© Коллектив авторов, 2018

DOI: 10.24110/0031-403X-2019-98-5-74-78
https://doi.org/10.24110/0031-403X-2019-98-5-74-78

Е.А. Николаева, В.Ю. Воинова, А.Н. Семячкина, М.И. Яблонская

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ СЕКВЕНИРОВАНИЯ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ У ДЕТЕЙ В СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОЙ КЛИНИКЕ

ОСП «Научно-исследовательский клинический институт педиатрии им. акад. Ю.Е. Вельтищева»
ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, г. Москва, РФ

Технология секвенирования нового поколения (Next-Generation Sequencing, NGS) представляет эффективный метод молекулярно-генетической диагностики, позволяющий осуществлять исследование большой группы генов. Основное показание для назначения NGS диагностики – наличие у пробанда (или обоснованное подозрение на наличие) гетерогенного патологического состояния, когда нет возможности четко идентифицировать нозологическую форму другими клинико-лабораторными методами и направить на таргетное исследование конкретного гена. Ограничения метода связаны с невозможностью детекции делеций >10–50 пар нуклеотидов, недостаточным покрытием отдельных генов, невозможностью выявления экспансии тринуклеотидных повторов и мутаций в интронах. Показаны трудности интерпретации данных NGS при выявлении ранее незарегистрированных мутаций, при обнаружении только одной гетерозиготной мутации в случае аутосомно-рецессивного заболевания.

Ключевые слова: *дети, наследственные болезни, диагностика, секвенирование нового поколения, показания, интерпретация.*

Цит.: *Е.А. Николаева, В.Ю. Воинова, А.Н. Семячкина, М.И. Яблонская. Использование технологии секвенирования нового поколения для диагностики наследственных заболеваний у детей в специализированной клинике. Педиатрия. 2019; 98 (5): 74–78.*

E.A. Nikolaeva, V.Yu. Voinova, A.N. Semyachkina, M.I. Yablonskaya

USING THE NEXT-GENERATION SEQUENCING TECHNOLOGY FOR HEREDITARY DISEASES IN CHILDREN DIAGNOSTICS IN A SPECIALIZED CLINIC

Clinical Research Institute of Pediatrics named after acad. Y.E. Veltischev, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Next-Generation Sequencing, NGS technology is an effective molecular genetic diagnostic method that allows to perform the study of a large group of genes. The main indication for the appointment of NGS diagnostics: the presence (or a reasonable suspicion of the presence) of a heterogeneous pathological condition in a proband, when it is not possible to clearly identify the nosological form by other clinical and laboratory methods and send it to specific gene targeted study. Method limitations are associated with the impossibility of detecting deletions of >10–50 nucleotide pairs, insufficient coverage of individual genes, the impossibility of detecting the expansion of trinucleotide repeats and mutations in introns. The article describes difficulties of NGS data

Контактная информация:
Николаева Екатерина Александровна – д.м.н., руководитель отдела клинической генетики Обособленного структурного подразделения «Научно-исследовательский клинический институт педиатрии им. акад. Ю.Е. Вельтищева» ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ РФ
Адрес: Россия, 125412, г. Москва, ул. Талдомская, 2
Тел.: (495) 483-03-12, **E-mail:** enikolaeva@pedklin.ru
Статья поступила 23.10.18,
принята к печати 20.09.19.

Contact Information:
Nikolaeva Ekaterina Alexandrovna – MD., head of Clinical Genetics Department of the Separate Structural Division Clinical Research Institute of Pediatrics named after acad. Y.E. Veltischev, Pirogov Russian National Research Medical University
Address: Russia, 125412, Moscow, Taldomskaya str., 2
Tel.: (495) 483-03-12, **E-mail:** enikolaeva@pedklin.ru
Received on Oct. 23, 2018,
submitted for publication on Sep. 20, 2019.

interpretation when detecting previously unrecorded mutations, when only one heterozygous mutation is detected in the case of an autosomal recessive disease.

