

ВРОЖДЕННЫЕ ДЕФЕКТЫ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ КАК ПРОЯВЛЕНИЕ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ КИШЕЧНИКА - МОНОГЕННОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ У ДЕТЕЙ



¹Л. И. Кастюкевич, ¹О. Н. Романова, ²Е. П. Михаленко, ¹Н. Д. Коломиец, ⁴К. Ю. Мараховский, ⁵А. А. Гусина, ¹О. Н. Назаренко, ¹Р. Н. Манкевич, ⁷Е. М. Марочкина, ⁷Т. А. Спиридович, ¹В. И. Бобровничай, ⁶Т. И. Волошко, ²А. В. Кильчевский

¹ Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

² Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

³ Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения УО «БГМУ», Минск, Беларусь

⁴ Республиканский научно-практический центр детской хирургии, Минск, Беларусь

⁵ Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя», Минск, Беларусь

⁶ Городская детская инфекционная клиническая больница, Минск, Беларусь

⁷ 2-й Городской родильный дом, Минск, Беларусь

Введение. В настоящее время все большую актуальность приобретают моногенные воспалительные заболевания кишечника (ВЗК-подобные), такие как врожденный дефект иммунной системы, генетические дефекты эпителиального барьера и другие.

Цель исследования – комплексный анализ генетических дефектов, лежащих в основе ВЗК, свидетельствующих о врожденных дефектах иммунной системы.

Материал и методы. В исследование включены 46 пациентов с манифестацией ВЗК в возрасте до 18 лет включительно, которым было проведено полноэкзомное секвенирование методом NGS. Все расчеты проводились в статистическом пакете R, версия 4.1.

Результаты. Выявлены 11 (23,9%) пациентов, имеющих в генах мутации, свидетельствующие о врожденных дефектах иммунной системы (ВДИС). Из них у 3 (27,3%) детей обнаружены нарушения в генах иммунной дисрегуляции – CTLA-4 (с.151C>T (p.Arg 51*)), FOXP3 (с.851C>T (p.Ala284Val)) и FOXP3 (с.748_750del (p.Lys250del)); 3 (27,3%) пациента имели нарушения в гене SLC5A1 (с.1666-2delA); SLC5A1 (с.1666-2delA и 1680T>G), отвечающего за нарушение барьерной функции эпителия; 2 (18,2%) пациента имели нарушения в гене PIK3CD (с.3061G>A (p.Glu1021Lys)), которые проявлялись ВДИС с преимущественным дефицитом антител; у 2 (18,2%) пациентов были обнаружены нарушения в генах, влияющих на клеточный и гуморальный иммунитет: JAK3 (с.2518C>T (p.Arg840Cys)), CD40LG (с.430G>A (p.Gly144Arg)) и в одном случае был (9,1%) установлен врожденный дефект количества или функции фагоцитов CFTR (с.43delC (p.Leu15fs) и с.1210-11T>G). По клиническим признакам пациенты с ВДИС имели только некоторые отличия от пациентов с ВЗК.

Заключение. Пациентам с диагнозом ВЗК и с очень ранним началом поражения ЖКТ целесообразно проводить молекулярно-генетический анализ целевых генов, позволяющий своевременно диагностировать врожденные дефекты иммунной системы для последующего назначения адекватной терапии.

Ключевые слова: ВЗК-подобные моногенные заболевания, врожденные дефекты иммунной системы, дети.

CONGENITAL DEFECTS OF THE IMMUNE SYSTEM AS A MANIFESTATION OF MONOGENIC INFLAMMATORY BOWEL DISEASE IN CHILDREN

¹L. I. Kastsyukevich, ¹O. N. Romanova, ²A. P. Mikhalenko, ³N. D. Kolomiets, ⁴K. Y. Marakhovsky, ⁵A. A. Gusina, ¹O. N. Nazarenko, ¹R. N. Mankevich, ⁷Ye. M. Marochkina, ⁷T. A. Spiridovich, ¹V. I. Babraunichy, ⁶T. I. Valoshka, ²A. V. Kilchevsky

¹ Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

² The Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

³ Institute of Advanced Training and Retraining of Health Personnel of Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

⁴ The Children's Surgery National Applied Research Hospital, Minsk, Belarus

⁵ Republican Scientific and Practical Center "Mother and child", Minsk, Belarus

⁶ City Children's Infectious Diseases Clinical Hospital, Minsk, Belarus

⁷ City clinical maternity hospital № 2, Minsk, Belarus

Background. Currently, monogenic inflammatory bowel disease-like (IBD) pathologies such as congenital immunity defects, genetic epithelial barrier defects and others are becoming increasingly relevant.

Objective. To analyze genetic defects associated with IBD-like immunopathology.

Material and methods. The study included 46 patients with IBD manifestations aged 18 years or younger, who underwent whole-exome sequencing using the NGS method. All calculations were performed using the R statistical package, version 4.1.

Results. There were identified 11 (23,9%) patients with gene mutations indicating congenital defects of the immune system (CDIS). Of these, 3 (27,3%) children were found to have abnormalities in the genes of immune dysregulation - CTLA-4 (c.151C>T (p.Arg 51*)), (FOXP3 (c.851C>T (p.Ala284Val)) and FOXP3 (c.748_750del (p.Lys250del)); 3 (27.3%) patients had abnormalities in the SLC5A1 gene (c.1666-2delA), SLC5A1 gene (c.1666-2delA and c.1680T>G(p.(Cys560Trp)) responsible for the disruption of the barrier function of the epithelium; 2 (18.2%) patients had abnormalities in the PIK3CD gene (c.3061G>A (p.Glu1021Lys)), manifested as CDIS with a predominant deficiency of antibodies; in 2 (18.2%) patients abnormalities in genes affecting cellular and humoral immunity were detected: JAK3 (c.2518C>T(p.Arg840Cys)), CD40LG (c.430G>A (p.Gly144Arg)); and in one case (9,1%) a congenital defect in the number or function of phagocytes – in CFTR gene (c.43delC (p.Leu15fs) and c.1210-11T>G) was established. According to clinical signs, patients with CDIS had only some differences from IBD patients.

Conclusion. It is advisable to conduct molecular genetic analysis of target genes in IBD patients with very early onset of gastrointestinal lesions, which allows timely diagnosis of congenital defects of the immune system for subsequent prescription of adequate therapy.

Keywords: monogenic inflammatory bowel disease-like pathology, congenital defects of the immune system, children.

