping neurologic and cognitive phenotypes in patients with TSC1 or TSC2 mutations // *Neurology.* 2008. Vol. 70 (12). P. 908-915.
194. Jekimovs CR, Chen X, Arnold J., et al. Low frequency of CHEK2 1100delC allele in Australian multiple-case breast cancer families: Functional analysis in heterozygous individuals // *Br. J. Cancer.* 2005. Vol. 92 (4). P. 784-90.
195. Jenkins MA, Hayashi S, O'Shea AM., et al. Pathology Features in Bethesda Guidelines Predict Colorectal Cancer Microsatellite Instability: A Population-Based Study // *Gastroenterology.* 2007. Vol. 133 (1). P. 48-56.
196. Jéru I, Le Borgne G, Cochet E., et al. Identification and functional consequences of a recurrent NLRP12 missense mutation in periodic fever syndromes // *Arthritis Rheum.* 2011. Vol. 63. № 5. P. 1459–1464.
197. Jiang YL, Zhao ZY, Li BR, Wang H, Yu ED, Ning SB. STK11 gene analysis reveals a significant number of splice mutations in Chinese PJS patients // *Cancer Genet.* 2019. Vol. 230. P. 47-57.
198. Jones AC, Shyamsundar MM, Thomas MW., et al. Comprehensive Mutation Analysis of TSC1 and TSC2 and Phenotypic Correlations in 150 Families with Tuberous Sclerosis // *Am. J. Hum. Genet.* 1999. Vol. 64 (5). P. 1305-1315.

199. Jonkman-Berk BM, van den Berg JM, Ten Berge IJ., et al. Primary immunodeficiencies in the Netherlands: National patient data demonstrate the increased risk of malignancy // *Clin. Immunol.* 2015. Vol. 156 (2). P. 154-162.
200. Jostins L, Ripke S, Weersma RK., et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease // *Nature.* 2012. Vol. 491 (7422). P. 119-124.
201. Józwiak J., Sontowska I., PŁoski R. Frequency of TSC1 and TSC2 mutations in American, British, Polish and Taiwanese populations // *Mol. Med. Rep.* 2013. Vol. 8 (3). P. 909-913.
202. Józwiak S, Kotulska K, Kasprzyk-Obara J., et al. Clinical and Genotype Studies of Cardiac Tumors in 154 Patients With Tuberous Sclerosis Complex // *Pediatrics.* 2006. Vol. 118 (4). E 1146-1151.
203. Józwiak S, Schwartz RA, Janniger CK, Bielicka-Cymerman J. Usefulness of diagnostic criteria of tuberous sclerosis complex in pediatric patients // *J. Child Neurol.* 2000. Vol. 15 (10). P. 652-659.
204. Jurecka A, Zakharova E, Cimbalistiene L. et al. Mucopolysaccharidosis type VI in Russia, Kazakhstan, and central and Eastern Europe // *Pediatr. Int.* 2014. Vol. 56(4). P. 520-525
205. Kalia SS, Adelman K, Bale SJ., et al. Recommendations for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing, 2016 update (ACMG SF v2.0): a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics // *Genet. Med.* 2017. Vol. 19. № 2. P. 249–255.
206. Kaneko H, Inoue R, Yamada Y., et al. Microsatellite instability in B-cell lymphoma originating from Bloom syndrome // *Int. J. Cancer.* 1996. Vol. 69 (6). P. 480-483.
207. Karacan İ, Balamir A, Uğurlu S., et al. Diagnostic utility of a targeted next-generation sequencing gene panel in the clinical suspicion of systemic autoinflammatory diseases: a multi-center study // *Rheumatol. Int.* 2019. Vol. 39 (5). P. 911-919.
208. Kerkhof J, Schenkel LC, Reilly J., et al. Clinical Validation of Copy Number Variant Detection from Targeted Next-Generation Sequencing Panels // *J. Mol. Diagnostics.* 2017. Vol. 19 (6). P. 905-920.
209. Kiiski JI, Peltari LM, Khan S., et al. Exome sequencing identifies FANCM as a susceptibility gene for triple-negative breast cancer // *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 2014. Vol. 111. P. 15172-15177.

210. King TA, Li W, Brogi E., et al. Heterogenic loss of the wild-type BRCA allele in human breast tumorigenesis // *Ann. Surg. Oncol.* 2007. Vol. 14 (9). P. 2510-2508.
211. Kingsmore SF, Dinwiddie DL, Miller NA, Soden SE, Saunders CJ. Adopting orphans: comprehensive genetic testing of Mendelian diseases of childhood by next-generation sequencing // *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2011. Vol. 11(8). P. 855-868.
212. Klammt J, Neumann D, Gevers EF., et al. Dominant-negative STAT5B mutations cause growth hormone insensitivity with short stature and mild immune dysregulation // *Nat. Commun.* 2018. Vol. 9. № 1. P. 2105.
213. Kleibl Z., Kristensen V.N. Women at high risk of breast cancer: Molecular characteristics, clinical presentation and management // *Breast.* 2016. Vol. 28/ P. 136-144.
214. Knudson A.G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1971. Vol. 68 (4). P. 820-823.
215. Kojima D, Wang X, Muramatsu H., et al. Application of extensively targeted next-generation sequencing for the diagnosis of primary immunodeficiencies // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2016. Vol. 138. № 1. P. 303-305.
216. Koivuluoma S, Tervasmäki A, Kauppila S., et al. Exome sequencing identifies a recurrent variant in SERPINA3 associating with hereditary susceptibility to breast cancer // *Eur. J. Cancer.* 2021. Vol. 143. P. 46-51.
217. Koné-Paut I, Hentgen V, Guillaume-Czitrom S., et al. The clinical spectrum of 94 patients carrying a single mutated MEFV allele // *Rheumatology.* 2009. Vol. 48 (7). P. 840-842.
218. Kong JC, Guerra GR, Pham T., et al. Prognostic impact of tumor-infiltrating lymphocytes in primary and metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-Analysis // *Dis. Colon Rectum.* 2019. Vol. 62. № 4. P. 498–508.
219. Koren-Michowitz M, Friedman E, Gershoni-Baruch R., et al. Coinheritance of BRCA1 and BRCA2 mutations with Fanconi anemia and Bloom syndrome mutations in Ashkenazi Jewish population: Possible role in risk modification for cancer development // *Am. J. Hematol.* 2005. Vol. 78 (3). P. 203-206.
220. Kothare SV, Singh K, Hochman T., et al. Genotype/phenotype in tuberous sclerosis complex: Associations with clinical and radiologic manifestations // *Epilepsia.* 2014. Vol. 55 (7). P. 1020-1024.

221. Kozina AA, Okuneva EG, Baryshnikova NV., et al. Neuronal ceroid lipofuscinosis in the Russian population: Two novel mutations and the prevalence of heterozygous carriers // *Mol. Genet. Genomic Med.* 2020. Vol. 8 (7). e1228.
222. Kozlowski P, Roberts P, Dabora S., et al. Identification of 54 large deletions/duplications in TSC1 and TSC2 using MLPA, and genotype-phenotype correlations // *Hum. Genet.* 2007. Vol. 121 (3-4). P. 389-400.
223. Ku CS, Cooper DN, Polychronakos C., et al. Exome sequencing: Dual role as a discovery and diagnostic tool // *Ann. Neurol.* 2012. Vol. 71 (1). P. 5-14.
224. Kumar N, Hanks ME, Chandrasekaran P., et al. Gain-of-function signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) mutation-related primary immunodeficiency is associated with disseminated mucormycosis // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2014. Vol. 134 (1). P. 236-239.
225. Kuo C.Y., Kohn D.B. Gene Therapy for the Treatment of Primary Immune Deficiencies // *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2016. Vol. 16 (5). P. 39.
226. Kurzawski G. Some aspects of molecular diagnostics in Lynch syndrome // *Hered. Cancer Clin. Pract.* 2006. Vol. 4 (4). P. 197-205.
227. Kushniarevich A, Utevska O, Chuhryaeva M. et al. Genetic heritage of the balto-slavic speaking populations: a synthesis of autosomal, mitochondrial and Y-chromosomal data // *PLoS One.* 2015. Vol. 10. № 9. P. 1–19.
228. Kwiatkowski DJ, Palmer MR, Jozwiak S., et al. Response to everolimus is seen in TSC-associated SEGAs and angiomyolipomas independent of mutation type and site in TSC1 and TSC2 // *Eur. J. Hum. Genet.* 2015. Vol. 23 (12). P. 1665-1672.
229. Laake K, Telatar M, Geitvik GA., et al. Identical mutation in 55% of the ATM alleles in 11 Norwegian AT families: Evidence for a founder effect // *Eur. J. Hum. Genet.* 1998. Vol. 6. № 3. P. 235–244.
230. Lagerstedt-Robinson K, Rohlin A, Aravidis C., et al. Mismatch repair gene mutation spectrum in the Swedish Lynch syndrome population // *Oncol. Rep.* 2016 Vol. 36 (5). P. 2823-2835.
231. Lainka E, Neudorf U, Lohse P., et al. Analysis of Cryopyrin-associated periodic syndromes (CAPS) in German children: Epidemiological, clinical and genetic characteristics // *Klin. Padiatr.* 2010. Vol. 222. № 6. P. 356–361.
232. Lalani SR, Safiullah AM, Molinari LM., et al. SEMA3E mutation in a patient with CHARGE syndrome // *J. Med. Genet.* 2004. Vol. 41(7). e94.

233. Lam H.C., Nijmeh J., Henske E.P. New developments in the genetics and pathogenesis of tumours in tuberous sclerosis complex // *J. Pathol.* 2017. Vol. 241 (2). P. 219-225.
234. Landau Y.E., Lichter-Konecki U., Levy H.L. Genomics in newborn screening // *J. Pediatr.* 2014. Vol. 164 (1). P. 14-19.
235. Langkau N, Martin N, Brandt R., et al. TSC1 and TSC2 mutations in tuberous sclerosis, the associated phenotypes and a model to explain observed TSC1/TSC2 frequency ratios // *Eur. J. Pediatr.* 2002. Vol. 161 (7). P. 393-402.
236. Lankisch P, Schiffner J, Ghosh S, Babor F, Borkhardt A, Laws HJ. The Duesseldorf Warning Signs for Primary Immunodeficiency: Is it Time to Change the Rules? // *J. Clin. Immunol.* 2015. Vol. 35 (3). P. 273-279.
237. Lapunzina P, López RO, Rodríguez-Laguna L, García-Miguel P, Martínez AR, Martínez-Glez V. Impact of NGS in the medical sciences: Genetic syndromes with an increased risk of developing cancer as an example of the use of new technologies // *Genet. Mol. Biol.* 2014. Vol. 37. Suppl 1. P. 241-249.
238. Le DT, Durham JN, Smith KN., et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade // *Science.* 2017. Vol. 357 (6349). P. 409-413.
239. Leegte B, van der Hout AH, Deffenbaugh AM., et al. Phenotypic expression of double heterozygosity for BRCA1 and BRCA2 germline mutations // *J. Med. Genet.* 2005. Vol. 42 (3). e20.
240. Lim HK, Seppänen M, Hautala T., et al. TLR3 deficiency in herpes simplex encephalitis: High allelic heterogeneity and recurrence risk // *Neurology.* 2014. Vol. 83. № 21. P. 1888–1897.
241. Lindesmith L, Moe C, Marionneau S., et al. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection // *Nat. Med.* 2003. Vol. 9 (5). P.548-553.
242. Lindsley AW, Saal HM, Burrow TA., et al. Defects of B-cell terminal differentiation in patients with type-1 Kabuki syndrome // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2016. Vol. 137. № 1. P. 179-187.
243. Ling Y, Cypowyj S, Aytekin C., et al. Inherited IL-17RC deficiency in patients with chronic mucocutaneous candidiasis // *J. Exp. Med.* 2015. Vol. 212 (5). P. 619-631.
244. Liu L, Okada S, Kong XF., et al. Gain-of-function human STAT1 mutations impair IL-17 immunity and underlie chronic mucocutaneous candidiasis // *J. Exp. Med.* 2011. Vol. 208 (8). P.1635-1648.
245. Locatelli F., Strahm B. How I treat myelodysplastic syndromes of childhood // *Blood.* 2018. Vol. 131 (13). P. 1406-1414.