Keywords: *children, hereditary diseases, diagnostics, next-generation sequencing, indications, interpretation.*

Quote: *E.A. Nikolaeva, V.Yu. Voinova, A.N. Semyachkina, M.I. Yablonskaya. Using the next-generation sequencing technology for hereditary diseases in children diagnostics in a specialized clinic. Pediatria. 2019; 98 (5): 74–78.*

Наследственные заболевания (НЗ) вносят существенный негативный вклад в состояние здоровья детей. Каждая отдельная форма наследственной патологии встречается редко (или даже исключительно редко), однако в совокупности генетические болезни затрагивают около 3% населения. При этом более 34% всех госпитализаций в педиатрические центры и более 50% причин детской инвалидности и смертности связаны с генетически обусловленными состояниями [1].

Трудности диагностики НЗ у детей

Диагностика НЗ у детей представляет сложную задачу в силу большого количества нозологических форм (около 6000), многообразия проявлений, сходства клинической симптоматики при разной патологии, наличия атипичных и «стертых» вариантов болезни и др. Между тем точное установление диагноза исключительно важно со многих позиций: для выявления заболеваний, поддающихся лечению (их количество неуклонно растет), прогноза развития больного ребенка, определения тактики его медицинского наблюдения, оценки риска повторения болезни у членов семьи [2]. Для ряда болезней обмена веществ оптимальным способом диагностики остаются биохимические методы (например, определение аминокислот и органических кислот в биологических жидкостях при аминоацидопатиях и органических ацидемиях), и генетическое тестирование требуется прежде всего для целей медико-генетического консультирования. Однако большинство форм наследственной патологии не имеет четких лабораторных маркеров, и для установления правильного диагноза необходим анализ клинических данных и результатов генетического исследования.

Технология секвенирования ДНК нового поколения

Технология секвенирования нового поколения (Next-Generation Sequencing, NGS) за последние годы стала мощным диагностическим инструментом в педиатрии и клинической генетике для установления природы заболевания у детей с нарушениями нервно-психического и физического развития, слуха и зрения, патологией внутренних органов. В сравнении с хромосомным микроматричным анализом, рекомендуемым в настоящее время как тест первого уровня для детей с задержкой развития/умственной отсталостью и расстройствами поведения, секвенирование экзома достигает трехкратного увеличения количества диагностических находок [3, 4].

NGS представляет современную технологию, позволяющую одновременно, параллельно определять нуклеотидную последовательность большого количества генов. Вся структура ДНК (геном) человека включает регионы, кодирующие белки (экзом), и некодирующие области. Известно, что экзом организован в ~22 000 генов и составляет только 1% нуклеотидных последовательностей генома человека. В зависимости от полноты охвата секвенированием последовательности ДНК выделяют следующие виды NGS: полногеномное, полноэкзомное и секвенирование «клинического» экзома – только тех генов (около 5000), изменения в которых приводят к развитию известных моногенных заболеваний. В последнем случае нередко исследование ограничивают использованием генной панели, включающей набор генов (несколько десятков или сотен), мутации которых обусловливают клинически сходные формы патологии. Примером служат разработанные и применяемые в различных лабораториях генные панели «Эпилепсия», «Кардиомиопатия» и др.

Посредством технологии секвенирования происходит «считывание» генетического кода коротких последовательностей ДНК пробанда несколько раз, параллельно. С использованием инструментов биоинформатики эти последовательности сопоставляются с определенными положениями в контрольной, референсной последовательности генома человека, идентифицируются сходства и различия между ними [5, 6]. В ходе интерпретации данных секвенирования определяют, какие варианты в геноме/экзоме пациента могут быть клинически значимыми, т.е. осуществляют поиск возможной связи между фенотипом и генетическими вариантами, идентифицированными у пробанда. На решение такой задачи направлены усилия многопрофильной команды специалистов: биоинформатика (анализирует генетические варианты с использованием программного обеспечения, «отбрасывает» непатогенные полиморфизмы, распространенные в популяции человека, и выделяет патогенные/вероятно патогенные варианты), медицинского генетика с опытом диагностики редких болезней и клинициста, курирующего обследуемого пациента [7]. Основываясь на клинических особенностях пробанда и предполагаемом (или определенном) типе наследования, биоинформатик просматривает опубликованную литературу и базы данных о геномных вариациях (например, Human Gene Mutation Database, ClinVar, Лейденскую базу данных) для доказательства предполагаемой связи между выявленными генетическими вариантами и клиничес-

