

**ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ КОЛЬЦЕВЫХ МОЛЕКУЛ ДНК Т- И
В-КЛЕТОЧНОГО РЕЦЕПТОРА (TREC/KREC) У НОВОРОЖДЕННЫХ
РАЗЛИЧНОГО ГЕСТАЦИОННОГО ВОЗРАСТА**

¹ГУ «РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии», г. Минск, Беларусь;

²ГУ «РНПЦ «Мать и дитя», г. Минск, Беларусь

В данном исследовании были определены границы нормальных значений TREC и KREC в периферической крови 58 здоровых доношенных новорожденных. Количество копий TREC составило 3383 – 238848 копии ($Q_1 \div Q_3$), KREC: 2729 – 236953 копии на 1 млн лейкоцитов ($Q_1 \div Q_3$). Исследовано влияние гестационного возраста 117 новорожденных, родившихся преждевременно (22,5-37,8 недель), на количество данных маркеров. Показано, что количество как TREC, так и KREC возрастало с увеличением гестационного возраста. Выявлено, что вес как доношенных, так и недоношенных новорожденных различной гестационной зрелости не влияет на количество TREC и KREC.

Ключевые слова: новорожденные, Т- и В-клеточный рецептор, TREC, KREC, ПЦР в реальном времени

Введение

Состояние иммунитета новорожденно-го определяет выраженность адаптивных реакций. Иммунная система является одним из важнейших механизмов адаптации организма, направленным на поддержание гомеостаза. Новорожденные, в особенности недоношенные со сроком гестации менее 37 недель, подвержены высокому риску инфекционной патологии, которая является основной причиной смертности ввиду незрелости врожденного и адаптивного звеньев иммунитета [1-4]. Данные проявления иммунодефицита описаны в литературе как «физиологические», однако, важным этапом является разграничение врожденного патологического процесса, выражаемого «сбоем» иммунной системы, от физиологического состояния иммунитета в периоде новорожденности [5-6].

Дифференцировать данные состояния возможно путем количественного определения кольцевых молекул дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) Т- и В-клеточного рецептора TREC (от англ.

T-cell receptor excision circles) и KREC (от англ. kappa-deleting recombination excision circles), как суррогатных маркеров тимических мигрантов и/или наивных Т- и В-лимфоцитов.

TREC – кольцевые фрагменты ДНК, которые образуются в результате реаранжировки генов Т-клеточного рецептора во время процесса дифференцировки Т-лимфоцитов в тимусе. Важным условием для успешной перестройки альфа локуса является удаление дельта цепи Т-клеточного рецептора (ТКР). Делеция ТКР-дельта необходима в Т-клеточной дифференцировке и служит сигналом окончательного формирования $\alpha\beta$ ТКР. Удаление ТКР-дельта, как правило, происходит посредством специфической реаранжировки между δ Rec и Ψ Ja, что приводит к образованию специфических δ Rec- Ψ Ja TREC, которые обнаружены более, чем в 70% $\alpha\beta$ Т-лимфоцитов [7, с.610-611]. TREC не подвергаются дальнейшей репликации в делящихся клетках, таким образом представляют собой стабильные кольцевые фрагменты ДНК, которые являются сурро-

гатным маркером недавно образованных Т-лимфоцитов [7 с. 611]. В свою очередь, KREC являются продуктом рекомбинации генов В-клеточного иммуноглобулинового рецептора. В результате чего происходит удаление из генома клетки локуса Ig каппа (IGK) с образованием кольца, содержащего каппа-делецированный элемент – KREC [8, 9]. KREC также является косвенным маркером эффективности развития В-клеточного звена в онтогенезе иммунной системы.

