



Кольцевые молекулы T- и B-клеточного рецепторов (TREC/KREC) в дифференциальной диагностике первичных иммунодефицитов

УДК: 616-097-07:577.216.32/217.33

Аннотация. Снижение функциональных T- и B-лимфоцитов служит диагностическим критерием для первичных иммунодефицитов. Кольцевые структуры TREC и KREC используются для выявления лимфопении T- или B-клеток у новорожденных. Авторами показано, что количество TREC и KREC снижено либо не детектируется при тяжелых комбинированных иммунодефицитах, синдроме Ниймеген и атаксии – телеангиоэктазии, что сопоставимо с результатами иммунофенотипирования. У пациентов с агаммаглобулинемией установлены низкие показатели KREC. При хронической гранулематозной болезни уменьшения показателей кольцевых молекул не наблюдалось. Статистически значимые различия по их уровням обнаружены при иммунной дисрегуляции, что связано с нарушением лимфоцит-рецепторного репертуара.

Ключевые слова: первичный иммунодефицит, кольцевые структуры TREC и KREC, иммунная дисрегуляция, синдром Ниймеген, лимфопения, агаммаглобулинемия.

Для цитирования: Полякова Е., Стёганцева М., Гурьянова И., Сакович И., Белевцев М. Кольцевые молекулы T- и B-клеточного рецепторов (TREC/KREC) в дифференциальной диагностике первичных иммунодефицитов // Наука и инновации. 2019. №8. С. 75–78. <https://doi.org/10.29235/1818-9857-2019-8-75-78>

Екатерина Полякова,

младший научный сотрудник лаборатории иммунологических исследований РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии; polyakovakat86@gmail.com

Мария Стёганцева,

научный сотрудник лаборатории генетических биотехнологий научного отдела РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии; stsegantsevam@gmail.com

Ирина Гурьянова,

научный сотрудник лаборатории иммунологических исследований РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии; guryanovairina1985@gmail.com

Инга Сакович,

младший научный сотрудник лаборатории иммунологических исследований РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии; Inga.sakovich@mail.ru

Михаил Белевцев,

заместитель директора по научной работе РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии, кандидат биологических наук; belevtsev_m@mail.ru

Первичные иммунодефициты (ПИД) – врожденные нарушения иммунной системы, обусловленные генетическими дефектами, которые приводят к тяжелым хроническим и часто опасным для жизни инфекционным и/или аутоиммунным процессам при несвоевременной диагностике и лечении. По последним данным международного союза иммунологических обществ (IUIS), насчитывается 354 наименования различных ПИД, которые определяются 344 генными дефектами с весьма разнообразным спектром фенотипических проявлений [1]. В основу классификации ПИД положено поражение того или иного звена иммунной системы. Более половины случаев связано с недостаточностью продукции антител, на долю ПИД с четко определенным синдромом приходится 12,9%, на аутовоспалительные заболевания – 7,1%, на комбинированные иммунодефициты, дефекты системы фагоцитоза и компонентов комплемента – по 5%, на болезни иммунной дисрегуляции – 2,9% [2].

Растущее с каждым годом количество пациентов с первичным иммунодефицитом свидетельствует о совершенствовании диагностики, активном внедрении в клиническую практику инновационных методик, а не о повышении заболеваемости. Так, инновационная технология секвенирования следующего поколения (NGS) дала возможность исследовать одновременно до 365 генов или целый экзом. Уменьшение времени и стоимости по сравнению со стандартным генетическим тестированием позволяет начинать лечение раньше.

Однако даже после множества вариантов генетических и клинических исследований большинство

случаев ПИД остается без диагноза. Согласно глобальному отчету о первичных иммунодефицитах 2018 г., диагностировано более 94 тыс. новых случаев заболевания: 7,38% – у пациентов в возрасте до 1 года, 17,4% – от 1 до 4 лет, 38,4% – от 5 до 19 лет (что говорит о проблеме ранней диагностики заболевания); около 40% детей погибает до постановки диагноза и начала терапии [1].

Наиболее сложный вариант ПИД – тяжелый комбинированный иммунодефицит (ТКИН), включающий около 14 независимых генетических состояний, каждое из которых приводит к серьезным дефектам клеточного и гуморального иммунитета. При этом наблюдается лимфопения с резким снижением относительного и абсолютного количества Т-лимфоцитов; уровень В-лимфоцитов может быть в норме или превышать ее, но их функция значительно нарушена, что требует дополнительного тестирования [3, 4].

Наряду с иммунофенотипированием в последнее десятилетие проводится скрининг новорожденных на ПИД с применением универсального маркера Т- и В-клеточных иммунодефицитов – TREC и KREC (T-cell receptor recombination excision circles, kappa-deleting recombination excision circle). Это так называемые эксцизионные кольца, образующиеся в результате реаранжировки генов Т- и В-клеточного рецептора, где часть генетического материала вырезается и остается в геноме, а часть замыкается в виде кольца и служит маркером соответствующих лимфоцитов [5–7]. TREC и KREC представляют собой нехромосомные участки ДНК, которые не реплицируются в процессе митоза, в результате чего TREC остается только в одной из дочерних клеток. Кольцевые структуры TREC и KREC характерны для наивных Т- и В-клеток периферической крови.