Автор, ответственный за переписку:

Кастюкевич Лилия Ивановна, Белорусский государственный медицинский университет, e-mail: kastsyukevich.liliya@gmail.com, ORCID: 0000-0002-7666-1017

Corresponding author:

Kastyukevich Liliya I., Belarusian State Medical University, e-mail: kastsyukevich.liliya@gmail.com, ORCID: 0000-0002-7666-1017

Для цитирования: Врожденные дефекты иммунной системы как проявление воспалительного заболевания кишечника – моногенного заболевания у детей / Л. И. Кастюкевич, О. Н. Романова, Е. П. Михаленко, Н. Д. Коломиец, К. Ю. Мараховский, А. А. Гусина, О. Н. Назаренко, Р. Н. Манкевич, Е. М. Марочкина, Т. А. Спиридович, В. И. Бобровнический, Т. И. Волошко, А. В. Кильчевский // Гепатология и гастроэнтерология. 2024. Т. 8, № 2. С. 96-104. <https://doi.org/10.25298/2616-5546-2024-8-2-96-104>.

For citation: Kastsyukevich LI, Romanova ON, Mikhalenko AP, Kolomiets ND, Marakhovsky KY, Gusina AA, Nazarenko ON, Mankevich RN, MarochkinaYeM, Spiridovich TA, Babraunichy VI, Valoshka TI, Kilchevsky AV. Congenital defects of the immune system as a manifestation of inflammatory bowel disease – amonogenicdiseasein children. HepatologyandGastroenterology. 2024;8(2):96-104. <https://doi.org/10.25298/2616-5546-2024-8-2-96-104>.

Введение

Моногенные воспалительные заболевания кишечника (ВЗК-подобные), такие как врожденный дефект иммунной системы, генетические дефекты эпителиального барьера и другие, уже не являются новинкой. Несмотря на то, что каждый из них имеет разный генетический и экологический профиль, вероятно, обусловленный как бактериальной флорой в кишечнике, так и генетическими нарушениями, все они характеризуются примерно одинаковыми клиническими симптомами, оказывающими существенное влияние на качество жизни пациентов. Например, нарушение гомеостаза кишечника приводит к длительной диарее с примесью крови, вздутию живота, болям и спазмам в животе, мальабсорбции, усталости и депрессии [1].

В последнее время увеличивается количество публикаций, подтверждающих, что многие из этих редких заболеваний имеют клиническую картину ВЗК, что крайне затрудняет диагностику основного заболевания, а, следовательно, приводит к несвоевременному назначению патогенетического лечения, отличного от стандартной терапии. В большинстве случаев ВЗК проявляется на втором или третьем десятилетии жизни, но

у части пациентов заболевание может клинически проявляться уже в младенчестве, иметь тяжелое течение и быть резистентным к терапии. Примерно у 15-20% пациентов с манифестацией ВЗК до 6 лет они имеют моногенный дефект и описываются как сложные многофакторные заболевания, при которых важную роль играет сочетание дизрегуляции иммунного ответа, микробиома, генетических особенностей пациента и факторов окружающей среды [2, 3].

Недостаточная изученность этиологической структуры и факторов риска развития ВЗК – основная причина, из-за которой неспецифические колиты занимают особую позицию в структуре заболеваемости детского возраста.

Врожденные дефекты иммунной системы (ВДИС) – неоднородная группа преимущественно моногенных заболеваний, связанных с дефектом специфического компонента иммунной системы, вследствие которого развиваются характерные рецидивирующие инфекционные, аллергические, аутоиммунные, онкологические заболевания. ВДИС могут сопровождаться признаками ВЗК в составе симптомокомплекса или быть единственным признаком заболевания, как например, хроническая гранулематозная болезнь

(ХГБ), гипер-IgD-синдром, X-сцепленный лимфопротеративный синдром 2-го типа (XLP2), IL10 (дефект сигнального пути интерлейкина-10, ИЛ-10), дефицит LRBA (lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein), дефицит TTC7A (tetratricopeptide repeat domain 7A), дефицит NEMO (NF-κB Essential Modulator), общий переменный иммунодефицит (ОВИН), CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) [4, 5].

К настоящему времени идентифицирован ряд моногенных дефектов с ВЗК-подобными фенотипами (связанных с ВЗК и ВЗК-подобным колитом), по-разному влияющих на гомеостаз слизистой оболочки, в частности [1, 6, 7]:

- нарушение барьерной функции эпителия (например, IKBKG, TTC7, ADAM17);
- дефекты фагоцитов, таких как хроническая гранулематозная болезнь (CYBB, CYBA, NCF1, NCF2 и NCF4) и врожденная нейтропения (G6PC3) [2, 8, 9];

- мутации, связанные с ВЗК, сопровождающиеся иммунной дисрегуляцией в генах IL10, L10RA, IL10RB, NFAT5, TGFB1, RIPK1, ELF4; восприимчивость к ВЭБ и лимфопротеративным заболеваниям связана с мутациями в гене XIAP (кодирует X-связанный ингибитор апоптоза), которые могут вызывать развитие X-сцепленного лимфопротеративного синдрома (XLP2) и гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза; они часто проявляются в возрасте от 2 до 6 лет агрессивным колитом, перианальными свищами и рефрактерным ВЗК [6]; кроме того, были обнаружены мутации, связанные с регуляторными дефектами Т-клеток (в FOXP3, X-сцепленная иммунная дисрегуляция, полиэндокринопатия и энтеропатия (IPEX) [10, 11];

- комплекс дефектов функции Т- и В-клеток (например, LRBA, CD40LG; WAS).

Некоторым пациентам с дефектами генов, поражающих преимущественно гемопоэтические стволовые клетки (IL-10R, IL-10, XIAP, FOXP3), показана трансплантация стволовых гемопоэтических клеток.

Цель исследования – проведение комплексного анализа генетических дефектов, лежащих в основе ВЗК, свидетельствующих о врожденных дефектах иммунной системы.