кими проявлениями у пациента [5]. В настоящее время используется следующая классификация генных вариантов по признаку их патогенности [8]: патогенные, вероятно патогенные, с неясной клинической значимостью, вероятно непатогенные и непатогенные. Для дальнейшей клинической интерпретации и определения связи с фенотипом принимаются во внимание только варианты патогенные и вероятно патогенные.

Место NGS исследования в программах диагностики НЗ у детей

На основании собственного опыта анализа результатов метода NGS у наблюдаемых пациентов и при учете сведений литературы мы сформулировали следующее основное показание для назначения NGS диагностики: наличие у пробанда (или обоснованное подозрение на наличие) генетически гетерогенного заболевания, когда нет возможности четко идентифицировать нозологическую форму другими клинико-лабораторными методами (нейрорадиологическими, биохимическими и др.) и направить на таргетное исследование конкретного гена методом ПЦР.

Однако, если известен ген, мутации которого превалируют при данном генетически гетерогенном заболевании, целесообразно с него начинать генетическое исследование. Например, митохондриальная энцефаломиопатия Ли (Leigh) ассоциирована с мутациями не менее 25 генов ядерной и митохондриальной ДНК. Заболевание имеет достаточно четкие клинические критерии установления диагноза и в 75% случаев обусловлено мутациями гена *SURF1*, причем известна мажорная мутация, с анализа которой следует начинать таргетную диагностику.

Кроме того, назначение NGS целесообразно в связи с техническими и финансовыми сложностями исследования конкретного гена, мутации которого ведут к очень редкому заболеванию. В силу чрезвычайной редкости патологии и, соответственно, низкой востребованности метода разработка молекулярного анализа такого гена требует неоправданных затрат.

Спорным остается вопрос, является ли наличие неясной клинической картины у пробанда основанием для NGS диагностики. В такой ситуации возникают особые сложности интерпретации результатов исследования. По-видимому, клиницисты должны стремиться более четко определить форму заболевания (группу болезней), используя комплекс клинико-лабораторных методов.

При назначении NGS следует учитывать ограничения метода: невозможность детекции делеций >10–50 пар нуклеотидов, недостаточное покрытие отдельных генов, невозможность выявления экспансии тринуклеотидных повторов, ненадежное выявление мутаций в интронных областях.

В специализированной клинике для детей с врожденными и наследственными заболеваниями для установления диагноза используется комплекс методов, включающий анализ генеалогических данных, изучение анамнеза, клиническое обследование с привлечением электрофизиологических и нейрорадиологических методов, лабораторное обследование с использованием рутинных и инновационных технологий. Согласно современным представлениям, постановка клинического диагноза НЗ влечет за собой необходимость его молекулярно-генетического подтверждения, что избавляет от диагностических ошибок и обеспечивает адекватную помощь семье пробанда. Молекулярно-генетическое тестирование заболеваний, происхождение которых связано с мутациями одного известного гена (например, муковисцидоз, болезнь Марфана), требует исследования секвенированием по Сэнгеру, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) или MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification). При генетически гетерогенных заболеваниях и в случае необходимости дифференцирования с фенотипически сходными заболеваниями возникает необходимость прибегнуть к NGS-технологии. NGS-исследования (обычно назначалось секвенирование «клинического» экзома) мы назначали следующим группам пациентов: с нарушениями нервно-психического развития и микроаномалиями (подозрением на генетический синдром); с нейродегенеративными (в т.ч. митохондриальными) заболеваниями; с болезнями соединительной ткани; с рахитоподобными заболеваниями; несовершенным костеобразованием.

Клиническая интерпретация генетических вариантов, выявленных методом NGS

Интерпретация данных секвенирования не вызывала трудностей в случае идентификации известных патогенных мутаций, ассоциированных с заболеванием, заподозренным у пробанда.