Использование TREC и KREC нашло широкое применение при проведении пилотных исследований по скринингу новорожденных в Соединенных Штатах Америки (США), а также во многих европейских государствах. За пределами США скрининг новорожденных на лимфопению и первичный иммунодефицит (ПИД) проводится в Израиле, Норвегии, Швейцарии, Швеции, Финляндии, Германии, Исландии, Испании (Каталония), Италии (Тоскана), Китае, Тайване. Так к примеру, в Израиле в 2015-2017 годы было обследовано 290864 новорожденных, благодаря чему было выявлено 13 детей с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (ТКИН), тогда как в Тайване за 7 лет (2010-2017) было обнаружено 7 случаев ТКИН из 920398 новорожденных, подвергшихся скринингу, что отражает различный уровень заболеваемости ТКИН в разных странах [10-17].

Для того, чтобы определить наличие Т и/или В-клеточной лимфопении у новорожденного и отнести его к группе риска по ПИД, необходимо знать нормативные показатели TREC и KREC. Отклонения от нормативных значений – повод провести более детальное иммунологическое и молекулярно-генетическое обследование новорожденного. Границы нормальных популяционных значений количества копий TREC и KREC были разработаны в США, Иране, Чехии, а также в Российской Федерации (РФ) [10, 16]. В литературе существует множество вариантов диагностических значений TREC и KREC. Так, минимальный пороговый уровень для TREC колеблется от <25 до <250 копий различ-

ными методами определения [17, 18]. Для KREC конкретный пороговый уровень не установлен. По данным иранских авторов, в результате проведенного исследования определения количества копий TREC и KREC в разных возрастных группах (от 0 до 60 лет) количество копий TREC для новорожденных составило 246 копий/3 мм сухого пятна крови, для KREC это диапазон составил 81 копию/3 мм сухого пятна крови [19]. По данным чешских исследователей нижняя граница нормы TREC и KREC для новорожденных составила 1400 копий/1 мкл ДНК и 700 копий/1мкл ДНК соответственно [16]. Российские исследователи установили нормированные значения для новорожденных: TREC – 2690-2840 копий и KREC – 2700-2900 копий на 105 ядродержащих клеток [20].

В связи с наличием различных методик детекции и подсчета количества копий TREC и KREC, а также ограниченностью выборки, нами была поставлена задача установить диапазон физиологических значений для доношенных здоровых новорожденных и выявить, влияет ли гестационный возраст новорожденных детей на количество TREC и KREC. В настоящем исследовании мы использовали количественный метод, стандартизированный по количеству копий TREC/KREC на количество клеток.

Цель: Определить границы физиологических значений TREC и KREC в периферической крови здоровых доношенных новорожденных. Определить количество копий TREC и KREC у недоношенных новорожденных различной гестационной зрелости. Выявить возможную корреляционную взаимосвязь между количеством TREC/KREC и весом при рождении у доношенных и недоношенных новорожденных.

Материал и методы исследования

Пациенты

Были исследованы образцы периферической крови, взятой из пятки 58 здо-

ровых доношенных новорожденных: 32 мальчиков и 26 девочек сроком гестации от 38,5 до 41 недели, весом 2840-4290 г. Оценка по шкале Апгар не менее 8 на 1 минуте жизни. На момент рождения и в раннем неонатальном периоде ни у кого из детей не было зафиксировано инфекционных заболеваний. Для выявления влияния гестационного возраста на количество копий TREC и KREC в исследование были включены 117 недоношенных новорожденных: 70 мальчиков и 47 девочек сроком гестации 22,5-37,8 недель, весом 710-3020 г. Оценка по шкале Апгар для группы недоношенных новорожденных на первой минуте жизни составила $7,00 \pm 0,12$ баллов, на пятой минуте – $8,00 \pm 0,0$ балла. Количество копий TREC и KREC определялось методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени.

Периферическая кровь из пятки новорожденных была набрана методом «сухой капли» на фильтровальной бумаге типа TFN (MUNKTELL, Швеция). Все новорожденные проходили первичный осмотр на базе государственного учреждения «Республиканский научно-практического центр «Мать и дитя»» (ГУ «РНПЦ «Мать и дитя»»). На базе «Республиканского научно-практического центра детской онкологии, гематологии и иммунологии» всем новорожденным было выполнено определение количества TREC и KREC. Все исследования были проведены в рамках научно-исследовательской темы (НИР № госрегистрации 20191042, задание 02.01. «Разработать и внедрить метод отдельных нарушений, вовлекающих иммунный механизм у недоношенных новорожденных с использованием кольцевых молекул ДНК T- и B-клеточного рецептора (TREC/KREC)» при согласовании с Этическим комитетом ГУ «РНПЦ «Мать и дитя»»). На участие в исследовании было получено информированное согласие от родителей/законных представителей новорожденных детей.