Материал и методы

В исследование включены 46 пациентов с манифестацией ВЗК в возрасте до 18 лет включительно, которые наблюдались в учреждениях здравоохранения: «Городская детская инфекционная клиническая больница», «4-я городская детская клиническая больница», «Республиканский научно-практический центр детской хирургии» г. Минска, Республика Беларусь в период с 2016 по 2023 гг. Исследование утверждено этическим комитетом учреждения здравоохранения

«Городская детская инфекционная клиническая больница» г. Минска (Республика Беларусь). Информированное согласие на участие в исследовании подписано законными представителями пациентов. Наблюдаемые пациенты были разделены на подгруппы ВЗК по возрасту, согласно классификации, предложенной авторами Северо-Американского общества детской гастроэнтерологии, гепатологии и питания с изложением позиции по оценке и лечению пациентов с ВЗК.

Всем пациентам проводили следующие исследования: общий анализ крови с подсчетом уровня тромбоцитов и формулы, скорости оседания эритроцитов (СОЭ); биохимическое исследование с определением уровня С-реактивного белка (СРБ), мочевины, креатинина, альбумина, функциональных тестов печени (АлАТ, АсАТ); ферритин, белок, альбумин; иммунологические исследования.

Оценка генетических нарушений у пациентов проводилась по результатам анализа данных заключений полноэкзомного секвенирования.

Статистическая обработка полученных данных выполнялась в статистическом пакете R, версия 4.1. Результаты анализа считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Проведение генетического анализа 46 пациентам с ВЗК позволило у 11 (23,9%) выявить мутации в генах, свидетельствующих о моногенной патологии. С учетом выявленных мутаций пациенты разделены на 2 группы: 1-я – 35 пациентов с ВЗК и 2-я – 11 пациентов с мутациями в генах, протекающих с нарушением иммунной системы.

Сравнительный анализ по ряду параметров между двумя группами пациентов представлен в таблице 1.

Как видно из таблицы 1, в группе детей с моногенными ВЗК медиана возраста манифестации кишечного синдрома составила 1 месяц [1; 11,5], что статистически значимо ниже возраста пациентов с ВЗК – 30 [20; 65] месяцев, ($p < 0,001$). Манифестация колита наблюдалась у 9 (81,8%) пациентов уже в возрасте 28 дней – 24 месяца ($p = 0,029$). По гендерному признаку не выявлено различий между группами пациентов ($p < 0,001$). Пациенты с моногенными ВЗК имели статистически значимо чаще учащенный стул, от 6-8 раз в сутки и более ($p = 0,006$), низкий уровень гемоглобина ($p = 0,002$), тромбоцитов ($p < 0,001$), альбумина (36,4 [31,8; 40,7]), $p = 0,003$, и высокий уровень СРБ (16 [7,2; 41,7]), $p = 0,007$. По другим показателям, таким как содержание эритроцитов, лейкоцитов лимфоцитов СОЭ мм/час, различий не установлено.

Сравнительный анализ иммунограмм в двух группах показал, что уровень IgM у 4 (36,4 %) пациентов с ВДИС был ниже нормы, в отличие

Таблица 1. – Сравнительная клинико-эпидемиологическая характеристика пациентов с ВЗК и моногенных ВЗК

Table 1. – Comparative clinical and epidemiological characteristics of patients with IBD and monogenic IBD

Параметры	Группа ВЗК, n= 35	Группа моногенных ВЗК, n= 11
Пол, n (%)		
Мальчики	22 (62,9)	4 (36,4)
Девочки	13 (37,1)	7 (63,6)
Возраст манифестации заболевания, мес. Ме [Q25; Q75]	30 [20, 65]	1 [1, 11,5]
первые 27 дней (<28 дней)	0	1 (9,1)
28 дней – 24 месяца	14 (40,0)	9 (81,8)
25 месяцев – 72 месяца	12 (34,3)	1 (9,1)
73 месяца – 120 месяцев	2 (5,7)	0
121 месяц – 204 месяца	7 (20,0)	0
Примеси в кале (кровь)	25 (71,4)	10 (90,9)
Учащенный жидкий стул, n (%)		
3-5 раз	12 (34,3)	0
6-8 раз	11 (31,4)	6 (54,5)
9 и более раз	4 (11,4)	5 (45,5)
Запор, n (%)	1 (2,9)	0
Болевой синдром, n (%)	32 (91,4)	10 (90,9)
Астенический синдром, n (%)	23 (65,7)	8 (72,7)
Параректальные проявления, n (%)	2 (5,7)	0
Внекишечные проявления, n (%)	2 (5,7)	1 (9,1)
Гемоглобин, г/л, m ± SD	112 ± 13	99 ± 5
Тромбоциты 10 ⁹ , m ± SD	356 ± 81	232 ± 128
Альбумин, г/л, Ме [Q25; Q75]	46,9 [42,3, 48]	36,4 [31,8, 40,7]
С-реактивный белок (ульт. мг/л), Ме [Q25; Q75]	2 [0,5, 9,8]	16 [7,2, 41,7]

от группы детей с ВЗК, у которых низкий уровень IgM наблюдался только у 1 (2,9 %) пациента (p=0,007) (табл. 2).

Со стороны клеточного звена в группе детей с ВДИС отмечалось статистически значимое снижение абсолютного количества Т-хелперов (CD4+) – у 6 (54,5%), p=0,015, % Т-цитотоксических (CD8+) лимфоцитов – у 4 (36,4%), p=0,010, индекса CD4/CD8 – у 5 (45,5%), p=0,005, абсолютного количества CD3 + CD45+ – у 2 (18,2%), p=0,036.

Таблица 2. – Сравнительная характеристика показателей клеточного и гуморального иммунитета у пациентов с ВЗК и моногенных ВЗК

Table 2. – Comparative characteristics of cellular and humoral immunity indicators in patients with IBD and monogenic IBD