У мальчика К. в возрасте 8 лет при клиническом обследовании были выявлены нарушения: отставание в психоречевом развитии, атаксия, приступы слабости, тугоухость, гиперлактатацидемия, умеренный метаболический ацидоз, высокая экскреция органических кислот. Установлен диагноз гетерогенного нейродегенеративного заболевания: митохондриальная энцефаломиопатия. При обследовании исключены мутации митохондриальной ДНК, генов *SURF1* и *POLG* (ФГБНУ МГНЦ). В результате NGS-исследования идентифицирована патогенная, зарегистрированная в базах данных гемизиготная мутация гена *PDHA1*, что дало основание уточнить форму болезни – митохондриальная энцефаломиопатия, обусловленная дефицитом пируватдегидрогеназного комплекса. Проведена коррекция терапии, определен медико-генетический прогноз.

У мальчика Д. с 5-летнего возраста наблюдалось осложненное течение периода реконвалесценции после травм: гемартроз правого коленного сустава, посттравматическая гематома мягких тканей левого бедра. В возрасте 15 лет произошел разрыв правой

подмышечной артерии после физической нагрузки, отмечались осложнения в ходе хирургического вмешательства. При обследовании обращали на себя внимание келоидные и папиросные рубцы, растяжимость кожи, гиперподвижность крупных и мелких суставов. Сделано заключение о наличии синдрома Элерса–Данло, предположен тип VIIB (артрохалазисный), наследуемый аутосомно-доминантно. Однако учитывая генетическую гетерогенность болезни (не менее 15 генов ядерной ДНК), принято решение об использовании метода NGS. При секвенировании определена патогенная зарегистрированная в базах данных гетерозиготная мутация гена *COL1A2*, ассоциированная с типом VIIB синдрома Элерса–Данло, что подтвердило диагноз.

Интерпретация результатов секвенирования в случае идентификации вероятно патогенной мутации представляет более сложную задачу. Требуется оценить эффект идентифицированного нуклеотидного варианта путем использования моделей предсказания in silico, повторно проанализировать и сравнить клиническую симптоматику у пробанда с клинической картиной, обусловленной мутацией данного гена, определить сегрегацию мутации у больных и здоровых членов семьи.

При обследовании девочки Г. в возрасте 4 лет (спорадический случай в семье), выявлены задержка нервно-психического развития, нарушение поведения, симптоматическая эпилепсия. Обращено внимание на высокие массо-ростовые показатели и фенотипические особенности: макроцефалия, выступающие лобные бугры, антимонголоидный разрез глаз, голубые склеры, высокое нёбо, крупные кисти и стопы. Сделано заключение о наличии генетического синдрома, сопровождающегося высокорослостью и нарушением нервно-психического развития. Дифференциальный диагноз предложено проводить с синдромами Сотоса 1 и 2, Вивера, Беквита–Видемана, Симпсона–Голаби 1 и 2. Согласно результатам секвенирования у ребенка идентифицирована вероятно патогенная (не синонимичная замена), отсутствующая в базах данных мутация гена *NSD1* в гетерозиготном состоянии. Мутации в этом гене ассоциированы с аутосомно-доминантным синдромом Сотоса 1. Патогенные варианты в генах других вышеперечисленных синдромов не найдены. Для подтверждения клинической значимости новой, ранее незарегистрированной мутации гена *NSD1* рекомендовано обследование родителей. Отсутствие у обоих родителей выявленной у пробанда нуклеотидной замены косвенно подтверждает диагноз, наличие этого варианта исключает его связь с заболеванием девочки.

Сложности представляет интерпретация данных NGS при выявлении гетерозиготных мутаций в генах, дефекты которых ведут к заболеваниям, наследующимся аутосомно-рецессивно. На наш взгляд, в такой ситуации при трактовке результатов главную роль играет оценка клинической картины у пациента, в некоторых случаях требуется дополнительное обследование ребенка.