246. Lyczkowski DA, Conant KD, Pulsifer MB., et al. Intrafamilial phenotypic variability in tuberous sclerosis complex // *J. Child Neurol.* 2007. Vol. 22 (12). P. 1348-1355.
247. Macginnitie A., Aloï F., Mishra S. Clinical characteristics of pediatric patients evaluated for primary immunodeficiency // *Pediatr. Allergy Immunol.* 2011. Vol. 22 (7). P. 671-675.
248. Maliaka YK, Chudina AP, Belev NF, Alday P, Bochkov NP, Buerstedde JM. CpG dinucleotides in the hMSH2 and hMLH1 genes are hotspots for HNPCC mutations // *Hum. Genet.* 1996. Vol. 97 (2). P. 251-255.
249. Malyarchuk B, Derenko M, Denisova G., et al. Whole mitochondrial genome diversity in two Hungarian populations // *Mol. Genet. Genomics.* 2018 Vol. 293 (5). P. 1255-1263.
250. Martin R.H., Rademaker A., German J. Chromosomal breakage in human spermatozoa, a heterozygous effect of the bloom syndrome mutation // *Am. J. Hum. Genet.* 1994. Vol. 55 (6). P. 1242-1246.
251. Martínez-Valdez L, Deyà-Martínez A, Giner MT., et al. Evans Syndrome as First Manifestation of Primary Immunodeficiency in Clinical Practice // *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 2017. Vol. 39 (7). P. 490-494.
252. Matsushita H, Vesely MD, Koboldt DC., et al. Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting // *Nature.* 2012. Vol. 482 (7385). P. 400-404.
253. Mayor PC, Eng KH, Singel KL., et al. Cancer in primary immunodeficiency diseases: Cancer incidence in the United States Immune Deficiency Network Registry // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2018. Vol. 141 (3). P. 1028-1035.
254. McConville CM, Stankovic T, Byrd PJ., et al. Mutations associated with variant phenotypes in ataxia-telangiectasia // *Am. J. Hum. Genet.* 1996. Vol. 59 (2). P. 320-330.
255. Meister M.T., Voss S., Schwabe D. Treatment of EBV-associated nodular sclerosing Hodgkin lymphoma in a patient with ataxia telangiectasia with brentuximab vedotin and reduced COPP plus rituximab // *Pediatr. Blood Cancer.* 2015. Vol. 62 (11). P. 2018-2020.
256. Mellouli F, Mustapha IB, Khaled MB., et al. Report of the Tunisian Registry of Primary Immunodeficiencies: 25-Years of Experience (1988–2012) // *J. Clin. Immunol.* 2015. Vol. 35 (8). P. 745-753.

257. Meng L, Pammi M, Saronwala A., et al. Use of exome sequencing for infants in intensive care units ascertainment of severe single-gene disorders and effect on medical management // *JAMA Pediatr.* 2017. Vol. 171 (12). e173438.
258. Miranda N.F.C.C. de, Björkman A., Pan-Hammarström Q. DNA repair: The link between primary immunodeficiency and cancer // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2011. Vol. 1246/ P. 50-63.
259. Miroschnikova VV, Romanova OV, Ivanova ON., et al. Identification of novel variants in the LDLR gene in Russian patients with familial hypercholesterolemia using targeted sequencing // *Biomed. Reports.* 2021. Vol. 14. № 1. P. 15.
260. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases-elimination, equilibrium and escape // *Curr. Opin. Immunol.* 2014. Vol. 27. P. 16-25.
261. Mitui M, Bernatowska E, Pietrucha B., et al. ATM gene founder haplotypes and associated mutations in Polish families with ataxia-telangiectasia // *Ann. Hum. Genet.* 2005. Vol. 69. № 6. P. 657–664.
262. Modell F., Puente D., Modell V. From genotype to phenotype. Further studies measuring the impact of a Physician Education and Public Awareness Campaign on early diagnosis and management of Primary Immunodeficiencies // *Immunol. Res.* 2009. Vol. 44 (1-3). P.132-149.
263. Moens LN, Falk-Sörqvist E, Asplund AC. et al. Diagnostics of primary immunodeficiency diseases: A sequencing capture approach // *PLoS One.* 2014. Vol. 9. № 12. P. 1–15.
264. Moliaka YK, Cella M, Chudina AP., et al. Mechanisms underlying mismatch repair deficiencies in normal cells // *Genes Chromosom. Cancer.* 1997. Vol. 20 (3). P. 305-309.
265. Morelli C, Formica V, Riondino S, Russo A, Ferroni P, Guadagni F, Roselli M. Irinotecan or Oxaliplatin: Which is the First Move for the Mate? // *Curr. Med. Chem.* 2021. Vol. 28 (16). P. 3158-3172.
266. Mørk N, Kofod-Olsen E, Sørensen KB., et al. Mutations in the TLR3 signaling pathway and beyond in adult patients with herpes simplex encephalitis // *Genes Immun.* 2015. Vol. 16. № 8. P. 552–566.
267. Mortaz E, Tabarsi P, Mansouri D., et al. Cancers related to immunodeficiencies: Update and perspectives // *Front. Immunol.* 2016. Vol. 7. P. 365.
268. Mueller B.U., Pizzo P.A. Malignancies in pediatric AIDS // *Curr. Opin. Pediatr.* 1996. Vol. 8 (1). P. 45-49.

269. Mukhina AA, Kuzmenko NB, Rodina YA., et al. Primary Immunodeficiencies in Russia: Data From the National Registry // *Front Immunol.* 2020. Vol. 11. P. 1491.
270. Napolioni V., Moavero R., Curatolo P. Recent advances in neurobiology of Tuberous Sclerosis Complex // *Brain Dev.* 2009. Vol. 31 (2). P. 104-113.
271. Nathan N, Keppler-Noreuil KM, Biesecker LG., et al. Mosaic Disorders of the PI3K/PTEN/AKT/TSC/mTORC1 Signaling Pathway // *Dermatol. Clin.* 2017. Vol. 35 (1). P. 51-60.
272. Nellist M, Brouwer RW, Kockx CE., et al. Targeted Next Generation Sequencing reveals previously unidentified and mutations // *BMC Med. Genet.* 2015. Vol. 16. P. 10.
273. Neuhausen S.L., Marshall C.J. Loss Of Heterozygosity In Familial Tumors From Three Brca1 -Linked Kindreds // *Cancer Res.* 1994. Vol. 54 (23). P. 6069-6072.
274. Ng SB, Buckingham KJ, Lee C. Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder // *Nat. Genet.* 2010. Vol. 42 (1). P. 30-35.
275. Ngeow J, Heald B, Rybicki LA, et al. Prevalence of germline PTEN, BMPR1A, SMAD4, STK11, and ENG mutations in patients with moderate-load colorectal polyps // *Gastroenterology.* 2013. Vol. 144(7). P. 1402-1409.
276. Nguengang Wakap S, Lambert DM, et al. Estimating cumulative point prevalence of rare diseases: analysis of the Orphanet database // *Eur. J. Hum. Genet.* 2020. Vol. 28(2). P. 165-173.
277. Nicholaou T, Chen W, Davis ID., et al. Immunoediting and persistence of antigen-specific immunity in patients who have previously been vaccinated with NY-ESO-1 protein formulated in ISCOMATRIX™ // *Cancer Immunol. Immunother.* 2011. Vol. 60 (11). P. 1625-1637.
278. Niida Y, Lawrence-Smith N, Banwell A., et al. Analysis of both TSC1 and TSC2 for germline mutations in 126 unrelated patients with tuberous sclerosis // *Hum. Mutat.* 1999. Vol. 14 (5). P. 412-422.
279. Niida Y, Wakisaka A, Tsuji T., et al. Mutational analysis of TSC1 and TSC2 in Japanese patients with tuberous sclerosis complex revealed higher incidence of TSC1 patients than previously reported // *J. Hum. Genet.* 2013. Vol. 58 (4). P.216-225.
280. Nijman IJ, van Montfrans JM, Hoogstraat M., et al. Targeted next-generation sequencing: A novel diagnostic tool for primary immunodeficiencies // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2014. Vol. 133. № 2. P. 1–7.

281. Noh JM, Kim J, Cho DY, Choi DH, Park W, Huh SJ. Exome sequencing in a breast cancer family without BRCA mutation // *Radiat. Oncol. J.* 2015. Vol. 33/ P. 149-154.
282. Northrup H, Krueger DA; International Tuberous Sclerosis Complex Consensus Group. Tuberous sclerosis complex diagnostic criteria update: Recommendations of the 2012 international tuberous sclerosis complex consensus conference // *Pediatr. Neurol.* 2013. Vol. 49 (4). P. 243-254.
283. Northrup H, Aronow ME, Bebin EM, et al. Updated International Tuberous Sclerosis Complex Diagnostic Criteria and Surveillance and Management Recommendations // *Pediatr. Neurol.* 2021. Vol. 123/ P. 50-66.
284. Nowak-Wegrzyn A, Crawford TO, Winkelstein JA, Carson KA, Lederman HM. Immunodeficiency and infections in ataxia-telangiectasia // *J. Pediatr.* 2004. Vol. 144 (4). P. 505-511.
285. Nyström-Lahti M, Kristo P, Nicolaides NC., et al. Founding mutations and Alu-mediated recombination in hereditary colon cancer // *Nat. Med.* 1995. Vol. 1 (11). P. 1203-1206.
286. Ohashi T. Enzyme replacement therapy for lysosomal storage diseases // *Pediatr. Endocrinol. Rev.* 2012. Vol.10. Suppl. 1. P. 26-34.
287. Olopade OI, Grushko TA, Nanda R, Huo D. Advances in breast cancer: pathways to personalized medicine // *Clin. Cancer Res.* 2008. Vol. 14 (24). P. 7988-7999.
288. Orlov IE, Laidus TA, Tumakova AV, Yanus GA, Iyevleva AG, Sokolenko AP, Bizin IV, Imyanitov EN, Suspitsin EN. Identification of recurrent pathogenic alleles using exome sequencing data: Proof-of-concept study of Russian subjects // *Eur. J. Med. Genet.* 2022. Vol. 65 (2). P. 104426.
289. Orlova EM, Bukina AM, Kuznetsova ES., et al. Autoimmune polyglandular syndrome type 1 in Russian patients: clinical variants and autoimmune regulator mutations // *Horm. Res. Paediatr.* 2010. Vol. 73 (6). P. 449-457.
290. Orlova EM, Sozaeva LS, Kareva MA., et al. Expanding the phenotypic and genotypic landscape of autoimmune polyendocrine syndrome type 1 // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2017. Vol. 102 (9). P. 3546-3556.
291. O'Sullivan MD, Cant AJ. The 10 warning signs: A time for a change? // *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2012. Vol. 12 (6). P. 588-594.
292. Ovadia A, Sharfe N, Hawkins C, Laughlin S, Roifman CM. Two different STAT1 gain-of-function mutations lead to diverse IFN- γ -mediated gene expression // *NPJ Genom. Med.* 2018. Vol. 3. P.23.

293. Overman MJ, McDermott R, Leach JL., et al. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study // *Lancet Oncol.* 2017. Vol. 18 (9). P. 1182-1191.
294. Pan-Hammarström Q, Salzer U, Du L., et al. Reexamining the role of TACI coding variants in common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency // *Nat. Genet.* 2007. Vol. 39 (4). P. 429-430.
295. Papa R, Doglio M, Lachmann HJ., et al. A web-based collection of genotype-phenotype associations in hereditary recurrent fevers from the Eurofever registry // *Orphanet J. Rare Dis.* 2017. Vol. 12 (1). P. 167.
296. Parenti S, Rabacchi C, Marino M., et al. Characterization of New ATM Deletion Associated with Hereditary Breast Cancer // *Genes (Basel).* 2021. Vol. 12 (2). P. 136.
297. Park DJ, Lesueur F, Nguyen-Dumont T., et al. Rare mutations in XRCC2 increase the risk of breast cancer // *Am. J. Hum. Genet.* 2012. Vol. 90. P. 734-739.
298. Pastorczak A., Szczepanski T., Mlynarski W. Clinical course and therapeutic implications for lymphoid malignancies in Nijmegen breakage syndrome // *Eur. J. Med. Genet.* 2016. Vol. 59 (3). P. 126-132.
299. Pastorczak A, Attarbaschi A, Bomken S., et al. Consensus Recommendations for the Clinical Management of Hematological Malignancies in Patients with DNA Double Stranded Break Disorders // *Cancers (Basel).* 2022. Vol. 14 (8). P. 2000.
300. Pathak SJ, Mueller JL, Okamoto K., et al. EPCAM mutation update: Variants associated with congenital tufting enteropathy and Lynch syndrome // *Hum. Mutat.* 2019. Vol. 40 (2). P. 142-161.
301. Patterson MC, Hendriksz CJ, Walterfang M, Sedel F, Vanier MT, Wijburg F; NP-C Guidelines Working Group. Recommendations for the diagnosis and management of Niemann-Pick disease type C: an update. *Mol. Genet. Metab.* 2012 Jul;106(3):330-44.
302. Pelttari LM, Kiiski JI, Ranta S, Vilske S, Blomqvist C, Aittomäki K, Nevanlinna H. RAD51, XRCC3, and XRCC2 mutation screening in Finnish breast cancer families // *Springerplus* 2015. Vol. 4. P. 92.
303. Pérez de Diego R, Sancho-Shimizu V, Lorenzo L., et al. Human TRAF3 Adaptor Molecule Deficiency Leads to Impaired Toll-like Receptor 3 Response and Susceptibility to Herpes Simplex Encephalitis // *Immunity.* 2010. Vol. 33 (3). P. 400-411.