Показатели	Группа ВЗК, n= 35	Группа моногенных ВЗК n 11
	n (%)	n (%)
IgG		
ниже нормы	1 (5,7)	3 (27,3)
норма	33 (91,4)	8 (72,7)
выше нормы	1 (2,9)	0
IgM		
ниже нормы	1 (2,9)	4 (36,4)
норма	33 (94,3)	7 (63,6)
выше нормы	1 (2,9)	0
IgA		
ниже нормы	5 (14,3)	4 (36,4)
норма	29 (82,9)	7 (63,6)
выше нормы	1 (2,9)	0
Лейкоциты 10 ⁹		
ниже нормы	8 (22,9)	4 (36,4)
норма	15 (42,9)	5 (45,5)
выше нормы	12 (34,3)	2 (18,2)
Лимфоциты, в %		
ниже нормы	18 (51,4)	6 (54,5)
норма	14 (40,0)	3 (27,3)
выше нормы	3 (8,6)	2 (18,2)
Лимфоциты, абс.		
ниже нормы	16 (45,7)	8 (72,7)
норма	15 (42,9)	2 (18,2)
выше нормы	4 (11,4)	1 (9,1)
CD3 + CD45+, %		
ниже нормы	7 (20,0)	5 (45,5)
норма	16 (45,7)	3 (27,3)
выше нормы	12 (34,3)	3 (27,3)
CD3 + CD45+, абс.		
ниже нормы	0	2 (18,2)
норма	23 (65,7)	6 (54,5)
выше нормы	12 (34,3)	3 (27,3)
Т-хелперы (CD4+), %		
ниже нормы	1 (2,9)	2 (18,2)
норма	32 (91,4)	8 (72,7)
выше нормы	2 (5,7)	1 (9,1)
Т-хелперы (CD4+), абс.		
ниже нормы	5 (14,3)	6 (54,5)
норма	23 (65,7)	5 (45,5)
выше нормы	7 (20,0)	0

Продолжение таблицы 2 на стр. 100

Продолжение таблицы 2, начало на стр. 99

Т- цитотоксические (CD8+), %		
ниже нормы	1 (2,9)	4 (36,4)
норма	34 (97,1)	7 (63,6)
выше нормы	-	-
Т- цитотоксические (CD8+), абс.		
ниже нормы	23 (65,7)	10 (90,9)
норма	11 (31,4)	0
выше нормы	1 (2,9)	1 (9,1)
Индекс CD4/CD8		
ниже нормы	5 (14,3)	5 (45,5)
норма	28 (80,0)	3 (27,3)
выше нормы	2 (5,7)	3 (27,3)
CD19, %		
ниже нормы	0	1 (9,1)
норма	15 (42,9)	7 (63,6)
выше нормы	20 (57,1)	3 (27,3)
CD19, абс.		
ниже нормы	17 (48,6)	9 (81,8)
норма	16 (45,7)	1 (9,1)
выше нормы	2 (5,7)	1 (9,1)
CD16+ CD56+, (NK), %		
ниже нормы	8 (22,9)	5 (45,5)
норма	27 (77,1)	6 (54,5)
выше нормы	-	-
CD16+ CD56+, (NK), абс.		
ниже нормы	17 (48,6)	8 (72,7)
норма	14 (40,0)	3 (27,3)
выше нормы	4 (11,4)	0

Таблица 3. – Генетические варианты моногенных ВЗК (n=11)**Table 3.** – Genetic variants of monogenic IBD (n=11)

№	Ген	Вариант замены	Зиготность
1	PIK3CD	c.3061G>A(p.Glu1021Lys)	Het
2	CTLA-4	c.151C>T (p.Arg 51*)	Het
3	FOXP3	c.851C>T (p.Ala284Val)	hemizygous
4	CFTR	c.43delC (p.Leu15fs)	Comp.het.
	CFTR	c.1210-11T>G	
5	PIK3CD	c.3061G>A(p.Glu1021Lys)	Het
6	SLC5A1	c.1666-2delA	Hom
7	FOXP3	c.748_750del(p.Lys250del)	hemizygous
8	SLC5A1	c.1666-2delA	Comp.het.
	SLC5A1	c.1680T>G(p.(Cys560Trp))	
9	SLC5A1	c.1666-2delA	Comp.het.
	SLC5A1	c.1680T>G(p.(Cys560Trp))	
10	JAK3	c.2518C>T (p.Arg840Cys)	Hom
11	CD40LG	c.430G>A (p.Gly144Arg)	hemizygous

Таким образом, все вышеперечисленные клинико-лабораторные показатели не позволили без полноэкзомного секвенирования однозначно определить наличие моногенных ВЗК (табл. 3).

По результатам генетического исследования были обнаружены следующие варианты моногенных ВЗК: врожденные дефекты в иммунной системе: у 3-х пациентов (27,3%, №№ 2, 3, 7) нарушения в генах иммунной дисрегуляции – CTLA-4 (c.151C>T (p.Arg 51*)); FOXP3 (c.851C>T (p.Ala284Val)); FOXP3 (c.748_750del (p.Lys250del)); у 2-х (18,2%) пациентов (№№ 1, 5) – нарушения в гене PIK3CD (c.3061G>A(p.Glu1021Lys)), которые проявлялись ВДИС с преимущественным дефицитом антител; у 2-х (18,2%) пациентов (№№ 10, 11) – нарушения в генах, влияющих на клеточный и гуморальный иммунитет JAK3 (c.2518C>T (p.Arg840Cys)); CD40LG (c.430G>A (p.Gly144Arg)) и в одном случае (пациент № 4) установлен врожденный дефект количества или функции фагоцитов CFTR (c.43delC (p.Leu15fs) и c.1210-11T>G). Также у 3-х (27,3%) пациентов (№№ 6, 8, 9) – нарушения в гене SLC5A1 (c.1666-2delA); SLC5A1 (c.1666-2delA и c.1680T>G (p.(Cys560Trp))), отвечающем за дефицит кишечного транспортера моносахаридов, известный как мальабсорбция глюкозы/галактозы.

Два пациента (№ 7, № 3) имели генетические варианты гена FOXP3 в гемизиготном состоянии, которые являются известными патогенными мутациями (Clinvar ID: 499890) и их выявление позволяет диагностировать X-сцепленный синдром дисрегуляции иммунной системы, полиэндокринопатии и энтеропатии (IPEX) – тяжелое врожденное системное аутоиммунное заболевание, характеризующееся рефрактерной секреторной диарей, эндокринными нарушениями, поражением кожи и инфекциями. IPEX-синдром, который характеризуется дисрегуляцией иммунной системы, полиэндокринопатией и энтеропатией. FOXP3 содержит N-терминальный богатый пролиновым домен, регулирующий транскрипцию, кодирующий транскрипционный фактор семейства Forkhead, контролирующий развитие и функцию регуляторных Т-клеток CD4+CD25+, участвующих в негативной регуляции иммунных реакций и аутоперантности [10, 11].

У пациента № 7 в возрасте 23 месяца развились диарея, нефротический синдром, потребовавшие проведения коррекции водно-электролитного состояния (гипокалиемии, гипокальциемии, гипоальбуминемии), диагностированы экзема, рецидивирующие инфекции, отмечалась недостаточная прибавка роста и веса, что позволило заподозрить ВДИС.