У девочки Г. в возрасте 1,5 лет на основании результатов неонатального скрининга был установлен диагноз: фенилкетонурия. При исследовании гена *PAH* (ассоциирован с фенилкетонурией, обусловленной дефицитом фенилаланингидроксилазы), мутации не найдены (ФГБНУ МГНЦ). Несмотря на диетическое лечение, у ребенка появились признаки задержки развития, мышечная дистония, гиперкинетические приступы. Это указывало на наличие редко встречающейся биоптериндефицитной (кофакторной) фенилкетонурии, которая является гетерогенным заболеванием с возможным дефектом одного из 4 генов [9]. При секвенировании выявлена вероятно патогенная, отсутствующая в базах данных мутация (не синонимичная замена) гена *QDPR* в гетерозиготном состоянии. Вторая мутация не найдена. Гомозиготные мутации в указанном гене ведут к биоптериндефицитной фенилкетонурии, обусловленной дефицитом дигидроптеридинредуктазы. На основании клинических данных и при учете результатов NGS ребенку установлен диагноз биоптериндефицитной фенилкетонурии. В соответствии с диагнозом осуществлена коррекция лечения: диетотерапия дополнена назначением кофакторной и промедиаторной терапии, что привело к очевидной положительной динамике состояния девочки. Для поиска второй мутации рекомендовано таргетное исследование гена *QDPR*.

В некоторых случаях возникает сложная ситуация, когда выделенные при NGS-тестировании мутации генов совершенно не соответствуют клиническому фенотипу пробанда и предполагаемому диагнозу. При этом также требуются тщательная повторная оценка клинической картины у больного ребенка и пересмотр результатов биоинформатического анализа.

У наблюдавшихся нами сестер З. 5 и 3 лет (родители и другие сибсы здоровы) при обследовании были выявлены низкорослость, задержка психоречевого и статико-моторного развития, нарушение походки (невозможность ходьбы у старшего сибса), деформация нижних конечностей и поясничного отдела позвоночника. При рентгенографии были установлены рахитоподобные изменения трубчатых костей, в крови определялись высокий показатель щелочной фосфатазы, низкий уровень кальция и фосфора. Решено проводить дифференциальный диагноз между гетерогенными формами витамин D-зависимого и гипофосфатемического рахита с аутосомно-рецессивным типом наследования.

По результатам секвенирования были выделены мутации (в гетерозиготном состоянии) генов *POMK* и *PNPLA2*, вызывающие аутосомно-рецессивные заболевания – дистрофиногликанопатию и болезнь накопления липидов с миопатией соответственно. Вторые мутации указанных генов не найдены, мутации генов витамин D-зависимого и гипофосфатемического рахита не обнаружены.

Повторное клиническое обследование больных детей дало основание сделать заключение об отсутствии у них заболеваний, связанных с дефектами генов *POMK* и *PNPLA2*. Установлен клинический диагноз: витамин D-зависимый рахит (тип IIA?). Для

молекулярного подтверждения диагноза рекомендовано таргетное исследование гена *VDR*.

Заключение

NGS представляет эффективный метод молекулярно-генетической диагностики, позволяющий осуществлять исследование большой группы генов. Проведение NGS целесообразно прежде всего при наличии у пациента НЗ, отличающегося генетической гетерогенностью, когда нет возможности четко определить ген для таргетного исследования. При анализе данных секвенирования следует учитывать ограничения метода – отрицательные результаты не могут исключить предполагаемый диагноз и наличие генетической мутации.

Трудности интерпретации данных NGS возникают нередко, особенно при выявлении новых, ранее незарегистрированных мутаций, при обнаружении только одной гетерозиготной мутации в случае аутосомно-рецессивного заболевания. В сложных ситуациях требуется дополнительная оценка клинического фенотипа пробанда и биоинформатических результатов. Это подчеркивает необходимость тесного сотрудничества специалистов в области лабораторной диагностики, биоинформатического анализа и генетиков-клиницистов.