304. Petrova N, Balinova N, Marakhonov A., et al. Ethnic Differences in the Frequency of CFTR Gene Mutations in Populations of the European and North Caucasian Part of the Russian Federation. // *Front. Genet.* 2021. Vol. 12. P. 678374.
305. Petrova NV, Kashirskaya NY, Vasilyeva TA., et al. Analysis of CFTR Mutation Spectrum in Ethnic Russian Cystic Fibrosis Patients // *Genes (Basel)*. 2020. Vol. 11. № 5. P. 554.
306. Pfundt R, Del Rosario M, Vissers LELM., et al. Detection of clinically relevant copy-number variants by exome sequencing in a large cohort of genetic disorders // *Genet. Med.* 2017. Vol. 19. № 6. P. 667.
307. Picard C, Al-Herz W, Bousfiha A., et al. Primary Immunodeficiency Diseases: an Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency 2015 // *J. Clin. Immunol.* 2015. Vol. 35. № 8. P. 696–726.
308. Picard C, Bobby Gaspar H, Al-Herz W., et al. International Union of Immunological Societies: 2017 Primary Immunodeficiency Diseases Committee Report on Inborn Errors of Immunity // *J. Clin. Immunol.* 2018. Vol. 38 (1). P. 96-128.
309. Pino M.S., Chung D.C. Microsatellite instability in the management of colorectal cancer // *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2011. Vol. 5 (3). P. 385-399.
310. Pinto D, Pinto C, Guerra J., et al. Contribution of MLH1 constitutional methylation for Lynch syndrome diagnosis in patients with tumor MLH1 downregulation // *Cancer Med.* 2018. Vol. 7 (2)/ P. 433-444.
311. Platonov FA, Tyryshkin K, Tikhonov DG., et al. Genetic fitness and selection intensity in a population affected with high-incidence spinocerebellar ataxia type 1 // *Neurogenetics.* 2016. Vol. 17 (3). P. 179-185.
312. Platt C., Geha R.S., Chou J. Gene hunting in the genomic era: Approaches to diagnostic dilemmas in patients with primary immunodeficiencies // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2014. Vol. 134 (2). P. 262-268.
313. Podralska MJ, Stembalska A, Ślęzak R., et al. Ten new ATM alterations in Polish patients with ataxia-telangiectasia // *Mol. Genet. Genomic Med.* 2014. Vol. 2. № 6. P. 504–511.
314. Ponsford MJ, Rae W, Klocperk A. What is new in HIES? Recent insights from the interface of primary immune deficiency and atopy // *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2018. Vol. 18 (6). P. 445-452.

315. Porhanova NV, Sokolenko AP, Sherina NY., et al. Ovarian cancer patient with germline mutations in both BRCA1 and NBN genes // *Cancer Genet. Cytogenet.* 2008. Vol. 186 (2). P.122-124.
316. Prokofyeva D, Bogdanova N, Dubrowinskaja N., et al. Nonsense mutation p.Q548X in BLM, the gene mutated in Bloom's syndrome, is associated with breast cancer in Slavic populations // *Breast Cancer Res. Treat.* 2012. Vol. 137. № 2. P. 533–539.
317. Puel A, Cypowyj S, Bustamante J., et al. Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity // *Science.* 2011. Vol. 332 (6025). P. 65-68.
318. Pulvirenti F, Zuntini R, Milito C., et al. Clinical Associations of Biallelic and Monoallelic TNFRSF13B Variants in Italian Primary Antibody Deficiency Syndromes // *J. Immunol. Res.* 2016. Vol. 2016. P. 8390356.
319. Qin W, Kozlowski P, Taillon BE., et al. Ultra deep sequencing detects a low rate of mosaic mutations in tuberous sclerosis complex // *Hum. Genet.* 2010. Vol. 127 (5). P. 573-582.
320. Quach H, Rotival M, Pothlichet J, et al. Genetic Adaptation and Neandertal Admixture Shaped the Immune System of Human Populations // *Cell.* 2016. Vol. 167 (3). P. 643-656.
321. Rabbani B., Tekin M., Mahdieh N. The promise of whole-exome sequencing in medical genetics // *J. Hum. Genet.* 2014. Vol. 59 (1). P. 5-15.
322. Rae W, Ward D, Mattocks C., et al. Clinical efficacy of a next-generation sequencing gene panel for primary immunodeficiency diagnostics // *Clin. Genet.* 2018. Vol. 93 (3). P. 647-655.
323. Rahman N., Scott R.H. Cancer genes associated with phenotypes in monoallelic and biallelic mutation carriers: New lessons from old players // *Hum. Mol. Genet.* 2007. Vol. 16. Spec No 1. R60-66.
324. Raje N, Soden S, Swanson D., et al. Utility of Next Generation Sequencing in Clinical Primary Immunodeficiencies // *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2014. Vol. 14. № 10. P. 1–13.
325. Ralf C., Hickson I.D., Wu L. The Bloom's syndrome helicase can promote the regression of a model replication fork // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281 (32). P. 22839-22846.
326. Ramensky VE, Ershova AI, Zaicenoka M., et al. Targeted Sequencing of 242 Clinically Important Genes in the Russian Population From the Ivanovo Region // *Front. Genet.* 2021. Vol. 12. P.709419.

327. Ren H, Francis W, Boys A, et al. BAC-based PCR fragment microarray: high-resolution detection of chromosomal deletion and duplication breakpoints. // *Hum. Mutat.* 2005. Vol. 25(5). P. 476-82.
328. Rendtorff ND, Bjerregaard B, Frödin M., et al. Analysis of 65 tuberous sclerosis complex (TSC) patients by TSC2 DGGE, TSC1/TSC2 MLPA, and TSC1 long-range PCR sequencing, and report of 28 novel mutations // *Hum. Mutat.* 2005. Vol. 26 (4). P. 374-383.
329. Resnick IB, Kondratenko I, Pashanov E., et al. 657del5 mutation in the gene for Nijmegen breakage syndrome (NBS1) in a cohort of Russian children with lymphoid tissue malignancies and controls // *Am. J. Med. Genet.* 2003. Vol. 120A (2). P. 174-179.
330. Rezaei N, Hedayat M, Aghamohammadi A, Nichols KE. Primary immunodeficiency diseases associated with increased susceptibility to viral infections and malignancies // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011. Vol. 127. № 6. P. 1329-1341.
331. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ., et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer // *N. Engl. J. Med.* 2003. Vol. 349 (3). P. 247-257.
332. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D. et. al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology // *Genet. Med.* 2015. Vol. 17(5). P. 405-424.
333. Roa B.B., Savino C. V., Richards C.S. Ashkenazi Jewish population frequency of the Bloom syndrome gene 2281 Δ 6ins7 mutation // *Genet. Test.* 1999. Vol. 3. № 2. P. 219–221.
334. Romberg N, Chamberlain N, Saadoun D., et al. CVID-associated TACI mutations affect autoreactive B cell selection and activation // *J. Clin. Invest.* 2013. Vol. 123 (10). P. 4283-4293.
335. Russnes HG, Kuligina ESh, Suspitsin EN., et al. Paired distribution of molecular subtypes in bilateral breast carcinomas // *Cancer Genet.* 2011. Vol. 204. № 2. P. 96-102.
336. Ryan JG, Masters SL, Booty MG., et al. Clinical features and functional significance of the P369S/R408Q variant in pyrin, the familial Mediterranean fever protein // *Ann. Rheum. Dis.* 2010. Vol. 69 (7). P. 1383-1388.
337. Ryan, N.A.J., Glaire, M.A., Blake, D. et al. The proportion of endometrial cancers associated with Lynch syndrome: a systematic review of the literature and meta-analysis // *Genet. Med.* 2019. Vol. 21. P. 2167–2180.

338. Salavoura K, Kolialexi A, Tsangaris G, Mavrou A. Development of cancer in patients with primary immunodeficiencies // *Anticancer Res.* 2008. Vol. 28 (2B). P. 1263-1269.
339. Salovaara R, Loukola A, Kristo P., et al. Population-based molecular detection of hereditary nonpolyposis colorectal cancer // *J. Clin. Oncol.* 2000. Vol. 18 (11). P. 2193-2200.
340. Saltz LB, Niedzwiecki D, Hollis D., et al. Irinotecan fluorouracil plus leucovorin is not superior to fluorouracil plus leucovorin alone as adjuvant treatment for stage III colon cancer: Results of CALGB 89803 // *J. Clin. Oncol.* 2007. Vol. 25 (23). P. 3456-3461.
341. Salzer U, Chapel HM, Webster AD., et al. Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans // *Nat. Genet.* 2005. Vol. 37 (8). P. 820-828.
342. Samadder NJ, Smith KR, Wong J., et al. Cancer Risk in Families Fulfilling the Amsterdam Criteria for Lynch Syndrome // *JAMA Oncol.* 2017. Vol. 3 (12). P.1697-1701.
343. Sampaio EP, Bax HI, Hsu AP., et al. A novel STAT1 mutation associated with disseminated mycobacterial disease // *J. Clin. Immunol.* 2012. Vol. 32(4). P. 681-689.
344. Samson M, Libert F, Doranz BJ., et al. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene // *Nature.* 1996. Vol. 382 (6593). P. 722-725.
345. Samueli S, Abraham K, Dressler A., et al. Efficacy and safety of Everolimus in children with TSC - associated epilepsy - Pilot data from an open single-center prospective study // *Orphanet J. Rare Dis.* 2016. Vol. 11 (1). P. 145.
346. Sancak O, Nellist M, Goedbloed M., et al. Mutational analysis of the TSC1 and TSC2 genes in a diagnostic setting: Genotype-phenotype correlations and comparison of diagnostic DNA techniques in tuberous sclerosis complex // *Eur. J. Hum. Genet.* 2005. Vol. 13 (6). P. 731-741.
347. Sanchez-Navarro I, R J da Silva L, Blanco-Kelly F., et al. Combining targeted panel-based resequencing and copy-number variation analysis for the diagnosis of inherited syndromic retinopathies and associated ciliopathies // *Sci. Rep.* 2018. Vol. 8 (1). P. 5285.
348. Sandoval C., Swift M. Hodgkin disease in ataxia-telangiectasia patients with poor outcomes // *Med. Pediatr. Oncol.* 2003. Vol. 40 (3). P. 162-166.

349. Santarosa M., Ashworth A. Haploinsufficiency for tumour suppressor genes: When you don't need to go all the way // *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer*. 2004. Vol. 1654 (2). P. 105-122.
350. Sargent DJ, Marsoni S, Monges G., et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer // *J. Clin. Oncol.* 2010. Vol. 28 (20). P. 3219-3226.
351. Sarnat H.B., Flores-Sarnat L. Embryology of the neural crest: Its inductive role in the neurocutaneous syndromes // *J. Child Neurol.* 2005. Vol. 20 (8). P. 637-643.
352. Sasongko TH, Wataya-Kaneda M, Koterazawa K., et al. Novel mutations in 21 patients with tuberous sclerosis complex and variation of tandem splice-acceptor sites in TSC1 exon 14 // *Kobe J. Med. Sci.* 2008. Vol. 54 (1). E 73-81.
353. Saucedo L, Ackermann L, Platonov AE., et al. Delineation of additional genetic bases for C8 beta deficiency. Prevalence of null alleles and predominance of C>T transition in their genesis // *J. Immunol.* 1995. Vol. Nov 15. № 155 (10). P. 5022–5028.
354. Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S., et al. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase // *Science*. 1995. Vol. 268 (5218). P. 1749-1753.
355. Schieppati A, Henter JI, Daina E, Aperia A. Why rare diseases are an important medical and social issue // *Lancet*. 2008. Vol. 371 (9629). P. 2039-2041.
356. Schoenaker MHD, Henriët SS, Zonderland J., et al. Immunodeficiency in Bloom's Syndrome // *J. Clin. Immunol.* 2018. Vol. 38. № 1. P. 35–44.
357. Schreiber R.D., Old L.J., Smyth M.J. Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion // *Science*. 2011. Vol. 331 (6024). P. 1565-1570.
358. Schwartz RA, Fernández G, Kotulska K, Józwiak S. Tuberous sclerosis complex: Advances in diagnosis, genetics, and management // *J. Am. Acad. Dermatol.* 2007. Vol. 57 (2). P. 189-202.
359. Seemanová E, Jarolim P, Seeman P., et al. Cancer risk of heterozygotes with the NBN founder mutation // *J. Natl. Cancer Inst.* 2007. Vol. 99 (24). P. 1875-1880.
360. Seemanova E, Varon R, Vejvalka J. et al. The Slavic NBN Founder Mutation: A Role for Reproductive Fitness? // *PLoS One*. 2016. Vol. 11(12). E0167984.