Пациент № 3 также по результатам полноэкзомного секвенирования имел мутацию в гене FOXP3 и клинически у него наблюдались за-

держка развития, неуправляемая секреторная диарея, экзема, лимфаденопатия, дефицит и отставание в росте и массе тела.

Синдром активированного PI3K-дельта подтвержден у двух пациентов (№ 1, № 5) мужского пола с развитием ВЗК-подобного заболевания в возрасте 4 месяца. Оба пациента имели схожие клинические симптомы, которые проявились на первом году жизни: с месячного возраста наблюдались у педиатра по поводу анемии, в первом полугодии развились диарея и рецидивирующие синусно-пульмональные инфекции на фоне вирусной ВЭБ и ЦМВ. Из других симптомов наблюдалась лимфаденопатия, гепатоспленомегалия и неврологическая симптоматика. У пациента № 1 при секвенировании выявлен миссенс-вариант в 24 экзоне гена PIK3CD (с.3061G>A(p.Glu1021Lys) в гетерозиготном состоянии. Данная мутация – патогенная (ClinVar ID: 88675), ассоциирована с аутосомно-доминантным иммунодефицитом, тип14А (OMIM: 615513). В результате данному пациенту был установлен диагноз – синдром активированного PI3K-дельта (OMIM: 615513), который относится к первичному иммунодефициту, характеризуется рецидивирующими синопульмональными инфекциями, лимфаденопатией, узловой лимфоидной гиперплазией и генерализованной ЦМВ и ВЭБ инфекциями с явлениями колита. Дети с данной патологией имеют нарушенный ответ на вакцины, рецидивирующие инфекции респираторного тракта, вызванные *S. pneumoniae* и *H. influenzae* типа В.

У пациента № 11 мужского пола диагностирован синдром гипер-IgM с началом заболевания в 19 месяцев, когда развились язвенный стоматит, лихорадка. При проведении ПЦР обследования у пациента в крови обнаружена ДНК ВЭБ, развилась диарея с потерей массы тела. В данном случае выявлен миссенс-вариант в 15 экзоне гена CD40LG (с.430G>A(p.Gly144Arg) в гомозиготном положении. Мутации в данном гене ассоциированы с X-сцепленным синдромом гипер-IgM (HIGM) (OMIM: 308230). Для детей с гипер-IgM-синдромом (HIGM) характерны рецидивирующие или тяжелые инфекции в первые 5 лет жизни, отсутствие или низкий уровень сывороточного IgG, нормальный или повышенный уровень сывороточного IgM, отсутствие или слабый специфический иммунный ответ, нормальное или повышенное количество В-лимфоцитов и нормальное количество Т-лимфоцитов. У пациентов с дефицитом CD40L/CD40 клиническое течение заболевания более тяжелое, чем у пациентов с другими нарушениями, связанными с дефицитом антител. Как правило, они попадают в поле зрения врачей в возрасте 1-2 лет из-за рецидивирующих или тяжелых бактериальных инфекций, или оппортунистических инфекций, особенно поражающих дыхательную систему и желудочно-кишечный тракт.

У пациентки № 4 женского пола с началом клинических проявлений ВЗК в возрасте 18 месяцев определена компаунд гетерозигота в гене CFTR. Клиническими проявлениями были неразрешимая диарея, боли в животе, лимфаденопатия и синопульмональные инфекции. Учитывая симптоматику пациентки и выявленный компаунд-гетерозиготный вариант в гене CFTR, диагностирована кишечная форма муковисцидоза. Согласно классификации ВДИС у детей, предложенной Международным союзом иммунологических обществ (International Union of Immunologic Societies, IUIS) в 2022 г., ген CFTR включен в группу № 5 – врожденных дефектов количества или функции фагоцитов, дефектов подвижности [5].

Одна из выявленных гетерозигот была представлена делецией в рамке считывания в 1-м экзоне CFTR (с.43delC (p.Leu15fs)) с частотой встречаемости в базе ExAc 0,0008% в мире, которая не выявлялась в европейской популяции. Данная делеция не входит в перечень основных известных патогенных вариантов базы портала муковисцидоза <https://www.cftr2.org/help>, однако в данной геномной позиции находится также известная патогенная замена p.Leu15Pro, что дает более весомые основания предполагать патогенность обнаруженной делеции. Согласно предикторам патогенности Mutation Taster, PolyPhen, Sift данный вариант патогенен. Вторая гетерозигота из компаунда обнаружена в 9 интроне гена CFTR (с.1210-11T>G), имеет конфликтную интерпретацию патогенности pathogenic (9); likely pathogenic (1); uncertain significance (3), ClinVar ID:178713) и, вероятнее всего, также патогенная. Мутации в гене CFTR ассоциированы с муковисцидозом, развитием бронхоэктазов и наследственным панкреатитом. В настоящее время продолжаются исследования по изучению воспалений в кишечнике и изменению микробиоты при муковисцидозе [12-17].

У пациента (№ 10) мужского пола с очень ранним началом заболевания на 14-й день жизни развилась сочетанная бактериально-грибковая инфекция, непрерывно рецидивирующее течение, персистирующая ЦМВ-инфекция, гемоколит, анемия, признаки белково-энергетической недостаточности тяжелой степени с задержкой темпов физического, психического развития. В результате секвенирования выявлена однонуклеотидная замена в 19 экзоне гена JAK3 GOF (с.2518 C>T (p.Arg840Cys)) в гомозиготном положении. Обнаруженная замена – вариант неопределенного клинического значения (VUS – англ, Variant of Uncertain significance, ClinVar ID: 664577), но по предикторам патогенности Mutation Taster, PolyPhen, Sift – патогенная. Аутосомно-рецессивный T-B+NK- тяжелый комбинированный иммунодефицит (ТКИД), вызывается гомозиготной или сложной гетерозиготной