Пробоподготовка материала для исследования

В качестве материала для исследования использовали геномную ДНК, выделенную из «сухого пятна» крови. Из пятна крови на фильтровальной бумаге выбивали 3 диска при помощи ручного дырокола и далее проводили выделение методом лизиса с дальнейшей фенол-хлороформной экстракцией. Концентрацию выделенной ДНК измеряли на спектрофотометре DeNovix (США). Качество ДНК определяли по показателям 260/280 и 230/260.

Определение количества копий TREC и KREC методом реакции ПЦР в «реальном времени»

Количество TREC и KREC определяли методом ПЦР с детекцией результатов в «режиме реального времени» на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США). В качестве внутреннего контроля использовали ген альбумин (ALB). Для количественной оценки копий TREC и KREC и контрольного гена ALB использовали серийные разведения линейаризированной плазмидной ДНК, содержащих вставки TREC, KREC и альбумин, соответственно, с концентрацией 102, 103, 104, 105 копий в 5 мкл. Данные анализировали с помощью программного обеспечения Real-time RCR Data Anals (Bio-Rad, США). Количество копий TREC/KREC рассчитывалось по формуле: $[1000000 \times \text{среднее TREC (KREC)}/\text{среднее ALB}/2]$.

Статистический анализ данных

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы «GraphPad Prizm 6.0». Выявление корреляционной взаимосвязи между событиями осуществлялось методом рангового корреляционного анализа по Спирмену. Корреляционную зависимость считали статистически значимой при r_s от 0,73 до 0,96; $p < 0,05$. Нормальность распределения данных в выборке проверяли при помощи критерия Шапиро-Уилка (Shapiro-Wilk's W-test), На основании варьирования показателя и за-

кономерности распределения использовали непараметрические методы представления данных в виде медианы и интерквартильного размаха ($Q_1 \div Q_3$). Значимость различий оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования

У 58 доношенных новорожденных было выполнено определение количества копий эписомальной ДНК Т-и В-клеточного рецептора TREC и KREC. Полученные значения варьировали в диапазоне для TREC от 2206 копий до 446 618 копий ($Me = 40538,5$), для KREC в диапазоне от 2012 до 298 778 ($Me = 20010$) копий на 1 млн клеток периферической крови, что показано на рисунке 1.

Далее был проведен расчёт диапазона нормальных значений. Данный диапазон охватывает 95% всех референтных значений полученных результатов. Количество копий TREC составило от 3383 до 238848 копии на 1 млн лейкоцитов ($Q_1 \div Q_3$). Количество KREC составило от 2729 до 236953 копии на 1 млн лейкоцитов ($Q_1 \div Q_3$). В исследованиях, опубликованных к настоящему времени, количество TREC и KREC пересчитывают как на мкл крови, 3 мм выбитого дыроколом пятна крови, так и на количество лейкоцитов. Мы сравнили полученные нами показатели с значениями TREC и KREC, полученных в исследованиях Гордукова М.А. и др. Так, рассчитанные показатели в РФ на количество ядродержащих клеток, отличаются несколько большими значениями: (TREC CI 95%: 2690-2840, KREC CI 95%: 2700-2900) копий на 105 ядродержащих клеток [20]. Однако в исследовании Гордукова М.А. и др. были проанализированы образцы крови 2739 новорожденных. В нашем исследовании по причине небольшой выборки истинно референтные значения не вычислялись.