361. Seidemann K, Tiemann M, Henze G., et al. Therapy for non-Hodgkin lymphoma in children with primary immunodeficiency: Analysis of 19 patients from the BFM trials // *Med. Pediatr. Oncol.* 1999. Vol. 33 (6). P. 536-544.
362. Sharapova SO, Guryanova IE, Pashchenko OE. et al. Molecular Characteristics, Clinical and Immunologic Manifestations of 11 Children with Omenn Syndrome in East Slavs (Russia, Belarus, Ukraine) // *J. Clin. Immunol.* 2016. Vol. 36(1). P. 46-55.
363. Shashi V, McConkie-Rosell A., et al. The utility of the traditional medical genetics diagnostic evaluation in the context of next-generation sequencing for undiagnosed genetic disorders // *Genet. Med.* 2014. Vol.16 (2). P. 176-82.
364. Shiloh Y., Ziv Y. The ATM protein kinase: Regulating the cellular response to genotoxic stress, and more // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2013. Vol. 14 (4). P.197-210.
365. Shukla V, Seoane-Vazquez E, Fawaz S, Brown L, Rodriguez-Monguio R. The Landscape of Cellular and Gene Therapy Products: Authorization, Discontinuations, and Cost // *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* 2019. Vol. 30 (3). P. 102-113.
366. Schubert S, van Luttikhuisen JL, Auber B., et al. The identification of pathogenic variants in BRCA1/2 negative, high risk, hereditary breast and/or ovarian cancer patients: High frequency of FANCM pathogenic variants // *Int. J. Cancer.* 2019. Vol. 144(11). P. 2683-2694.
367. Singleton A.B. Exome sequencing: A transformative technology // *Lancet Neurol.* 2011. Vol. 10 (10). P. 942-946.
368. Slack J, Albert MH, Balashov D., et al. Outcome of hematopoietic cell transplantation for DNA double-strand break repair disorders // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2018. Vol. 141 (1). P. 322-328.
369. Snape K, Ruark E, Tarpey P., et al. Predisposition gene identification in common cancers by exome sequencing: insights from familial breast cancer // *Breast Cancer Res. Treat.* 2012. Vol. 134. P. 429-433.
370. Sodha N, Bullock S, Taylor R., et al. CHEK2 variants in susceptibility to breast cancer and evidence of retention of the wild type allele in tumours // *Br. J. Cancer.* 2002. Vol. 87 (12). P. 1445-1448.
371. Sokolenko AP, Mitiushkina NV, Buslov KG., et al. High frequency of BRCA1 5382insC mutation in Russian breast cancer patients // *Eur J Cancer.* 2006 Vol. 42 (10). P. 380-384.

372. Sokolenko AP, Rozanov ME, Mitiushkina NV., et al. Founder mutations in early-onset, familial and bilateral breast cancer patients from Russia // *Fam. Cancer*. 2007. Vol. 6 (3). P. 281-286.
373. Sokolenko AP, Iyevleva AG, Preobrazhenskaya EV., et al. High prevalence and breast cancer predisposing role of the BLM c.1642 C>T (Q548X) mutation in Russia // *Int. J. Cancer*. 2012. Vol. 130. P. 2867-2873.
374. Sokolenko AP, Suspitsin EN, Kuligina ESh., et al. Identification of novel hereditary cancer genes by whole exome sequencing // *Cancer Lett*. 2015. Vol. 369 (2). P. 274-288.
375. Soukupova J, Dundr P, Kleibl Z, Pohlreich P. Contribution of mutations in ATM to breast cancer development in the Czech population // *Oncol. Rep*. 2008. Vol. 19. № 6. P. 1505–1510.
376. Soukupova J., Pohlreich P., Seemanova E. Characterisation of ATM mutations in Slavic ataxia telangiectasia patients // *Neuro Molecular Med*. 2011. Vol. 13. № 3. P. 204–211.
377. Staley BA, Vail EA, Thiele EA. Tuberous Sclerosis Complex: Diagnostic Challenges, Presenting Symptoms, and Commonly Missed Signs // *Pediatrics*. 2011. Vol. 127 (1). e117-125.
378. Stankovic T, Kidd AM, Sutcliffe A., et al. ATM Mutations and Phenotypes in Ataxia-Telangiectasia Families in the British Isles: Expression of Mutant ATM and the Risk of Leukemia, Lymphoma, and Breast Cancer // *Am. J. Hum. Genet*. 1998. Vol. 62. № 2. P. 334–345.
379. Staples ER, McDermott EM, Reiman A., et al. Immunodeficiency in ataxia telangiectasia is correlated strongly with the presence of two null mutations in the ataxia telangiectasia mutated gene // *Clin. Exp. Immunol*. 2008. Vol. 153. № 2. P. 214–220.
380. Stella A, Cortellessa F, Scaccianoce G, Pivetta B, Settimo E, Portincasa P. Familial Mediterranean fever: Breaking all the (genetic) rules // *Rheumatol. (United Kingdom)*. 2019. Vol. 58 (3). P. 463-467.
381. Stoddard JL, Niemela JE, Fleisher TA, Rosenzweig SD. Targeted NGS: A cost-effective approach to molecular diagnosis of PIDs // *Front. Immunol*. 2014. Vol. 5. № Nov. P. 1–7.
382. Stoffel E, Mukherjee B, Raymond VM., et al. Calculation of Risk of Colorectal and Endometrial Cancer Among Patients With Lynch Syndrome // *Gastroenterology*. 2009. Vol. 137 (5). P. 1621-1627.
383. Stoffel EM, Mangu PB, Limburg PJ., et al. Hereditary colorectal cancer syndromes: American society of clinical oncology clinical practice guideline

- endorsement of familial risk-colorectal cancer: European Society for medical oncology clinical practice guidelines // *J. Clin. Oncol.* 2015. Vol. 11 (3). E 437-441.
384. Stray-Pedersen A, Aaberge IS, Früh A, Abrahamsen TG. Pneumococcal conjugate vaccine followed by pneumococcal polysaccharide vaccine; immunogenicity in patients with ataxia-telangiectasia // *Clin. Exp. Immunol.* 2005. Vol. 140(3). P. 507-516
385. Stray-Pedersen A, Borresen-Dale AL, Paus E., et al. Alpha fetoprotein is increasing with age in ataxia-telangiectasia // *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 2007. Vol. 11. № 6. P. 375–380.
386. Stray-Pedersen A, Sorte HS, Samarakoon P., et al. Primary immunodeficiency diseases: Genomic approaches delineate heterogeneous Mendelian disorders // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2017. Vol. 139 (1). P. 232-245.
387. Suarez F, Mahlaoui N, Canioni D., et al. Incidence, presentation, and prognosis of malignancies in ataxia-telangiectasia: A report from the french national registry of primary immune deficiencies // *J. Clin. Oncol.* 2015. Vol. 33 (2). P. 202-208.
388. Subbiah V, Yang D, Velcheti V, Drilon A, Meric-Bernstam F. State-of-the-Art Strategies for Targeting RET-Dependent Cancers // *J Clin Oncol.* 2020. Vol. 38(11). P. 1209-1221.
389. Sun J, Wang Y, Xia Y., et al. Mutations in RECQL Gene Are Associated with Predisposition to Breast Cancer // *PLoS Genet.* 2015. Vol. 11:e1005228.
390. Sun Y, Xiang J, Liu Y., et al. Increased diagnostic yield by reanalysis of data from a hearing loss gene panel // *BMC Med. Genomics.* 2019. Vol. 12 (1). P.76.
391. Sunga AY, Ricker C, Espenschied CR., et al. Spectrum of mismatch repair gene mutations and clinical presentation of Hispanic individuals with Lynch syndrome // *Cancer Genet.* 2017. Vol. 212-213/ P. 1-7.
392. Suspitsin EN, Yanus GA, Dorofeeva MY., et al. Pattern of TSC1 and TSC2 germline mutations in Russian patients with tuberous sclerosis // *J. Hum. Genet.* 2018. Vol. 63 (5). P. 597-604.
393. Sylvester DE, Chen Y, Grima N, et al. Rare germline variants in childhood cancer patients suspected of genetic predisposition to cancer // *Genes Chromos. Cancer.* 2022. Vol. 61 (2). P. 81-93.
394. Sylvester DE, Chen Y, Jamieson RV, Dalla-Pozza L, Byrne JA. Investigation of clinically relevant germline variants detected by next-generation

- sequencing in patients with childhood cancer: a review of the literature // *J. Med. Genet.* 2018 Vol. 55 (12). P. 785-793.
395. Talevich E, Shain AH, Botton T, Bastian BC. CNVkit: Genome-Wide Copy Number Detection and Visualization from Targeted DNA Sequencing // *PLoS Comput. Biol.* 2016. Vol. 12 (4). e1004873.
396. Tangye SG, Al-Herz W, Bousfiha A., et al. The Ever-Increasing Array of Novel Inborn Errors of Immunity: an Interim Update by the IUIS Committee. *J. Clin. Immunol.* 2021. Vol. 41(3). P. 666-679.
397. Tangye SG, Al-Herz W, Bousfiha A, et al. Human Inborn Errors of Immunity: 2022 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee // *J. Clin. Immunol.* 2022. Jun 24. P. 1–35.
398. Tavgigian SV, Oefner PJ, Babikyan D., et al. Rare, Evolutionarily Unlikely Missense Substitutions in ATM Confer Increased Risk of Breast Cancer // *Am. J. Hum. Genet.* 2009. Vol. 85 (4). P. 427-446.
399. Teive HA, Moro A, Moscovich M., et al. Ataxia-telangiectasia - A historical review and a proposal for a new designation: ATM syndrome // *J. Neurol. Sci.* 2015. Vol. 355 (1-2). P. 3-6.
400. Telatar M, Teraoka S, Wang Z., et al. Ataxia-Telangiectasia: Identification and Detection of Founder-Effect Mutations in the ATM Gene in Ethnic Populations // *Am. J. Hum. Genet.* 1998. Vol. 62 (1). P. 86-97.
401. Thompson ER, Doyle MA, Ryland GL., et al. Exome Sequencing Identifies Rare Deleterious Mutations in DNA Repair Genes FANCC and BLM as Potential Breast Cancer Susceptibility Alleles // *PLoS Genet.* 2012. Vol. 8 (9). e1002894.
402. Thrasher AJ, Williams DA. Evolving Gene Therapy in Primary Immunodeficiency // *Mol. Ther.* 2017. Vol. 25 (5). P. 1132-1141.
403. Thye T, Owusu-Dabo E, Vannberg FO., et al. Common variants at 11p13 are associated with susceptibility to tuberculosis // *Nat. Genet.* 2012. Vol. 44 (3). P. 257-259.
404. Tikoo S., Sengupta S. Time to Bloom // *Genome Integr.* 2010. Vol. 1 (1). P. 14.
405. Tischkowitz M, Xia B, Sabbaghian N., et al. Analysis of PALB2/FANCN-associated breast cancer families // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007. Vol. 104 (16). P.6788-6793.

406. Toubiana J, Okada S, Hiller J., et al. Heterozygous STAT1 gain-of-function mutations underlie an unexpectedly broad clinical phenotype // *Blood*. 2016. Vol. 127. № 25. P. 3154–3164.
407. Tran H, Nourse J, Hall S, Green M, Griffiths L, Gandhi MK. Immunodeficiency-associated lymphomas // *Blood Rev*. 2008. Vol. 22 (5). P. 261-281.
408. Trizuljak J, Petruchová T, Blaháková I., et al. Diagnosis of Bloom Syndrome in a Patient with Short Stature, Recurrence of Malignant Lymphoma, and Consanguineous Origin // *Mol. Syndromol*. 2020. Vol. 11(2). P. 73-82.
409. Tsaousis GN, Papadopoulou E, Apeessos A., et al. Analysis of hereditary cancer syndromes by using a panel of genes: Novel and multiple pathogenic mutations // *BMC Cancer*. 2019. Vol. 19 (1). P. 535.
410. Tyburczy ME, Wang JA, Li S., et al. Sun exposure causes somatic second-hit mutations and angiofibroma development in tuberous sclerosis complex // *Hum. Mol. Genet*. 2014. Vol. 23 (8). P. 2023-2039.
411. Umar A, Boland CR, Terdiman JP., et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability // *J. Natl. Cancer Inst*. 2004. Vol. 96 (4). P. 261-268.
412. Uzel G, Sampaio EP, Lawrence MG., et al. Dominant gain-of-function STAT1 mutations in FOXP3 wild-type immune dysregulation-polyendocrinopathy-enteropathy-X-linked-like syndrome // *J. Allergy Clin. Immunol*. 2013. Vol. 131 (6). P. 1611-1123.
413. Vahteristo P, Bartkova J, Eerola H., et al. A CHEK2 genetic variant contributing to a substantial fraction of familial breast cancer // *Am. J. Hum. Genet*. 2002. Vol. 71. P. 432-438.
414. Vajdic CM, Mao L, van Leeuwen MT., et al. Are antibody deficiency disorders associated with a narrower range of cancers than other forms of immunodeficiency? // *Blood*. 2010. Vol. 116 (8). P. 1228-1234.
415. Valencia CA, Husami A, Holle J. et al. Clinical impact and cost-effectiveness of whole exome sequencing as a diagnostic tool: a pediatric center's experience // *Front. Pediatr*. 2015. Vol. 3. P.67
416. van de Veerdonk FL, Plantinga TS, Hoischen A., et al. STAT1 mutations in autosomal dominant chronic mucocutaneous candidiasis // *N. Engl. J. Med*. 2011. Vol. 365 (1). P. 54-61.
417. van Eeghen AM, Black ME, Pulsifer MB., et al. Genotype and cognitive phenotype of patients with tuberous sclerosis complex // *Eur. J. Hum. Genet*. 2012. Vol. 20 (5). P. 510-515.