Источник финансирования: *исследование проведено в рамках финансирования Госзадания «Анализ клинико-генетического полиморфизма инвалидизирующих моногенных заболеваний у детей для прогнозирования их течения и определения молекулярных мишеней для оптимизации лечения» AAAA-A18-118051790107-2.*

Конфликт интересов: *авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.*

Nikolaeva E.A. 0000-0001-7146-7220
Voinova V.Yu. 0000-0001-8491-0228
Semyachkina A.N. 0000-0002-4026-3791
Yablonskaya M.I. 0000-0002-7233-4048

Литература

1. *McCandless SE, Brunger JW, Cassidy SB.* The burden of genetic disease on inpatient care in a children's hospital. Am. J. Hum. Genet. 2004; 74 (1): 121–127.

2. *Nathaniel RH.* It does matter: The importance of making the diagnosis of a genetic syndrome. Curr. Opin. Pediatr. 2006; 18 (6): 595–597.

3. *Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, Church DM, Crolla JA, Eichler EE, Epstein CJ, Faucett WA, Feuk L, Friedman JM, Hamosh A, Jackson L, Kaminsky EB, Kok K, Krantz ID, Kuhn RM, Lee C, Ostell JM, Rosenberg C, Scherer SW, Spinner NB, Stavropoulos DJ, Tepperberg JH, Thorland EC, Vermeesch JR, Waggoner DJ, Watson MS, Martin CL, Ledbetter DH.* Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. Am. J. Hum. Genet. 2010; 86 (5): 749–764.

4. *Stavropoulos DJ, Merico D, Jobling R, Bowdin S, Monfared N, Thiruvahindrapuram B, Nalpathamkalam T, Pellecchia G, Yuen RKC, Szego MJ, Hayeems RZ, Shaul RZ, Brudno M, Girdea M, Frey B, Alipanahi B, Ahmed S, Babul-Hirji R, Porras RB, Carter MT, Chad L, Chaudhry A, Chitayat D, Doust SJ, Cytrynbaum C, Dupuis L, Ejaz R, Fishman L, Guerin A, Hashemi B, Helal M, Hewson S, Inbar-Feigenberg M, Kannu P, Karp N, Kim R, Kronick J, Liston E, MacDonald H, Mercimek-Mahmutoglu S, Mendoza-Londono R, Nasr E, Nimmo G, Parkinson N, Quercia N, Raiman J, Roifman M, Schulze A, Shugar A, Shuman C, Sinajon P, Siriwardena K, Weksberg R, Yoon G, Carew C, Erickson R, Leach RA, Klein R, Ray PN, Meyn MS, Scherer SW, Cohn RD, Marshall CR.* Whole-genome sequencing expands diagnostic utility and improves clinical management in paediatric medicine. N.P.J. Genom. Med. 2016; 1: 15012.

5. *Thiffault I, Lantos J.* The challenge of analyzing the results of next-generation sequencing in children. Pediatrics. 2016; 137 (Suppl. 1): S3–7.

6. *Шагам Л.И., Воинова В.Ю.* Возможности и ограничения высокопроизводительного секвенирования в диагностике моногенных заболеваний. Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2016; 61 (2): 105–109.

7. *Bowdin S, Gilbert A, Bedoukian E, Carew C, Adam MP, Belmont J, Bernhardt B, Biesecker L, Bjornsson HT, Blitzer M, D'Alessandro LC, Deardorff MA, Demmer L, Elliott A, Feldman GL, Glass IA, Herman G, Hindorff L, Hisama F, Hudgins L, Innes AM, Jackson L, Jarvik G, Kim R, Korf B, Ledbetter DH, Li M, Liston E, Marshall C, Medne L, Meyn MS, Monfared N, Morton C, Mulvihill JJ, Plon SE, Rehm H, Roberts A, Shuman C, Spinner NB, Stavropoulos DJ, Valverde K, Waggoner DJ, Wilkens A, Cohn RD, Krantz ID.* Recommendations for the integration of genomics into clinical practice. Genet. Med. 2016; 18 (11): 1075–1084.

8. *Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL;* ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. 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; 17: 405–424.

9. *Николаева Е.А., Яблонская М.И., Харабадзе М.Н., Давыдова Ю.И., Комарова О.Н., Новиков П.В.* Диагностика и лечение биоптерин-дефицитной гиперфенилаланинемии. Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2015; 60 (2): 61–71.