С целью исследования влияния гестационного возраста на количественные показатели TREC и KREC было проведено исследование содержания этих маркеров в

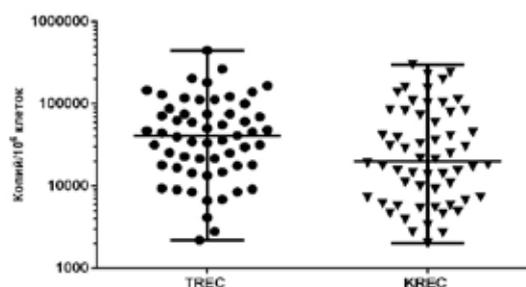


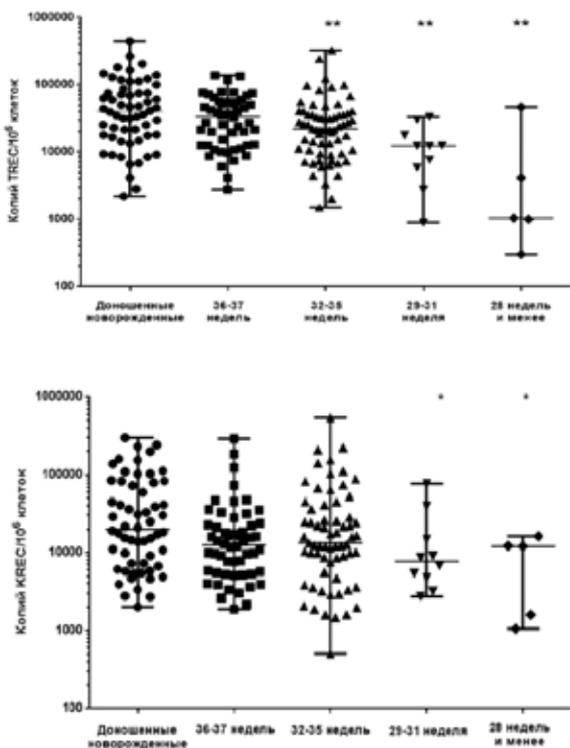
Рисунок 1 – Показатели диапазона полученных значений количества копий TREC и KREC на 1 млн лейкоцитов у доношенных новорожденных. Данные представлены в виде медианы, интерквартильного размаха, минимума-максимума значений

группах детей с различной гестационной зрелостью: 36-37 недель (детей 46, исследований 49), 32-35 недель (детей 58, исследований 65), 29-31 недели (детей 9, исследований 10), 28 недель и менее (детей 4, исследований 5). Полученные значения TREC варьировали в диапазоне от 301 копии до 324 520 копий на млн лейкоцитов ($Me = 23950,0$). Значения KREC варьировали в диапазоне от 504 копий до 540 080 копий на млн лейкоцитов ($Me=12339$). Как и в результатах, полученных другими исследователями (Дерябина и др., Kanegae M. et al., Vogel B. et al., Rechavi E. et al.), количество TREC нарастало с увеличением гестационного возраста новорожденных, что, вероятно, связано с пополнением пула Т-клеток по мере «созревания» иммунной системы новорожденного [12 с. 5, 21-24]. Так медиана значений TREC составила 1043 копии в группе недоношенных новорожденных 28 недели и менее, 12423 (29-31 недель), 22148 (32-35 недель), 34834 (36-37 недель), оставаясь значимо ниже ($p < 0,01$) у недоношенных новорожденных с 28 по 36 неделю гестации в сравнении с значениями TREC доношенных детей. Медиана KREC у детей 28 недели составила 12044 копии, 7759 (29-31 недель), 13254 (32-35 недель), 13931 (36-37 недель), оставаясь достоверно ниже у недоношенных детей с 28 недели и менее по 32 неделю ($p < 0,05$) в сравнении с доношенными детьми. Дан-

ная картина обусловлена тем, что во время онтогенеза плода перестройки генов иммуноглобулинов происходят раньше, чем перестройки генов ТКР, что согласуется с более ранним появлением В-лимфоцитов, чем Т-лимфоцитов в периферической крови плода (рисунок 2) [25].

Так же наблюдались значимые межгрупповые различия между новорожденными разного срока гестации: ТREC у детей 28 недели были ниже в сравнении с группами новорожденных 32-35 недель ($p < 0,02$), 36-37 недель ($p < 0,005$), в группе 29-31 недели значения были ниже по отношению к группе 32-35 недель ($p < 0,04$) и 36-37 недель ($p < 0,002$). Межгрупповых различий по количеству KREC выявлено не было.