418. van Lier MG, Mathus-Vliegen EM, Wagner A, et al. High cumulative risk of intussusception in patients with Peutz-Jeghers syndrome: time to update surveillance guidelines? Time to update surveillance guideline // *Am. J. Gastroenterol.* 2011. Vol. 106. P. 940–945.
419. van Os NJH, Jansen AFM, van Deuren M., et al Ataxia-telangiectasia: Immunodeficiency and survival // *Clin. Immunol.* 2017. Vol. 178. № 2017. P. 45–55.
420. van Slegtenhorst M, Verhoef S, Tempelaars A., et al. Mutational spectrum of the TSC1 gene in a cohort of 225 tuberous sclerosis complex patients: No evidence for genotype-phenotype correlation // *J. Med. Genet.* 1999. Vol. 36 (4). P. 285-289.
421. van Veghel-Plandsoen MM, Wouters CH, Kromosoeto JN., et al. Multiplex ligation-depending probe amplification is not suitable for detection of low-grade mosaicism // *Eur. J. Hum. Genet.* 2011. Vol. 19 (9). P.1009-1112.
422. Varon R, Seemanova E, Chrzanowska K., et al. Clinical ascertainment of Nijmegen breakage syndrome (NBS) and prevalence of the major mutation, 657del5, in three Slav populations // *Eur. J. Hum. Genet.* 2000. Vol. 8 (11). P. 900-902.
423. Vasilev F., Sukhomyasova A., Otomo T. Mucopolysaccharidosis-plus syndrome // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol. 21. № 2. P. 421.
424. Verhagen MM, Last JI, Hogervorst FB., et al. Presence of ATM protein and residual kinase activity correlates with the phenotype in ataxia-telangiectasia: A genotype-phenotype study // *Hum. Mutat.* 2012. Vol. 33. № 3. P. 561–571.
425. Verhoef S, Bakker L, Tempelaars AM., et al. High Rate of Mosaicism in Tuberous Sclerosis Complex // *Am. J. Hum. Genet.* 2002. Vol. 64 (6). P. 1632-1637.
426. Vilar E., Gruber S.B. Microsatellite instability in colorectal cancerthe stable evidence // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2010. Vol. 7 (3). P. 153-162.
427. Vojtková J, Čiljaková M, Jeseňák M., et al. Bloom syndrome without typical sun-sensitive skin lesions in three Slovak siblings // *Int. J. Dermatol.* 2015. Vol. 55. № 6. P. 687–690.
428. Volgina SY, Sokolov AA. An Analysis of Medical Care Services for Children With Rare Diseases in the Russian Federation // *Front Pharmacol.* 2021. Vol. 24. №12. P. 754073.

429. Volikos E, Robinson J, Aittomäki K., et al. LKB1 exonic and whole gene deletions are a common cause of Peutz-Jeghers syndrome // *J. Med. Genet.* 2006. Vol. 43(5) :e18.
430. von Bernuth H, Picard C, Puel A, Casanova JL. Experimental and natural infections in MyD88- and IRAK-4-deficient mice and humans // *Eur. J. Immunol.* 2012. Vol. 42(12). P. 3126-3135.
431. von Boehmer L, Mattle M, Bode P, et al. NY-ESO-1-specific immunological pressure and escape in a patient with metastatic melanoma // *Cancer Immun.* 2013. Vol. 13. P. 12.
432. Wågström P, Bengnér M, Dahle C., et al. Does the frequency of respiratory tract infections help to identify humoral immunodeficiencies in a primary health-care cohort? // *Infect. Dis. (Lond).* 2015. Vol. 47 (1). P. 13-19.
433. Walkovich K., Connelly J.A. Primary immunodeficiency in the neonate: Early diagnosis and management // *Semin. Fetal Neonatal Med.* 2016. Vol. 21 (1). P. 35-43.
434. Watanabe T, Wu TT, Catalano PJ., et al. Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer // *N. Engl. J. Med.* 2001. Vol. 344 (16). P. 1196-1206.
435. Win AK, Macinnis RJ, Dowty JG, Jenkins MA. Criteria and prediction models for mismatch repair gene mutations: a review // *J. Med. Genet.* 2013. Vol. 50 (12). P.785-793.
436. Wolska-Kuśnierz B, Gregorek H, Chrzanowska K., et al. Nijmegen Breakage Syndrome: Clinical and Immunological Features, Long-Term Outcome and Treatment Options – a Retrospective Analysis // *J. Clin. Immunol.* 2015. Vol. 35 (6). P. 538-549.
437. Woodbine L., Gennery A.R., Jeggo P.A. Reprint of «The clinical impact of deficiency in DNA non-homologous end-joining» // *DNA Repair (Amst).* 2014. Vol. 17. P. 9-20.
438. Wu L., Hickson I.O. The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination // *Nature.* 2003. Vol. 426 (6968). P. 870-874.
439. Wykes M.N., Lewin S.R. Immune checkpoint blockade in infectious diseases // *Nat. Rev. Immunol.* 2018. Vol. 18 (2). P. 91-104.
440. Yamagami K, Nakamura T, Nakamura R., et al. Familial Mediterranean fever with P369S/R408Q exon3 variant in pyrin presenting as symptoms of PFAPA // *Mod. Rheumatol.* 2017. Vol. 27 (2). P. 356-359.

441. Yamashita Y, Ono J, Okada S., et al. Analysis of all exons of TSC1 and TSC2 genes for germline mutations in Japanese patients with tuberous sclerosis: Report of 10 mutations // *Am. J. Med. Genet.* 2000. Vol. 90 (2). P. 123-126.
442. Yang G, Shi ZN, Meng Y., et al. Phenotypic and genotypic characterization of Chinese children diagnosed with tuberous sclerosis complex // *Clin. Genet.* 2017. Vol. 91 (5). P. 764-768.
443. Yanus GA, Akhapkina TA, Whitehead AJ., et al. Exome-based search for recurrent disease-causing alleles in Russian population // *Eur. J. Med. Genet.* 2019. Vol. 62. № 7. P. 103656.
444. Yanus GA, Belyaeva AV, Ivantsov AO., et al. Pattern of clinically relevant mutations in consecutive series of Russian colorectal cancer patients // *Med. Oncol.* 2013. Vol. 30. № 3. P. 686.
445. Yeung KS, Ip JJ, Chow CP., et al. Somatic PIK3CA mutations in seven patients with PIK3CA-related overgrowth spectrum // *Am. J. Med. Genet. Part A.* 2017. Vol. 173 (4). P. 978-984.
446. Yohe S, Thyagarajan B. Review of Clinical Next-Generation Sequencing // *Arch. Pathol. Lab Med.* 2017. Vol. 141 (11). P. 1544-1557.
447. Yska HAF, Elsink K, Kuijpers TW., et al. Diagnostic Yield of Next Generation Sequencing in Genetically Undiagnosed Patients with Primary Immunodeficiencies: a Systematic Review // *J. Clin. Immunol.* 2019. Vol. 39 (6). P. 577-591.
448. Yu H, Zhang VW, Stray-Pedersen A., et al. Rapid molecular diagnostics of severe primary immunodeficiency determined by using targeted next-generation sequencing // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2016. Vol. 138. № 4. P. 1142-1151.
449. Yue M, Pacheco G, Cheng T., et al. Evidence Supporting a Lymphatic Endothelium Origin for Angiomyolipoma, a TSC2– Tumor Related to Lymphangiomyomatosis // *Am. J. Pathol.* 2016. Vol. 186 (7). P. 1825-1836.
450. Yurgelun MB, Hampel H. Recent Advances in Lynch Syndrome: Diagnosis, Treatment, and Cancer Prevention // *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book.* 2018. Vol. 38. P. 101-109.
451. Zaki MH, Man SM, Vogel P., et al. Salmonella exploits NLRP12-dependent innate immune signaling to suppress host defenses during infection // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2014. Vol. 111. № 1. P. 385–390.
452. Zavodna K, Bujalkova M, Krivulcik T., et al. Novel and recurrent germline alterations in the MLH1 and MSH2 genes identified in hereditary nonpolyposis

- colorectal cancer patients in Slovakia // *Neoplasma*. 2006. Vol. 53(4). P. 269-276.
453. Zernov N, Skoblov M, Baranova A, Boyarsky K. Mutations in gonadotropin-releasing hormone signaling pathway in two nIHH patients with successful pregnancy outcomes // *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2016. Vol. 14. № 1. P. 48.
454. Zhang F, Liu H, Chen S., et al. Identification of two new loci at IL23R and RAB32 that influence susceptibility to leprosy // *Nat. Genet.* 2011. Vol. 43. № 12. P. 1247–1251.
455. Zhu S, Hsu AP, Vacek MM., et al. Genetic alterations in caspase-10 may be causative or protective in autoimmune lymphoproliferative syndrome // *Hum. Genet.* 2006. Vol. 119. № 3. P. 284–294.
456. Zinchenko RA, Ginter EK, Marakhonov AV. et al. Epidemiology of Rare Hereditary Diseases in the European Part of Russia: Point and Cumulative Prevalence // *Front. Genet.* 2021. Vol. 12. P. 678957.
457. Zinchenko RA, Makaov AK, Marakhonov AV., et al. Epidemiology of hereditary diseases in the Karachay-Cherkess Republic // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol. 21. № 1. P. 325.
458. Аношкин К.И., Карандашева К.О., Алексеева Е.А. и соавт. Результаты использования технологии молекулярно-генетической диагностики туберозного склероза // *Медицинская генетика*. 2020. Т. 19. № 6. С. 8–9.
459. Аношкин К.И., Карандашева К.О., Танас А.С. и соавт. Медицинская технология комплексной ДНК-диагностики туберозного склероза // *Медицинская генетика*. 2018. Т. 17. № 8. С. 32–37.
460. Бессонова, Л.А., Ельчинова Г.И., Зинченко Р.А. Популяционная генетика наследственных болезней среди детского населения республик Башкортостан, Чувашия и Удмуртия // *Генетика*. 2012. Т. 48. № 5. С. 644.
461. Васильева Т.П., Зинченко Р.А., Комаров И.А., Красильникова Е.Ю., Александрова О.Ю., Коновалов О.Е., Куцев С.И. Распространенность и вопросы диагностики редких (орфанных) заболеваний среди детского населения российской федерации // *Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского*. 2020. Т. 99. № 4. С. 229-237.
462. Гинтер Е.К., Г.И. Ельчинова, А.Н. Петрин и соавт. Генетико-эпидемиологическое изучение моногенных наследственных болезней в Республике Татарстан: роль факторов популяционной динамики в

- дифференциации груза наследственной патологии в пяти районах // Генетика. 2012b. Т. 48. № 9. С. 1105.
463. Гинтер Е.К., Галкина В.А., Бессонова Л.А. и соавт. Медико-генетическое изучение населения Республики Татарстан. Сообщение I. Отягощённость моногенной наследственной патологией в трёх районах проживания казанских татар // Медицинская генетика. 2012a. Т. 11. № 2 (116). С. 27-33.
464. Дадали Е.Л., Щагина О.А., Федотов В.П., Билева Д.С., Поляков А.В. Клинико - генетическая характеристика наследственной моторно - сенсорной нейропатии типа IVa // Медицинская генетика. 2009. Т. 8. № 6 (84). С. 13–18.
465. Дорофеева М.Ю., Белоусова Е.Д., Пивоварова А.М. и соавт. Первые результаты функционирования регистра больных туберозным склерозом // Российский Вестник Перинатологии и Педиатрии. 2015. Т. 5. С. 113–120.
466. Зиновьева Н.В., Давыдова Н.В., Щербина А.Ю., Продеус А.П., Румянцев А.Г. Часто болеющие дети: чем они больны на самом деле? // Трудный пациент. 2007. Т. 2. С. 9–11.
467. Зинченко Р.А., Ельчинова Г.И., Барышникова Н.В. Особенности распространения наследственных болезней в различных популяциях России // Генетика. 2007. Т. 43. № 9. С. 1246-1254.
468. Ключников С.А., Михайлова С.В., Дегтярева А.В. и соавт. Клинические рекомендации по диагностике и лечению болезни Ниманна-Пика типа С // Медицинская генетика. 2015. Т. 14. № 7(157). С. 37-51.
469. Кузьменко Н.В., Щербина А.Ю. Классификация первичных иммунодефицитов как отражение современных представлений об их патогенезе и терапевтических подходах // Российский журнал детской гематологии и онкологии. 2017. Т. 4. № 3. С. 51-57.
470. Кулева С. А., Имянитов Е. Н., Юхта Т. В. и др. Демонстрация случаев наследственных раковых синдромов у детей и подростков // Педиатр. 2012. Т. 3. № 4. С. 19-25.
471. Кулева С.А., Имянитов Е.Н. Опухоль Вильмса: синдромальная и молекулярная диагностика // Онкопедиатрия. 2017. Т. 4(4). С. 283–289.
472. Латышева Е.А. Первичные иммунодефициты: состояние проблемы на сегодняшний день. JMF-центры в России // Вопросы современной педиатрии. 2013. Т. 12. № 6. С. 73–77.
473. Максимова Н.Р., Ноговицына А.Н., Куртанов Х.А., Алексеева Е.И. Популяционная частота и возраст мутации G5741 → А в гене NBAS,