мутацией в гене Янус-киназы-3 (JAK3; 600173) на хромосоме 19p13. Нарушения, связанные с ТКИД, проявляются в раннем грудном возрасте в виде инфекций, вызванных условно-патогенными микроорганизмами или в виде тяжелых или затяжных инфекций, вызванных вирусами. Инфекционные осложнения ТКИД одинаково независимы от конкретного генетического дефекта и отражают неспособность Т-клеток, а в некоторых случаях, НК-клеток контролировать, и в конечном итоге уничтожать внутриклеточные вирусы в лимфатических и других тканях. Дефицит массы тела – характерное проявление у большинства пациентов и обычно вызван хроническим гастроэнтеритом, вызванным такими патогенами, как ротавирус, аденовирус, энтеровирусы или норовирус. У пациентов с ТКИД также повышен риск осложнений после применения живых вакцин, таких как диссеминированная инфекция после введения вакцины Кальмета-Герена (БЦЖ) или хроническая диарея из-за персистирующей ротавирусной инфекции, вызванной вакциной. К грибковым инфекциям, которые указывают на тяжелый дефицит Т-клеточного иммунитета CD4, относятся стойкий и тяжелый кожно-слизистый кандидоз и пневмония, вызванная *Pneumocystis jirovecii* (PJP). Пневмоцистная инфекция всегда должна служить поводом для тщательного поиска ТКИД или другого первичного иммунодефицита, связанного с Т-клетками CD4. Общая распространенность всех типов ТКИД составляет приблизительно 1 на 75 000 рождений [9].

У пациента (№ 2) с очень ранним началом заболевания была выявлена мутация гена CTLA-4 (с.151C>T (p.Arg 51*)), что определяет иммунную дисрегуляцию с аутоиммунитетом, иммунодефицитом и лимфопролиферацией, которая является аутосомно-доминантным сложным иммунным расстройством с крайне изменчивой картиной и клиническими проявлениями. Характерные признаки включают рецидивирующие инфекции, часто связанные с гипогаммаглобулинемией, аутоиммунные признаки, такие как аутоиммунные цитопении, и аномальную лимфоцитарную инфильтрацию нелимфоидных органов, включая легкие, мозг и желудочно-кишечный тракт, что приводит к энтеропатии.

Моногенное заболевание в виде нарушения всасывания глюкозы-галактозы (E74.3) было диагностировано у 3 пациентов (№ 6, № 8, № 9) женского пола. У этих пациентов (сибсы) обнаружена ранее не описанная гомозиготная мутация в 13 интроне гена SLC5A1 (chr22:32500770CA>C, rs764819816), приводящая к нарушению канонического сайта сплайсинга (с.1666-2delA, NM_000343.3). Гомозиготные мутации в гене SLC5A1, в том числе приводящие к нарушению синтеза полноразмерного белка, описаны у пациентов с глюкозо-галактозной мальабсор-

бцией (OMIM: 606824). Частота мутации в контрольной выборке ExAC составляет 0,0017%. Поскольку мутация нарушает синтез полноразмерного белка, ее следует расценивать как вероятно патогенную. Ген SLC5A1 кодирует синтез котранспортера натрия/глюкозы (SGLT1). Этот белок содержится в основном в эпителиальных клетках кишечника и эпителии проксимальных канальцев почек и транспортирует глюкозу и галактозу внутрь клетки. При этом натрий и вода переносятся через клеточную мембрану вместе с сахарами. Мальабсорбция глюкозы/галактозы – это состояние, при котором организм не может усваивать глюкозу и галактозу, что в первую очередь приводит к тяжелой диарее. При кормлении грудным молоком или обычными детскими смесями заболевание манифестирует с первых дней жизни тяжелой диареей, которая приводит к потере веса и обезвоживанию, может также наблюдаться легкая глюкозурия. Было обнаружено более 60 мутаций в гене SLC5A1, вызывающих неадекватное поглощение глюкозы галактозом. Сахара не полностью поглощаются клетками эпителия кишечника и накапливаются в кишечнике. Кроме того, вода, которая обычно переносится вместе с сахарами, остается в кишечном тракте, что приводит к дегидратации тканей тела и тяжелой диарее. В почках белок SGLT1 не может фильтровать глюкозу; однако другие белки в проксимальных трубочках, включая белок SGLT2, способны поглощать достаточное количество глюкозы в кровотоке, так что наличие глюкозы в моче (глюкозурия) умеренное.

Выводы

Желудочно-кишечные проявления, являясь вторым по распространенности осложнением ВДИС (после болезней легких), наблюдаются у 5-50% пациентов с разными типами ВДИС. ВДИС может первоначально присутствовать у пациентов с ВЗК и проявляться поражением ЖКТ в виде длительной диареи, дефицитом массы тела или ВЗК, которые часто не отвечают традиционным методам лечения. В настоящее время считается, что ВЗК – полигенное заболевание с набором сложных генетических признаков. Пациенты с очень ранним началом ВЗК могут быть носителями широкого спектра генетических аберраций. Наиболее значимый клинический признак моногенной ВЗК – ранний возраст начала заболевания. До 15-20% детей с манифестацией ВЗК до 6 лет имеют моногенный дефект. Моногенные дефекты, фенотипически проявляющиеся ВЗК, включают ВДИС, нарушения обмена веществ и требуют терапии, отличной от терапии ВЗК. Стертая клиническая картина затрудняет диагностику моногенных заболеваний, что ухудшает прогноз заболевания.

При ВЗК, наряду с лабораторными и инструментальными исследованиями, целесообразно проводить молекулярно-генетический анализ целевых генов. Иммунная система ЖКТ постоянно подвергается воздействию разных внешних антигенов, включая антигены бактерий, вирусов и паразитов, а также чужеродных пищевых белков [5]. Баланс между иммунными реакциями на чужеродные микроорганизмы и толерантностью к непатогенным антигенам – необходимый для иммунного гомеостаза в ЖКТ процесс, который обычно способствует развитию толерантности. Иммунная система ЖКТ в основном регулируется Т-лимфоцитами, в частности Treg, которые ответственны за клеточный иммунитет и иницирование антигена-специфических иммунных реакций. Один из эффективных методов диагностики моногенных ВЗК (ВДИС и др.) – секвенирование нового поколения. После проведения молекулярно-генетического тестирования диагноз ВЗК

остался без изменения у 76% пациентов, у 24% клинический диагноз был изменен на моногенное ВЗК-подобное заболевание, преимущественно при манифестации ВЗК в раннем детском возрасте. Колит – относительно неспецифический фенотип, который может быть результатом изменений в разных генах. Гены, поражающие как адаптивную, так и врожденную иммунную систему, а также эпителиальную функцию, могут привести к воспалению кишечника.