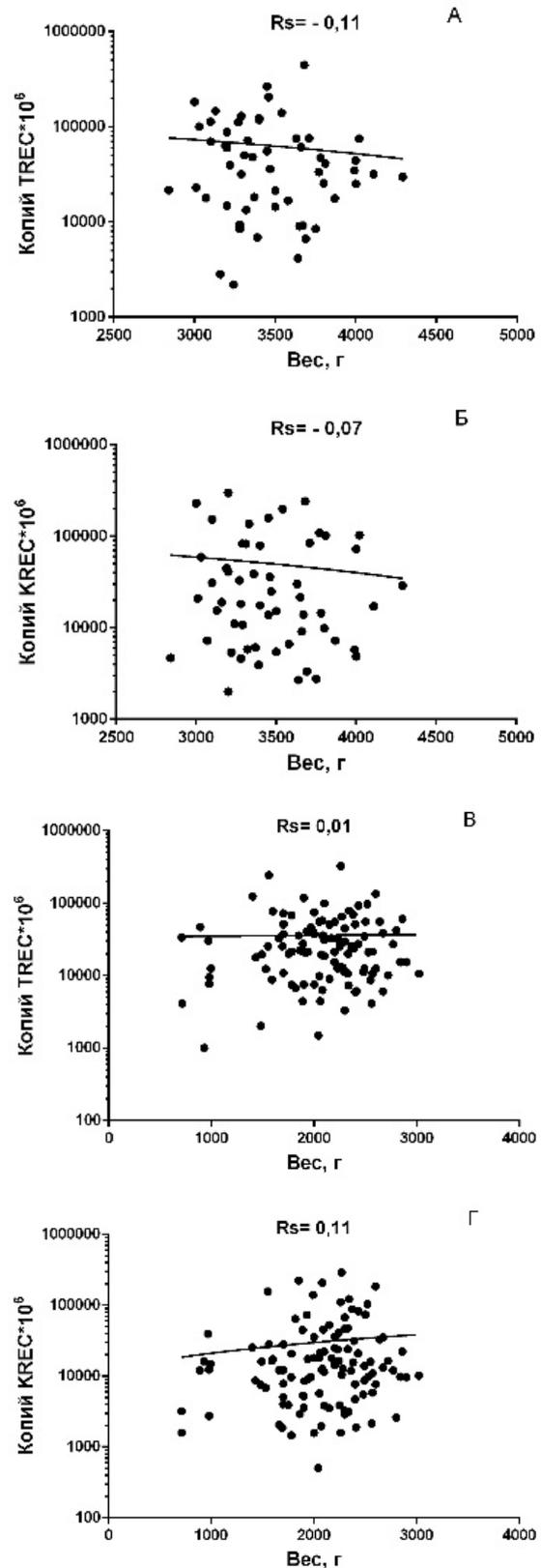
Методом корреляционного анализа по Спирмену не было выявлено влияния веса (рисунок 3) на ТREC и KREC как в группе



Данные представлены в виде медианы, минимума-максимума значений и интерквартильного размаха.

* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ по сравнению с группой доношенных новорожденных

Рисунок 2 – Количество копий ТREC и KREC в группах недоношенных новорожденных различной гестационной зрелости



А, Б – доношенные новорожденные, В, Г – недоношенные новорожденные различной гестационной зрелости.

Рисунок 3 – Влияние веса на количество ТREC и KREC в группах

доношенных новорожденных, так и в группе детей с неполным сроком гестации.

Заключение

По результатам проведенного исследования установлен диапазон физиологических значений TREC и KREC для здоровых доношенных новорожденных. Количество копий TREC составило от 3383 до 238848 копии на 1 млн лейкоцитов ($Q_1 \div Q_3$). Количество KREC составило от 2729 до 236953 копии на 1 млн лейкоцитов ($Q_1 \div Q_3$).