- являющейся причиной SOPH-синдрома в республике Саха (Якутия) // Генетика. 2016. Т. 52. № 10. С. 1194-1201.
474. Пузырев, В. П., Максимова Н.Р. Наследственные болезни у якутов // Генетика. 2008. Т. 44. № 10. С. 1317-1324.
475. Рыжкова О.П., Кардымон О.Л., Прохорчук Е.Б., и соавт. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2) // Медицинская генетика. 2019. Т. 18(2). С.3-23.
476. Савельева Т.А., Пикунов Д.Ю., Кузьминов А.М., Цуканов А.С. Синдром Пейтца-Егерса: Что стало известно за 125 лет изучения? (обзор литературы) // Колопроктология. 2021. Т.20. № 2. С. 85–96.
477. Цуканов А. С., Шубин В. П., Кузьминов А. М. и соавт. Генетико-фенотипическое исследование российских пациентов с синдромом Пейтца-Егерса // Колопроктология. 2017. № S3(61). С. 95-95а.
478. Цуканов А.С., Поспехова Н.И., Шубин В.П. и соавт. Клинико-генетические особенности российских пациентов с синдромом Линча // Молекулярная медицина. 2015. № 1. С. 24-28.
479. Цуканов А.С., Шубин В.П., Поспехова Н.И. и соавт. Синдром Линча у российских пациентов // Вопросы онкологии. 2017. Т. 63. № 1. С. 110–114.
480. Шельгин Ю.А., Ачкасов С.И., Семенов Д.А. и соавт. Генетические и фенотипические характеристики 60 российских семей с синдромом Линча // Колопроктология. 2021. Т. 20. № 3(77). С. 35-42.
481. Шельгин Ю.А., Поспехова Н.И., Шубин В.П. и соавт. Пилотное клинико-генетическое исследование российских пациентов с синдромом Пейтца-Егерса // Вопросы онкологии. 2016. Т. 62. № 1. С. 112-116.
482. Щербина А.Ю. Аутовоспалительные заболевания: взгляд иммунолога // Современная Ревматология. 2015. Т. 1. С. 48–54.
483. Янова Т. И., Бодунова Н. А., Хатьков И. Е. и соавт. Генотип-фенотипические характеристики при синдроме Пейтца-Егерса // Колопроктология. 2022. Т. 21. № 2(80). С. 72-80.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Последовательности праймеров для ПЦР

<i>TSCI</i> (транскрипт NM_000368)		
Название праймера	Последовательность	Размер продукта, п.н.
TSC1ex3_1F	GCCATTTAGTGA CTGTTTCATC	161
TSC1ex3_1R	AGTCCAGCATGGCAAGAAG	
TSC1ex3_2opt1F	CCTTCGAGCGAGAGAATGG	188
TSC1ex3_2opt1R	TCTAGTGGCTCTAAAGTCAATC	
TSC1ex4_1F	GGGAATAAGTATCATCCATTGC	202
TSC1ex4_1R	CACAGAAGCTGTTGTACTCAT	
TSC1ex5_1v1F	CATGTGAGGACTGCCCTTGT	156
TSCex5_1R	TGCTTGAGAGAGCTTATGCTT	
TSC1ex5_2Fopt1	CTGGGTCATGTCATAAGACTG	239
TSC1ex5_2Ropt1v1	ACTCTGGACAACATTCTATTTG	
TSC1ex6F	AGTGCCTGACAGACGTTTC	217
TSC1ex6R	GGCCCAACAGGTATATGAG	
TSC1ex7_1F	GGCAGCCACTTGTTTATAGC	205
TSC1ex7_1R	CTTTCATACTGTAATGAGAACG	
TSC1ex7_2F	CATCTCCATGCCAGTGTGTA	192
TSC1ex7_2R	GTATAAATGCAGCCTATCTAAAC	
TSC1ex8_1Fopt1	ATAATGTTCTCAAGGTCCATCT	211
TSC1ex8_1Ropt1	CCTTCGAGGGTCCAGTTCA	
TSC1ex8_2Fopt1	CCCAACTCTTCTAGCCAATGA	231
TSC1ex8_2Ropt1	TAGCTGTATGAGTGCTTCCAA	
TSC1ex9_1F	GGCTGGCACTGAGTTGACA	227
TSC1ex9_1R	GGTGGTGACATCGGCTGAA	
TSC1ex9_2F	TCAGCCCGCTTTCCTCATC	172
TSC1ex9_2var2R	AACTGAACTAAGTCTTACTCCA	
TSC1ex10F	AACCTAAAACCACACACTAACC	192
TSC1ex10R	AGAGCAGGCACACTAGTTGA	
TSC1ex11F	CCTTTGCCACTGCTGATGTA	183
TSC1ex11R	AACTAATCAAATCCAACCTAAGA	
TSC1ex12F	ATGTTCTGCCCTTGTCTCTAA	169
TSC1ex12R	GGATAGCAGACGAGCTGGAT	
TSC1ex13Fvar1	TCGTCTTGATATAAATGATAC	151
TSC1ex13R	CAATTAGAAGAGGCAAGCAAGG	

TSC1ex14F	TTACACTTACAGGGATTACACT	228
TSC1ex14var1R	CCCAGATTTATAGCAGAGCGA	
TSC1ex15_1F	CCAAACTGCCTAGTCTTTCC	242
TSC1ex15_1R	GTGTAAAGGCTCAGGGTTCA	
TSC1ex15_2F	CAGGTTCTCAGCGGAAGAC	220
TSC1ex15_2R	CAAGGACTGGGAGTGAAGATA	
TSC1ex15_3F	AGACAGGGAATGCCAGACTT	226
TSC1ex15_3var2R	GGTAGAGGGCACACCATCTT	
TSC1ex15_4v1F	TCATCAGGAAGACTGAGGAG	197
TSC1ex15_4R	CTGTACTTCACAATAAAATGGAC	
TSC1ex16F	CACAAGGAAGTGATCTAACTTT	199
TSC1ex16R	GCAACAAGCAAGCAGGAAC	
TSC1ex17F	CCACCCTCCCTCTGCTTTA	301
TSC1ex17R	GAAGGACTGGGAACTCTGAC	
TSC1ex18F	AGATGAAATGTTTCGCAGTGTG	295
TSC1ex18R	GCAGTTGGCTTTGCCTGGT	
TSC1ex19var2F	CAAACCTCATGTCCACGTCTCTT	180
TSC1ex19R	GGTGTTTCAGCAGATTCAGG	
TSC1ex20F	GTGTGCTCCTAGCTGATTCC	266
TSC1ex20R	CTGGGTCTGAAACGCTTTCC	
TSC1ex21_1Fopt1	ATACTACCAGCTTACTTTCCATA	281
TSC1ex21_1Ropt1	GAGATTCCAGTTCCAAAATCC	
TSC1ex21_2F	CAGACTCAGAGGCTTGATAC	185
TSC1ex21_2R	CCAGCCAGAATATAGGAAGTT	
TSC1ex22var2F	CTGGCTGGTCTGTATCTTTC	225
TSC1ex22R	CAGCTTAGTCCCAAGGTCAT	
TSC1ex23_1F	GACAGTCCAATCACCAGCTC	263
TSC1ex23_1R	TCCACCGACTGCTGAATG	
TSC1ex23_2F	GGCAGTAGTGGAAGCAGAG	248
TSC1ex23_2R	GTCATGCCGTCCTCATCACA	
TSC1ex23_3F	GCTTCCTGGGTATGAAGGCT	296
TSC1ex23_3R	CACACCTCCTGTTCTGTGC	

TSC2 (транскрипт NM_000548)		
Название праймера	Последовательность	Размер продукта, п.н.
TSC2ex2opt1F	TCCCCATTCCTGTTTCGTTT	274
TSC2ex2opt1R	CCACAGAACCTGGTGCAAGA	
TSC2ex3F	AGTGGGAGTCTTTAGGTGGT	225
TSC2ex3R	CTGAATAGTCTACGTGCCTC	
TSC2ex4F	AGGGTTCTTGGAGAGCACAT	195
TSC2ex4R	ACGTCACCCATCCCAGCG	
TSC2ex5Fopt1	ACTTCAGGGACTTCTTGGCA	253
TSC2ex5Ropt1	GGCCAGAGAAACCTCCAAC	
TSC2ex6v1opt1F	GAGTGGGAGATGTAGATTCG	239
TSC2ex6v1opt1R	GTGGTTTCAACTTTATTCCTG	
TSC2ex7F	CATAGAGTGACTAGACCACA	179
TSC2ex7Ropt1v1	CCAGAAACCAGGGTGAAATG	
TSC2ex8_1Fopt1	AAGGAGGTGGGAAGGAAGC	211
TSC2ex8_1Ropt1	TCCAGCAAGGCTCGCAGA	
TSC2ex8_2Fopt1	GTCGCACCATCAACGTCAA	143
TSC2ex8_2Rv2opt1	CCACCCCAAGAATCAGACAA	
TSC2ex9Fopt1	CAGCTCCTGACACGCATTG	239
TSC2ex9Ropt1	CTAGTGGCAGCCTCTGGAA	
TSC2ex10F	AGCCTCGGCAACCTCACA	254
TSC2ex10R	GCTCTCCCGTTCCTGCCA	
TSC2ex11opt1F	GCAAGCAAGCAGCTCTGAC	170
TSC2ex11opt1R	TCGATGATGTTCAGCAGAATG	
TSC2ex12F	TGTGTCATCGTGCCTGGTA	296
TSC2ex12_2Ropt1	GAGTGCAGAAACCTGGAAAG	
TSC2ex13F	AACCTAAAACCACACACTAACC	212
TSC2ex13R	AGAGCAGGCACACTAGTTGA	
TSC2ex14Fopt2	GGGAGGACCCAGAGTCG	236
TSC2ex14Ropt2	CGCCCACGGAGAAATAGC	
TSC2ex15Fopt1sh	TTGGGCTGGCGCTCATTG	216
TSC2ex15Ropt1sh	CCCGGATACAACGGCTCT	
TSC2ex16F	AGAACCATGAGCCTGTGTG	248
TSC2ex16Ropt1	GGGAACAGACTCCAACACAA	
TSC2ex17F	TTACACTTACAGGGATTACACT	228
TSC2ex17Ropt1	CCCAGATTTATAGCAGAGCGA	

TSC2ex18Fopt1	GCTTGGCTCTGGCTTTCAC	227
TSC2ex18Ropt1v1	CCTCAGACATGCAAACAGCG	
TSC2ex19Fopt1	GGGTTGGGAAGAGCCAAGT	219
TSC2ex19Ropt1	CAACGTGGGACGGATGGT	
TSC2ex20F	AGACAGGGAATGCCAGACTT	226
TSC2ex20R	GGTAGAGGGCACACCATCTT	
TSC2ex20_2Fopt1	GTGCTGAAGCTGGTTCTGG	200
TSC2ex20_2Ropt1v2	AAGGGTCTCACTCGCTCTG	
TSC2ex21Fopt1	GGTTTCATGCCTGGATTTGG	193
TSC2ex21R	CAAGCTCGCCTGTCCTGC	
TSC2ex22F	CCTGAGGTGTCCTGTCTC	248
TSC2ex22R	CTCGGGTGCATGCGCAG	
TSC2ex23Fopt1	AGCCGTGTTGGCCTTCAGA	241
TSC2ex23Ropt1	AAGGCTGCCGGGGCTTTC	
TSC2ex24F	GCCAGGATGGAGTGCCAG	172
TSC2ex24R	CGAGAGACACAGCCTTCAC	
TSC2ex25Fopt1	CTCACTGTCTGGGTGTGCT	266
TSC2ex25Ropt1	CCCATTTCCTCACTACTGACT	
TSC2ex26_1opt1F	CCTCCACTGGCTTGTTCTC	192
TSC2ex26_1opt1R	ATGTTTCAGACACACTGATGCT	
TSC2ex26_2opt1F	AAGGCTTGAATAACTCTCCAC	267
TSC2ex26_2opt1R	GACAGAATGCAACCTTTCCAC	
TSC2ex27Fopt1	CCCTTGGTGATAGGTGGCT	300
TSC2ex27Ropt1	GAGCGTGAAACCCAGCTTG	
TSC2ex28Fopt2	CACGGGCAAGCTGGGTT	288
TSC2ex28Ropt1	CTTAGTCCCCAGGCTGGTA	
TSC2ex29F	GGCAGTAGTGGAAGCAGAG	248
TSC2ex29Ropt1	GTCATGCCGTCCTCATCACA	
TSC2ex30_1FRend [1]	GCTGGTGGTTTTGCATCAGGTAAG	251
TSC2ex30_1RRend [1]	GATCTCCGCCAGCCCTG	
TSC2ex30_2FRend [1]	TTCCTGGGCAGTGCCACTTC	212
TSC2ex30_2RRend [1]	GGGTGACTGGCAGAAAGATGG	
TSC2ex31F	CTCAGGCCAAAGGTGCTG	261
TSC2ex31R	CGTGCCAAGGCCCGCCAT	
TSC2ex32FRend [1]	TGCTCTCTGCTCGACCTG	250
TSC2ex32RRend [1]	AGCACAGCACCTATGAGGC	
TSC2ex33FRend [1]	CCCAGCCCCACATCCAGCAG	206
TSC2ex33RRend [1]	AGCCCCCGAGGTCAGCA	
TSC2ex34_1Fopt1	CAGGGGTTCTCTTTGGGATG	289