До 15-20% детей с манифестацией ВЗК до 6 лет имеют моногенный дефект. Моногенные дефекты, фенотипически проявляющиеся ВЗК, включают ВДИС, нарушения обмена веществ и требуют терапии, отличной от терапии ВЗК.

При ВЗК молекулярно-генетический анализ целевых генов позволяет диагностировать и доказать врожденные дефекты иммунной системы у пациентов с очень ранним началом поражения ЖКТ.

References

- Moran CJ, Klein C, Muise AM, Snapper SB. Very Early-onset Inflammatory Bowel Disease: Gaining Insight Through Focused Discovery. *Inflamm Bowel Dis*. 2015;21(5):1166-1175. doi: 10.1097/MIB.0000000000000329.
- Uhlig HH, Schwerdt T, Koletzko S, Shah N, Kammermeier J, Elkadri A, Ouahed J, Wilson DC, Travis SP, Turner D, Klein C, Snapper SB, Muise AM; COLORS in IBD Study Group and NEOPICS. The diagnostic approach to monogenic very early onset inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2014;147(5):990-1007.e3. doi: 10.1053/j.gastro.2014.07.023.
- Kastsukevich LI, Romanova ON, Kolomiets ND, Marakhovskiy KY, Krasko OV, Nazarenko ON, Savich OL. Sravnitel'naja harakteristika raznyh tipov vospalitelnyh zabolevanij kishechnika u detej [Comparative characteristics of different types of inflammatory bowel disease in children]. *Gepatologija i gastrojenterologija* [Hepatology and Gastroenterology]. 2023;7(2):127-134 doi: 10.25298/2616-5546-2023-7-2-127-134. edn: QOIRVA. (Russian).
- Kastsukevich LI, Romanova ON, Kolomiets ND, Mankevich RN, Nazarenko ON, Mikhajlenko AP, Mazur OCh, Kilchevskij AV. Geneticheskie narushenija u pacientov s porazheniem kishechnika na fone pervichnogo immunodeficitu [Genetic disturbances in patients with intestinal lesion in the background of primary immunodeficiency]. *Klinicheskaja patofiziologija* [Clinical pathophysiology]. 2021;27(1):49-58. edn: EUPIJK. (Russian).
- Tangye SG, Al-Herz W, Bousfiha A, Cunningham-Rundles C, Franco JL, Holland SM, Klein C, Morio T, Oksenhendler E, Picard C, Puel A, Puck J, Seppänen MRJ, Somech R, Su HC, Sullivan KE, Torgerson TR, Meyts I. Human Inborn Errors of Immunity: 2022 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *J Clin Immunol*. 2022;42(7):1473-1507. doi: 10.1007/s10875-022-01289-3.
- Ouahed J, Spencer E, Kotlarz D, Shouval DS, Kowalik M, Peng K, Field M, Grushkin-Lerner L, Pai SY, Bousvaros A, Cho J, Argmann C, Schadt E, McGovern DPB, Mokry M, Nieuwenhuis E, Clevers H, Powrie F, Uhlig H, Klein C, Muise A, Dubinsky M, Snapper SB. Very Early Onset Inflammatory Bowel Disease: A Clinical Approach With a Focus on the Role of Genetics and Underlying Immune Deficiencies. *Inflamm Bowel Dis*. 2020;26(6):820-842. doi: 10.1093/ibd/izz259.
- Kuenzig ME, Fung SG, Marderfeld L, Mak JWY, Kaplan GG, Ng SC, Wilson DC, Cameron F, Henderson P, Kotze PG, Bhatti J, Fang V, Gerber S, Guay E, Kotteduwa Jayawarden S, Kadota L, Maldonado D F, Osei JA, Sandarage R, Stanton A, Wan M; InsightScope Pediatric IBD Epidemiology Group; Benchimol EI. Twenty-first Century Trends in the Global Epidemiology of Pediatric-Onset Inflammatory Bowel Disease: Systematic Review. *Gastroenterology*. 2022;162(4):1147-1159.e4. doi: 10.1053/j.gastro.2021.12.282.
- Moran CJ. Very early onset inflammatory bowel disease. *Semin Pediatr Surg*. 2017;26(6):356-359. doi:10.1053/j.sempedsurg.2017.10.004.
- Yska HAF, Elsink K, Kuijpers TW, Frederix GWJ, van Gijn ME, van Montfrans JM. Diagnostic Yield of Next Generation Sequencing in Genetically Undiagnosed Patients with Primary Immunodeficiencies: a Systematic Review. *J Clin Immunol*. 2019;39(6):577-591. doi: 10.1007/s10875-019-00656-x.
- Barzaghi F, Passerini L, Gambineri E, Ciullini Mannurita S, Cornu T, Kang ES, Choe YH, Cancrini C, Corrente S, Ciccocioppo R, Cecconi M, Zuin G, Discepolo V, Sartirana C, Schmidtko J, Ikinciogullari A, Ambrosi A, Roncarolo MG, Olek S, Bacchetta R. Demethylation analysis of the FOXP3 locus shows quantitative defects of regulatory T cells in IPEX-like syndrome. *J Autoimmun*. 2012;38(1):49-58. doi: 10.1016/j.jaut.2011.12.009.
- Kim SC. Monozygotic Twin Cases of XIAP Deficiency Syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2018;67(5):e101. doi: 10.1097/MPG.0000000000001536.
- Tam RY, Van Dorst JM, McKay I, Coffey M, Ooi CY. Intestinal Inflammation and Alterations in the Gut Microbiota in Cystic Fibrosis: A Review of the Current Evidence, Pathophysiology and Future Directions. *JCM*. 2022;11(3):649. doi: 10.3390/jcm11030649.
- Adeyemo-Salami O. Cystic Fibrosis in the Intestine and the Influence on Digestion. *J Immunol Sci*. 2020;4(3):22-32. doi: 10.29245/2578-3009/2020/3.1187.
- Chidrawar V, Alsuwayt B. Defining the role of CFTR channel blocker and CIC-2 activator in DNBS induced gastrointestinal inflammation. *Saudi Pharm J*. 2021;29(4):291-304. doi: 10.1016/j.jsps.2021.02.005.
- Trigo Salado C, Leo Carnerero E, De La Cruz Ramírez MD. Crohn's disease and cystic fibrosis: there is still a lot to learn. *Rev Esp Enferm Dig*. 2018;110(12):835-836. doi: 10.17235/reed.2018.5725/2018.
- Villeda-Ramírez MA, Meza-Guillen D, Barreto-Zúñiga R, Yamamoto-Furusho JK. ABC7/CFTR Expression Is Associated with the Clinical Course of Ulcerative Colitis Patients. *Gastroenterol Res Pract*. 2021;2021:5536563. doi: 10.1155/2021/5536563.
- Crites KS, Morin G, Orlando V, Patey N, Cantin C, Martel J, Brochiero E, Mailhot G. CFTR Knockdown induces proinflammatory changes in intestinal epithelial cells. *J Inflamm (Lond)*. 2015;12:62. doi: 10.1186/s12950-015-0107-y.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом.