Основополагающим для исключения лимфопении и, как следствие, первичного иммунодефицита является минимальное значение каждого показателя, так как оно является определяющим для диагностики.

Определенный в данном исследовании диапазон значений TREC и KREC у здоровых детей может использоваться в качестве диагностических границ при лабораторном исследовании на наличие дефекта T- и B-клеточного звеньев иммунитета.

Установлено, что количество копий TREC и KREC нарастало с увеличением гестационного возраста.

У недоношенных новорожденных с 28 недели и менее по 36 неделю гестации медиана значений TREC достоверно ниже ($p < 0,01$) в сравнении со значениями TREC доношенных детей. С 36 недели уровень содержания TREC статистически не отличается от доношенных детей.

У недоношенных детей с 28 недели и менее по 32 неделю гестации значения KREC характеризуются достоверно низкими показателями ($p < 0,05$) в сравнении с доношенными детьми.

Не было выявлено влияние веса как доношенных, так и недоношенных новорожденных различной гестационной зрелости на величину значений TREC и KREC.

Библиографический список

1. Percentiles of Lymphocyte Subsets in Preterm Infants According to Gestational Age Compared to Children and Adolescents / S. Huenecke [et al.] // *Human Immunology*. – 2016. – № 84. – P. 291-297.

2. Melville, J.M. The immune consequences of preterm birth [Electronic resource] / J.M. Melville, T.J.M. Moss // *Frontiers in neuroscience*. – 2013. – № 49. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3659282/pdf/fnins-07-00079.pdf>. – Date of access: 31.07.2020.

3. Durandy A. Ontogeny of the immune system. / A. Durandy // *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. – 2003. – № 30. – P. 222-227.

4. Innate immunity in human newborn infants: prematurity means more than immaturity / T. Strunk [et.al.] // *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*. – 2011. – № 24. – P. 25-31.

5. Особенности врожденного и адаптивного иммунитета недоношенных детей с тяжелым гипоксически-ишемическим поражением центральной нервной системы / Л.С. Устьянцева [и др.] // *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. – 2017. – Т. 62, № 3. – С. 59-65.

6. Снимщикова, И.А. Курс лекций по прикладной иммунологии: учеб. Пособие / И.А. Снимщикова. – Орел: Орловский гос. мед. ун-т, 2015. – 120 с.

7. Puck, J.M. Laboratory technology for population-based screening for severe combined immunodeficiency in neonates: The winner is T-cell receptor excision circles / J.M. Puck // *J Allergy Clin Immunol*. – 2012. – Vol. 129. – P. 607-616.

8. Verbsky, J. The Wisconsin approach to newborn screening for severe combined immunodeficiency/ J. Verbsky, M. Thakar, J. Routes // *Journal of allergy and clinical immunology*. – 2012. – Vol. 129. – P. 622-627.

9. Serana, F. Use of V(D)J recombination excision circles to identify T- and B-cell defects and to monitor the treatment in primary and acquired immunodeficiencies / F. Serana, M. Chiarini, C. Zanotti // *Journal of translational medicine*. – 2013. – Vol. 11. – P. 1-11.

10. Newborn screening for severe combined immunodeficiency in 11 screening programs in the United States / A. Kwan [et al.] // *JAMA*. – 2014. Vol. 312. – P. 729-738.