TSC2ex34_1Ropt1	GAGGAGCTGGACTTGCTCA	
TSC2ex34_2Fopt1	CTGGTTGGCAGGGGCATC	241
TSC2ex34_2Ropt1	CCGACCAGGCAGCACTTTC	
TSC2ex34_3Fopt1	GCTGAGCCCTGAGGTTAAG	247
TSC2ex34_3Ropt1	TTTCTCTGCATTGGAGGCTG	
TSC2ex34_4Fopt1	GGGACGCCTTAAAGAGCAG	130
TSC2ex34_4Ropt1	GCAAGTGAGGCACCAGGTT	
TSC2ex35F	CTCTGTGTTCCCTCCCTGTG	188
TSC2ex35R	TCCAGCGGATGCAGGAGA	
TSC2ex36Fopt2	CTCTGTGTTCCCTCCCTGTG	273
TSC2ex36Ropt2	TCCAGCGGATGCAGGAGA	
TSC2ex37_1F	TGCCTCAGGGATCAGAGTG	272
TSC2ex37_1R	GTGAACTGGCCGTCCTCA	
TSC2ex37_2F	GGTACACGGAGTTCCTGAC	215
TSC2ex37_2R	TGGGGTAGCAGGACTGGAT	
TSC2ex38Fopt1	CTGGCCCCACAAACCCATC	272
TSC2ex38Ropt1	GACCGAAGCTCAGGGAGG	
TSC2ex39Fopt1	CTGTGTGCGGGGATGACC	270
TSC2ex39Ropt1	GGTCAGACACGATCTTGGC	
TSC2ex39_40_1F	GGGGATGACCCTTTCTCTT	244
TSC2ex39_40_1R	CCACGCTGGTGTCCACAA	
TSC2ex39_40_2F	GCCAGTTCAACTTTGTCCAC	288
TSC2ex39_40_2R	ACCCCCACTCACATTTGCGT	
TSC2ex40_41F	AAGATCGTGTCTGACCGCAA	270
TSC2ex40_41R	CTGAGGGAGCCCCATATTC	
TSC2ex42F	CTCCAGACTTACTGCCCAA	250
TSC2ex42R	TGACAGGCAATACCGTCCAA	

[1] Последовательности праймеров взяты из работы [Rendtorff et al., 2005]

<i>MLH1</i> (транскрипт NM_000249.3)		
Название праймера	Последовательность	Размер продукта, п.н.
MLH1ex1F	CTTCCGTTGAGCATCTAGAC	184
MLH1ex1R	CCCGGCTCGACTCCCTC	
MLH1ex2F	CATTAGAGTAGTTGCAGACTG	184
MLH1ex2R	CCATGAAGCGCACAAACATC	

MLH1ex3F ^b	CAAGAAAATGGGAATTCAAAGAG AT	241
MLH1ex3R ^b	CTAACAAATGACAGACAATGTCA TCAC	
MLH1ex4F	GGTGAGGTGACAGTGGGTG	167
MLH1ex4R	TATGAGTAAAAGAAGTCAGCAC	
MLH1ex5F	GATTAGTATCTATCTCTCTACTG	163
MLH1ex5R	AAGCTTCAACAATTTACTCTCC	
MLH1ex6F	GCTTTTGCCAGGACATCTTG	206
MLH1ex6R	CAAATCTCAGAGACCCACTC	
MLH1ex7F	AGTGTGTGTTTTTGGCAACTCT	180
MLH1ex7R	TAACCTTATCTCCACCAGCA	
MLH1ex8-1F	CAGCCATGAGACAATAAATCC	142
MLH1ex8-1R	CATACCGACTAACAGCATTTC	
MLH1ex8-2F	CAATGCCTCAACCGTGGAC	150
MLH1ex8-2R	ACACATAATATCTTGAAAGGTTT	
MLHex9F	CTGATTCTTTTGTAATGTTTGAG	204
MLH1ex9R	TTCCCATGTGGTTCTTTTTAAC	
MLH1ex10F	TGTGTGAATGTACACCTGTGAC	204
MLH1ex10R	CTTGTGAGTCTTGGTTGAGG	
MLH1ex11F	CACTATCTAAGGTAATTGTTCTC	235
MLH1ex11R	CAAAGGCCCCAGAGAAGTAG	
MLH1ex12-1F	CCTCATACTAGCTTCTTTCTTA	232
MLH1ex12-1R	GGCATAGACCTTATCACTACT	
MLH1ex12-2F	GACTTGCTGGCCCCTCTG	138
MLH1ex12-2R	GAAATGCATCAAGCTTCTGTTC	
MLH1ex12-3F	CCAGATGGTTCGTACAGATTC	159
MLH1ex12-3R	AGTTCAAGCATCTCCTCATCT	
MLH1ex12-4F	CTAGGCAGCAAGATGAGGAG	139
MLH1ex12-4R	CTGGGGTTGCTGGAAGTAG	
MLH1ex12-5F	TGGAGGGGGATACAACAAAG	176
MLH1ex12-5R	AGTCAGGCAGAGAGAAGATG	
MLH1ex13F	GATCTGCACTTCCTTTTCTTC	199
MLH1ex13R	GCAGGCCACAGCGTTTAC	
MLH1ex14F	GTAGGATTCTATTACTTACCTG	194
MLH1ex14R	GTAGCTCTGCTTGTTACACAC	
MLH1ex15F	CCCAACTGGTTGTATCTCAAG	210
MLH1ex15R	CAAATAAGATATTAGTGGAGAGC	
MLH1ex16F	TGGGAATTCAGGCTTCATTTG [2]	292

MLH1ex16R	GCACCCGGCTGGAAATT	
MLH1ex17F	CATTATTTCTTGTTCCCTTGTC	165
MLH1ex17R	ACCGAAATGCTTAGTATCTGC	
MLH1ex18F	GAGGTATTGAATTTCTTTGGAC	155
MLH1ex18R	TGCATCACCCTGTACCTG	
MLH1ex18_1F	GAGGTATTGAATTTCTTTGGAC	115
MLH1ex18_1R	CTCAGATATGTAAGTCTTCCG	
MLH1ex18_2F	GAAAGCCTCAGTAAAGAATGC	139
MLH1ex18_2R	GATTGTATGAGGTCCTGTCC	
MLH1ex19F	CAAACAGGGAGGCTTATGAC	230
MLH1ex19R	CCCACAGTGCATAAATAACCA	

<i>MSH2</i> (транскрипт NM_000251.2)		
Название праймера	Последовательность	Размер продукта, п.н.
MSH2ex1-1F	GCGCATTTTCTTCAACCAGGA	152
MSH2ex1-1R	GTCGAAAAGGCGCACTGTG	
MSH2ex1-2F	GCTTCGTGCGCTTCTTTCAG	188
MSH2ex1-2R	TCCCCAGCACGCGCCGT	
MSH2ex2-1F	GTAATATCTCAAATCTGTAATG	150
MSH2ex2-1R	GCTCTATTCTTATAAACTTCAAC	
MSH2ex2-2F	GATCTTCTTCTGGTTCGTCA	125
MSH2ex2-2R	GGGGGTAAATTA AAAAGGAAGA	
MSH2ex3-1F	GGGGGAGTATGTTCAAGAGT	145
MSH2ex3-1R	GACATTTTAACACCCACAACAC	
MSH2ex3-2F	AACAATGATATGTCAGCTTCCA	130
MSH2ex3-2R	TATCAGGGAATTCACACAGTC	
MSH2ex3-3F	GTTGGAGTTGGGTATGTGGA	177
MSH2ex3-3R	CAATTTGCTTACCTGTCTCAG	
MSH2ex4F	TCTTATTCCTTTTCTCATAGTAG	221
MSH2ex4R	TGTAATTCACATTTATAATCCATG	
MSH2ex5-1F	ATCCAGTGGTATAGAAATCTTC	174
MSH2ex5-1R	GACTGCTGCAATATCCAATTC	
MSH2ex5-2F	CATCACTGTCTGCGGTAATC	230
MSH2ex5-2R	TATAAGCTTCTTCAGTATATGTC	
MSH2ex6F	TTTGTTTACTAGGGTCTGTG	181

MSH2ex6R	CATAAACTAACGAAAGTATAAAC	
MSH2ex7-1F	GGGGCAAGTTAATTTATTTCAG	166
MSH2ex7-1R	AGTCGGTAACAATCTTGTAAGT	
MSH2ex7-2F	CCCAGATCTTAACCGACTTG	177
MSH2ex7-2R	AGTATATATTGTATGAGTTGAAG	
MSH2ex8F	GGGGGAGATCTTTTTATTGT	163
MSH2ex8R	TATTGCATACCTGATCCATATC	
MSH2ex9F	TTGTCACCTTGTTCTGTTTGC	176
MSH2ex9R	TATTCCAACCTCCAATGACC	
MSH2ex10-1F	AATGGTAGTAGGTATTTATGGAA	127
MSH2ex10-1R	CCTTACAGGTTACACGAAAGT	
MSH2ex10-2F	GCACAGTTTGGATATTACTTTC	174
MSH2ex10-2R	ATCATGTTAGAGCATTTAGGGA	
MSH2ex11F	GTACACATTGCTTCTAGTACA	200
MSH2ex11R	CAGGTGACATTCAGAACATTA	
MSH2ex12-1F	GTATTCCTGTGTACATTTTCTG	174
MSH2ex12-1R	TTCTTCCTTGTCCTTTCTCCA	
MSH2ex12-2F	ACGTGTCAAATGGAGCACCT	207
MSH2ex12-2R	CCCACAAAGCCCAAAAACCA	
MSH2ex13-1F	CATCAGTGTACAGTTTAGGAC	204
MSH2ex13-1R	CAGTCCACAATGGACACTTC	
MSH2ex13-2F	GTGCCATGTGAGTCAGCAG	183
MSH2ex13-2R	CTCACAGGACAGAGACATAC	
MSH2ex14-1F	TATGTGATGGGAAATTTTCATGTA	143
MSH2ex14-1R	TGTTGCAATGTATTCTGATATAG	
MSH2ex14-2F	TTTGGGTTAGCATGGGCTATA	136
MSH2ex14-2R	GTGCTGTGACATGTAGATTATTA	
MSH2ex14-3F	TGCCTTGGCCAATCAGATAC	132
MSH2ex14-3R	CCAAGTTCTGAATTTAGAGTAC	
MSH2ex15-1F	GCTGTCTCTTCTCATGCTGT	224
MSH2ex15-1R	TCTCTTTCCAGATAGCACTTC	
MSH2ex15-2F	CCCTAAGCATGTAATAGAGTG	200
MSH2ex15-2R	AACCTTCATCTTAGTGTCCTG	
MSH2ex16-1F	GGGACATTCACATGTGTTTCA	213
MSH2ex16-1R	CATTCCATTACTGGGATTTTTC	
MSH2ex16-2F	CCTTTACTGAAATGTCAGAAGAA	224
MSH2ex16-2R	ACTGACAGTTAACACTATGGAA	

MSH6 (транскрипт NM_000179.2)		
Название праймера	Последовательность	Размер продукта, п.н.
MSH6ex1_1F	ACAGAACGGTTGGGCCTTG	257
MSH6ex1_1R	GCCCTCCGTTGAGGTTCTT	
MSH6ex1_2F	GCGCTGAGTGATGCCAACAA	252
MSH6ex1_2R	TATGCCCCCGCCTTCGAC	
MSH6ex2_1F	CTGCCTTTAAGGAACTTGAC	173
MSH6ex2_1R	TCCCTTTCTCGCGGATGAAT	
MSH6ex2_2F	GGCCAAGATGGAGGGTTAC	196
MSH6ex2_2R	CACACACACATGGCAGTAGT	
MSH6ex3_1F	TCTGCACCCGGCCCTTAT	187
MSH6ex3_1R	CTGAGGGCTCATCACAACT	
MSH6ex3_2F	GCAATGCAACGTGCAGATGAA	130
MSH6ex3_2R	CAACTGAATGCTTGCCGTGT	
MSH6ex4_1F	AAACAGTGGCTGCACGGGTA	201
MSH6ex4_1R	GATCCTTGTGTCTTAGGCTGTA	
MSH6ex4_2F	TGAAATTGAGAGTGAAGAGGAA	218
MSH6ex4_2R	CTTTGACAGGGCTGTTCAGG	
MSH6ex4_3F	GTGATGAAATAAGCAGTGGAGT	204
MSH6ex4_3R	GGGCAGAGAAAGCTCTCAA	
MSH6ex4_4F	GCCCTCAGCCACCAAACAA	197 / 245
MSH6ex4_4R	TCCTCCTGTGCTCATCTCTT	
MSH6ex4_4Ralter	CCTCAGGCACATAGAGTGTA	
MSH6ex4_5F	AACTTTAGAATGGCTTAAGGAG	
MSH6ex4_5R	ACCTTGTAACAGATGACAAGAT	183
MSH6ex4-6F	GGAAGTGGTGGCAGATTAAGT	
MSH6ex4_6R	CACCAGGGAATCTGAATAACG	196
MSH6ex4_7F	GCTTTCCTGAAATTGCATTTGG	
MSH6ex4-7R	CTGTAAGTCTGTGTACCCTTG	
MSH6ex4_8F	GGTGAGGAGGGAGATCTGTA	
MSH6ex4_8R	GAGTCCTAAATCTCGAACAATG	230
MSH6ex4_9F	CATAGGTCAGTTTTTCAGATGAT	
MSH6ex4_9R	ATATTCTTCCTCAAGGAGAGTT	220
MSH6ex4_10F	GGCTCCCAGTTTTGGGATG	
MSH6ex4_10R	GTAGAAGACACAACCACCTAGA	201
MSH6ex4-11F	CAGGAGAGAAAAGTGAATTGG	
		210