Сведения об авторах:

Кастюкевич Лилия Ивановна, Белорусский государственный медицинский университет, e-mail: kastsiukevich.liliya@gmail.com, ORCID: 0000-0002-7666-1017

Романова Оксана Николаевна, д-р мед. наук, профессор, Белорусский государственный медицинский университет, e-mail: romox@tut.by, ORCID: 0000-0001-7383-1727

Михаленко Елена Петровна, канд. биол. наук, Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, ORCID: 0000-0003-4543-2862

Коломиец Наталья Дмитриевна, д-р мед. наук, профессор, Белорусский государственный медицинский университет, e-mail: ndkolomiets@mail.ru, ORCID: 0000-0002-4837-5181

Гусина Ася Александровна, канд. мед. наук, доцент, Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя», ORCID: 0000-0003-2670-5634

Назаренко Ольга Николаевна, канд. мед. наук, доцент, Белорусский государственный медицинский университет

Манкевич Римма Николаевна, канд. мед. наук, доцент, Белорусский государственный медицинский университет

Марочкина Елена Михайловна, Городской клинический родильный дом № 2

Спиридович Татьяна Анатольевна, Городской клинический родильный дом № 2, ORCID: 0009-0001-9818-915X

Бобровнический Владимир Иванович, Белорусский государственный медицинский университет

Волошко Тамара Игоревна, Городская детская инфекционная клиническая больница

Мараховский Кирилл Юрьевич, канд. мед. наук, доцент, Республиканский научно-практический центр детской хирургии, e-mail: kmarakh@gmail.com, ORCID: 0000-0002-4191-6053

Кильчевский Александр Владимирович, Институт генетики и цитологии НАН Беларуси

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

Financing. The study was performed without external funding.

Conformity with principles of ethics. The study was approved by the local ethics committee.

Information about the authors:

Kastyukevich Liliya I., Belarusian State Medical University, e-mail: kastsiukevich.liliya@gmail.com, ORCID: 0000-0002-7666-1017

Romanova Oksana N., PhD, MD (Medicine), Professor, Belarusian State Medical University, e-mail: romox@tut.by, ORCID: 0000-0001-7383-1727

Mikhalenko Alena P., PhD (Biology), Institute of Genetics and Cytology of the Belarusian National Academy of Sciences, ORCID: 0000-0003-4543-2862

Kolomiets Natalya D., PhD, MD (Medicine), Professor, Belarusian State Medical University, e-mail: ndkolomiets@mail.ru, ORCID: 0000-0002-4837-5181

Gusina Asya A., PhD (Medicine), Associate Professor, Republican Scientific and Practical Center "Mother and child", ORCID: 0000-0003-2670-5634

Nazarenko Olga N., PhD (Medicine), Associate Professor, Белорусский государственный медицинский университет

Mankevich Rimma N., PhD (Medicine), Associate Professor, Belarusian State Medical University

Marochkina Yelena M., City clinical maternity hospital № 2

Spiridovich Tatsiana A., City clinical maternity hospital № 2, ORCID: 0009-0001-9818-915X

Babraunichy Vladimir I., Belarusian State Medical University

Voloshko Tamara I., City Children's Infectious Diseases Clinical Hospital

Marakhovsky Kirill Y., PhD (Medicine), Associate Professor, Republican Scientific and Practical Center of Pediatric Surgery, e-mail: kmarakh@gmail.com, ORCID: 0000-0002-4191-6053

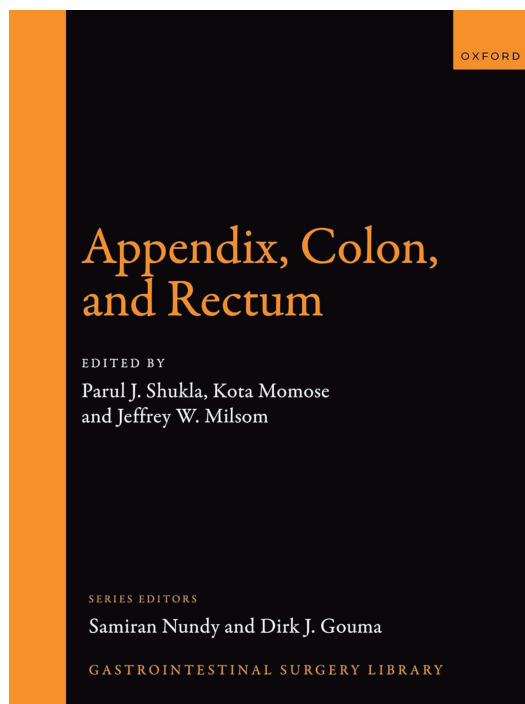
Kilchevsky Alexandr V., The Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus

Поступила: 04.09.2024

Принята к печати: 25.10.2024

Received: 04.09.2024

Accepted: 25.10.2024



Appendix, Colon, and Rectum (Gastrointestinal Surgery Library) / ed.: P. J. Shukla, K. Momose, J. W. Milsom. – London : Oxford University Press, 2024. – 320 p. – ISBN: 9780192863584.

Over the last two decades, there have been major advances in imaging, endoscopy, and laparoscopy in the field of Gastrointestinal (GI) surgery. GI surgery is the newest subspecialty branch of general surgery, where enhanced expertise and high-volume centres have made a difference in the outcomes of complex operations. Surgeons can now do difficult procedures with low morbidity and mortality rates, and greatly improved overall results.

This volume provides detailed and up-to-date information on diseases of the appendix, colon, and rectum. It covers the anatomy, surgical and non-surgical approaches to different conditions, dedicated chapters on rectal and colon cancer, plus current and future surgical techniques.

Written and edited by experts in the field, this book will be a valuable resource for specialist surgeons and trainees, general surgeons, researchers, and medical students.