11. Incidence of severe combined immunodeficiency through newborn screening in a Chinese population / Y.H. Chien [et al.] // Journal Formos Medical Association. – 2015. – Vol. 114. – P. 12-16.
12. First Year of Israeli Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency – Clinical Achievements and Insights [Electronic resource] / E. Rechavi [et al.] // Frontiers Immunology. – 2017. – Vol. 8. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5682633/> – Date of access: 31.07.2020.
13. Newborn screening for severe combined immunodeficiency in Taiwan / Y.-H. Chien [et al.] // International Journal of Neonatal Screening. – 2017. – Vol. 3. – P. 1-12.
14. Nourizadeh, M. Newborn screening using TREC/KREC assay for severe T and B cell lymphopenia in Iran / M. Nourizadeh, L. Shakerian, S. Borte // Scandinavian Journal of Immunology. – 2018. Vol. 88. – P. 1-9.
15. First Universal Newborn Screening Program for Severe Combined Immunodeficiency in Europe. Two-Years' Experience in Catalonia (Spain) [Electronic resource] / A.A. Ramírez [et al.] // Frontiers in Immunology. – 2019. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6818460/pdf/fimmu-10-02406.pdf>. – Date of access: 31.07.2020.
16. Universal newborn screening for severe combined immunodeficiency [Electronic resource] / M. van der Burg [et al.] // Frontiers in Pediatrics. – 2019. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6759820/pdf/fped-07-00373.pdf>. – Date of access: 31.07.2020.
17. The TREC/KREC Assay for the Diagnosis and Monitoring of Patients with DiGeorge Syndrome [Electronic resource] / E. Froňková [et al.] // PLOS ONE. – 2014. – Vol. 8. – №12. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4259354/pdf/pone.0114514.pdf>. – Date of access: 1.08.2020.
18. Thymic output: a bad TREC record / M.D. Hazenberg [et al.] // Nature immunology. – 2003. – Vol.4. – P. 97-99.
19. Determining Laboratory Reference Values of TREC and KREC in Different Age Groups of Iranian Healthy Individuals / L. Shakerian [et al.] // Iranian Journal of Allergy Asthma and Immunology. – 2019. – Vol. 2. – № 18. – P. 143-152.
20. Определение референсных интервалов TREC и KREC для скрининга новорожденных с иммунодефицитными состояниями в РФ / М.А. Гордукова [и др.] // Медицинская иммунология. – 2019. – Т. 21, № 3. – С. 527-538.
21. Neonatal screening for severe combined immunodeficiency in Brazil / M Kane-gae [et al.] // Jornal de Pediatria. – 2016. – № 92. – P. 374-380.
22. Newborn Screening for SCID in New York State: Experience from the First Two Years [Electronic resource] / B.H. Vogel [et al.] // Journal of Clinical Immunology. – 2014. – № 3. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4090801/pdf/nihms595483.pdf>. – Date of access: 1.08.2020.
23. Дерябина, С.С. Определение нормативных значений TREC и KREC в сухих пятнах крови новорожденных разного срока гестации в Свердловской области / С.С. Дерябина, И.А. Тузанкина, В.Н. Шершнеv // Медицинская иммунология. – 2018. – Т. 20, № 1. – С. 85-98.
24. Timely and spatially regulated maturation of B and T cell repertoire during human fetal development [Electronic resource] / E. Rechavi [et al.] // Science Translational Medicine. – 2015. № 276. – Mode of access: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25717098/> – Date of access: 04.08.2020.
25. Zelm, M.C. Replication history of B lymphocytes reveals homeostatic proliferation and extensive antigen-induced B-cell expansion / M.C. Zelm, M. van der Burg, J.J. M. van Dongen // The Journal of experimental medicine. – 2007. – Vol. 204. – P. 645-655.

**E.A. Polyakova, D.V. Ostrousko, M.V. Stegantseva,
I.E. Guryanova, Y.V. Tsimokhava, M.V. Belevtsev**

**EVALUATION OF THE CONTENT OF CIRCULAR DNA
MOLECULES T- AND B-RECEPTOR (TREC / KREC) IN
NEWBORNS OF DIFFERENT GESTATIONAL AGES**

In this study, the normal range of TREC and KREC in the peripheral blood of 58 healthy full-term infants was determined. The number of TREC copies was 3383-238848 copies (Q_1 - Q_3), KREC 2729-236953 copies per 1 million leukocytes (Q_1 - Q_3). The influence of the gestational age of 117 newborns born prematurely (22,5-37,8 weeks) on the number of these markers was studied. It was shown that the amount of both TREC and KREC increased with increasing gestational age. It was revealed that the weight of both full-term and premature newborns of different gestational maturity affects the number of TREC and KREC.

Key words: *newborn, T- and B-cell receptor, TREC, KREC, real-time PCR*