MSH6ex4_11R	AGTTGTTTAATGTCACTGCATC	
MSH6ex4-12F	ATTCCCTTGGATTCTGACACA	222
MSH6ex4-12R	ACAGAGTGGGGCACAAAGC	
MSH6ex4_13F	GTAAGCGGCTCCTAAAGCAAT	211
MSH6ex4_13R	CTGTCTGGGTGGTTCTGACT	
MS6ex4_14F	CCAGATCTTGAGAGGCTACT	193
MSH6ex4_14R	CAGCAACTTCTTCCATGATCC	
MSH6ex4_15F	TCTGGAAGGATTCAAAGTAATG	203
MSH6ex4_15R	GAGTAATAAGTCCAGTCTTTCG	
MSH6ex4_16F	GATGGGATACAGCCTTTGAC	203
MSH6ex4_16R	CTGGTAACGGTTCCTACCAAT	
MSH6ex4_17F	CGCAACAGAATTGGCTGTAG	209
MSH6ex4_17R	GATACATCCCTCCGTTCTTCA	
MSH6ex4_18F	GGGCTGTAAACGATACTGGA	217
MSH6ex4-18R	CAGCACTACTTATCAAAGCCT	
MSH6ex5_1F	GAAGCCTCACTTTTACCCTCT	220
MSH6ex5_1R	CCTCTTCCTCACAGCCTATTA	
MSH6ex5_2F	CGCCATCCTTGCATTACGAA	152
MSH6ex5_2R	CTCATAAGCGTAGACTTGCC	
MSH6ex5_3F	GCTTGTTACTGGACCAAATATG	185
MSH6ex5_3R	GGAGTAATTTCCCTTTGCTTC	
MSH6ex6_1F	CTGTTACTACCAGTCATAAAAG	155
MSH6ex6_1R	ATTCTGTCTGAGGCACCAAG	
MSH6ex6_2F	CTGGCTTATTAGCTGTAATGG	151
MSH6ex6_2R	GAATGAGAACTTAAGTGGGAAA	
MSH6ex7_1F	CCAATATGTGTAGCTCATGATAG	184
MSH6ex7_1R	CATCCACAAGCACCAGAGAAT	
MSH6ex7_2F	TGAAACTGCCAGCATACTCAT	213
MSH6ex7_2R	CCAACTATCGGTCTGTGCCA	
MSH6ex8_1F	TGGATGTACTAACCGATGTTG	224
MSH6ex8_1R	CTTCTACTAATGAATGGTAGTGA	
MSH6ex8_2shortF	GACGGCAATAGCAAATGCAG	203
MSH6ex8_2shortR	GCGATACATGTGCTAGCAAGA	
MSH2ex9_1shortF	TCTCTTGCTAGCACATGTATC	117
MSH6ex8_2/9uniR	CCCTTAATGAATTTATAGAGGAAC	
MSH6ex9_2F	GGTAGAAAATGAATGTGAAGAC	138
MSH6ex9_2R	CCCTTTTGAATAACTTCCTCTG	
MSH6ex9_3F	GCTATGGCTTTAATGCAGCAA	111
MSH6ex9_3R	GAAATAATCGTAGTGACTGATTC	

MSH6ex9_4/ex10F	AAGGGACATAGAAAAGCAAGAG	244
MSH6ex9_4/ex10R-m13	AGCGGATAACAATTCACACAGGG CTTCAGCATCTACAGTTGAC	
MSH6ex9_4F	CAAGGCTTGCTAATCTCCCA	179
MSH6ex9_4R	CATAGTGCATCATCCCTTCC	
MSH6ex10_1F	GGGAAGGGATGATGCACTAT	138 / 205
MSH6ex10_2F	GTTTGCCTGGCTAGTGAAAG	
MSH6ex10_2R	ATGTTGTCTGAATTTACCACCT	
BLM (транскрипт NM_000057)		
Название праймера	Последовательность	Размер продукта, п.н.
BLM-ex2-F	TGTGATTAATGCAAAGTACCTA	189
BLM-ex2-R	CTATGTGACAGCAAACCAGT	
BLM-ex3_1-F	GATTCTTTGCTCAGTTGGGA	187
BLM-ex3_1-R	TGACACATTAGTTACAGATACA	
BLM-ex3_2-F	TGTATCTGTAACATAATGTGTCA	200
BLM-ex3_2-R	GCAAGAAATCTGGCAATAATG	
BLM-ex3_3-F	TCATTATTGCCAGATTTCTTGC	175
BLM-ex3_3-R	CAGAAGTATCAAAGTCATCCA	
BLM-ex3_4-F	TGGATGACTTTGATACTTCTG	212
BLM-ex3_4-R	AGTCATCCTTCTGTTCCTCA	
BLM-ex3_5-F	TGAGGAACAGAAGGATGACT	142
BLM-ex3_5-R	GTTACCTCTTTCATCTTCCAA	
BLM-ex4-F	CTGTAGATAATAGCGAAAAGAA	173
BLM-ex4-R	AGTTTACCTAAGGCATTTTGAA	
BLM-ex5-F	TGCAGTACGTTAAAGGACC	228
BLM-ex5-R	CATACAGCCACAGGTTCAA	
BLM-ex6-F	TAGACAGATAAGTTTACAGCA	133
BLM-ex6-R	CCTTATGTTCCGCTGCTGA	
BLM-ex7_1-F	ACGTTGTTCTCTTTTCTCTCT	223
BLM-ex7_1-R	GTGGTAGTCAGTAAACAGTC	
BLM-ex7_2-F	GA CTGTTACTGACTACCAC	190
BLM-ex7_2-R	CAGCAGTGCTTGTGAGAACA	
BLM-ex7_3-F	TGTTCTCACAAGCACTGCTG	222

BLM-ex7_3-R	GATACTGATTTAATTGGCCGA	
BLM-ex7_4-F	TCGGCCAATTAATCAGTATC	200
BLM-ex7_4-R	TGATGATTTGCTATGGTTTTTC	
BLM-ex8-F	TCCTAGACAAGTCAGCACAA	229
BLM-ex8-R	TTCCTGCCAATTCACCTTCTAA	
BLM-ex9-F	AACTTTTACATTCATGCTCTG	186
BLM-ex9-R	TTACATCCAAGGAAGTCAGC	
BLM-ex10-F	ATACTTAGATTCCAGCTACATA	125
BLM-ex10-R	AACCTTTTCTGGAGTGACATA	
BLM-ex11-F	CCTAGATCTGTGCAAGTAAC	150
BLM-ex11-R	TAGTATGTATTTATCGGTATTTTC	
BLM-ex12-F	CTCCAAGTAGTCTGAAAAGCA	208
BLM-ex12-R	GTGACGTGCAACAACCTTACA	
BLM-ex13-F	GGACTTTTTTAGGTTTAGCAT	147
BLM-ex13-R	AGACAGCTAATCACATGGC	
BLM-ex14-F	GTA CTCTTGGTTTCTTGGCA	187
BLM-ex14-R	GTTACCTGACAGCCATCCT	
BLM-ex15_1-F	GTCTGTGCCTTATGAATCTA	188
BLM-ex15_1-R	GCAGTGAGATATTTCCCCA	
BLM-ex15_2-F	GCATCTCTCCCTAAATCTGT	204
BLM-ex15_2-R	CCACAATAGCAGGAGTAGA	
BLM-ex16_1-F	GTCTTACTATAGTCTTCATCTCT	148
BLM-ex16_1-R	CACCAAAGTAGGCCAAAAGCT	
BLM-ex16_2-F	GAATGCAGGAGAATACAGCTT	203
BLM-ex16_2-R	CGGAGACCACCTTTTGCAAT	
BLM-ex17-F	GGGTTATGATGAATCTACTAT	245
BLM-ex17-R	ACCCAAGAAAATGTCGACCA	
BLM-ex18_1-F	CTTCTATTTGAGGGTGATGAT	217
BLM-ex18_1-R	CATAAGCGATCGCCTGGTCA	
BLM-ex18_2-F	GATTTTGGATGAAGACTTATATAT	198
BLM-ex18_2-R	CAGTATCTATAAGCTTGGACAA	
BLM-ex19-F	CTCCTATGATTTGTTTCTCTCT	255
BLM-ex19-R	GTGCCACGTAACAAAGGATA	
BLM-ex20-F	GTGGGTTTTCTATGGGTGAT	193
BLM-ex20-R	CATGGCTGTGTAACCT	
BLM-ex21_1-F	CGTGGACCAGTGCGACAT	207

BLM-ex21_1-R	CTTTGGGAGGCTGGCATCT	
BLM-ex21_2-F	GAAGAAGTGCCGCTGAGGA	202
BLM-ex21_2-R	CAGAGCTGTTGCACTTTTGT	
BLM-ex22-F	GGGGGTCTGCCACATGTA	202
BLM-ex22-R	CTATGTACATTGAGATTCGGTT	
<i>ATM</i> (транскрипт NM_000051)		
Название праймера	Последовательность	Размер продукта, п.н.
ATM_c.2413C>T ex16F	TTGTTGCTTGGTTCTTTGTTTG	217
ATM_c.2413C>T ex16R	TGTGAGATGCATCCTTATTTAC	
ATM_c.3554T>A ex24F	GTAAACATTTACATTTTACATTAC	238
ATM_c.3554T>A ex24R	TCATCCATATATACCTTTTTTCAC	
ATM_c.450_453 delTTCT-F	TGGTGCTATTTACGGAGCTG	100
ATM_c.450_453 delTTCT-R	ACCTAACCACTGTTGCTGAG	
ATM_c.1564_1565 delGA-F	ACGATGCCTTACGGAAGTTG	255
ATM_c.1564_1565 delGA-R	GCATGCTGAACTTACCATGAAG	

<i>STK11</i> (транскрипт ENST00000326873)		
Название праймера	Последовательность	Размер продукта, п.н.
STK11ex1-1F	CAGCATGGAGGTGGTGGAC	169
STK11ex1-1R	CAGCAGGTCCCCCATCAG	
STK11ex1-2F	CCAAGCTCATCGGCAAGTAC	186
STK11ex1-2R	CGACCCCAGCAAGCCATAC	
STK11ex2F	TGATACACCCTGTCCTCTC	141
STK11ex2R	CCCCGCGGTCCCAACAC	
STK11ex3-F	CCTGAGCTGTGTGTCCTTAG	131
STK11ex3-R	CCCGCGCACGCACCCGT	
STK11ex4-F	AGGACGGGTGTGTGCTGC	219
STK11ex4-R	GTGCAGCCCTCAGGGAGT	
STK11ex5-F	ACTCCCTGAGGGCTGCAC	209
STK11ex5-R	AGTGTGCGTGTGGTGAGTG	
STK11ex6-F	GACTGACCACGCCTTTCTTC	169
STK11ex6-R	GGCAGAGGGATGAGGCTC	
STK11ex7-F	TCGCCGGCTTCTCCTCAG	111
STK11ex7-R	CAGCCTCGGCCCCACTG	
STK11ex8-F	CACTGCTTCTGGGCGTTTG	229
STK11ex8-R	GTCAGCAGAGCCGGGCAG	
STK11ex9-F	TTGCCGTCTCCCTCCCAG	221
STK11ex9-R	CCGCGCCCCACCTGCAG	

ПРИЛОЖЕНИЕ В.

Праймеры, использованные для анализа повторяющихся мутаций

Название мутации	Название праймера	Последовательность 5 - 3	Размер фрагмента, п.н.
ATM с.5932G>T р.(E1978*)	ATM_1978F	TCTGTTTTGTTTGCCACCTTC	290
	ATM_1978R	TCACATGGCATCTGTACAGTG	
TNFRSF13B с.310T>C (р.C104R)	TNFRSF13B_10401F	AGCAAGGCAAGTTCTATGAC	227
	TNFRSF13B_10401R	ACCTGGACTTGCTTCTGAG	
CASP10 с.1216A>T (р.I406L)	CASP10F	GAGATCATGTCTCACTTCACA	178
	CASP10R	CAGCCTCGGCAGGAATACT	
TRAF3 с.352C>T (р.R118W)	TRAF3_a118t_F	TCAGGTGTTTAAGGATAATTGC	216
	TRAF3_a118t_R	GTCAACATGGTCTTAAAGTGC	
NLRP12 с.1054C>T (р.R352C)	NLRP12_y375x_F	CTATCTTTGCTCATCACCACA	173
	NLRP12_y375x_R	TCCCTCACGTAATTGAAGAC	
NLRP12 с.910C>T (р.H304Y)	NLRP12_y246c_F	GGGAATGTGTCAACCTCAG	340
	NLRP12_y246c_R	TCCGTGGCACTCTGGTTCA	