В 1998 г. Douek и соавт. впервые продемонстрировали, что TREC специфичен для наивных Т-клеток и описали их снижение – у здоровых людей возрастное и при ВИЧ-инфекции. В 2005 г. К. Чан и Дж. Пак (США) предложили использовать TREC в качестве скринингового теста на ТКИН. Первое пилотное исследование началось в 2008 г. в Штате Висконсин. Программа скрининга новорожденных на ПИД на основе TREC/KREC внедрена уже в 50 штатах США, благодаря чему ежегодно около 12 тыс. детей получают своевременное адекватное лечение [8, 9]. Данный метод позволяет оценить эффективность генерации лимфоцитов и пополнение пула периферических клеток со сформированным рецептором, распознающим антиген. Показана

целесообразность определения TREC для анализа поражений клеточного и гуморального звена иммунитета при ПИД [10–13]. Главные критерии, предъявляемые к скрининговому тесту: простота постановки, скорость получения результата, высокая производительность и дешевизна.

Цель настоящего исследования – оценить диагностическую значимость кольцевых структур TREC и KREC у пациентов с различными вариантами первичных иммунодефицитов.

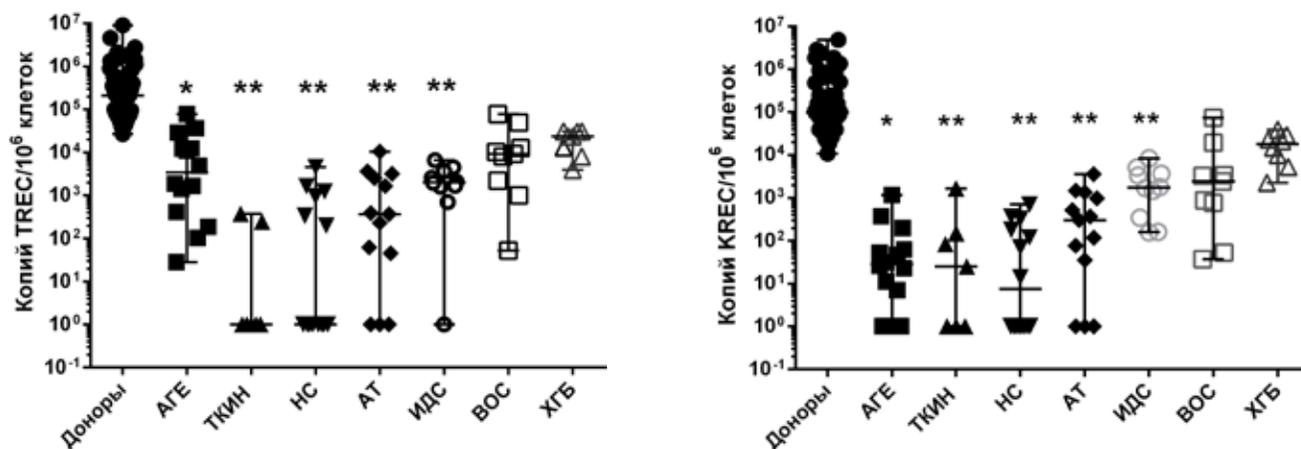
Объектом исследования послужили 75 образцов ДНК периферической крови 51 мальчика и 24 девочек (медиана возраста – 4,16 года) с установленным диагнозом «первичный иммунодефицит», которые проходили обследование в Республиканском научно-практическом центре детской онкологии и гематологии. У 7 пациентов диагностирован ТКИН, у 13 – атаксия–телеангиоэктазия, у 14 – синдром Ниймеген, у 14 – агаммаглобулинемия (АГЕ), у 8 – хроническая гранулематозная болезнь (ХГБ), у 9 – синдром Вискотта – Олдрича, у 10 – болезни иммунной дисрегуляции.

Для установления границы нормальных значений TREC и KREC были привлечены 53 донора периферической крови в возрасте от 1 дня до 15 лет (медиана 9 лет). За норму принималось содержание TREC более 1000 копий и KREC более 500 копий на 1 млн моноклеаров периферической крови [14].

На участие в исследовании от всех пациентов или их представителей было получено информированное согласие.

Субпопуляционный состав лимфоцитов определяли при помощи цитофлуориметра Navios (Великобритания) в соответствии со стандартной диагностической панелью: CD3+, CD3+HLA-DR+, CD4+CD8-, CD4-CD8+, CD19+, CD16+CD56+, CD3+CD16+CD56+, CD3+CD4+RA+, CD3+CD8+RA+. Дополнительно оценивали количество ранних тимических мигрантов (RTE) CD4+RA+CD31+. Использовали моноклональные антитела Xbio (Чехия).

Количество копий TREC и KREC определяли методом полимеразно-цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени на амплификаторе CFX96 (США). Матрицей служила геномная ДНК пациентов, внутренним контролем – ген альбумин (ALB). Для количественной оценки мишеней брали серийные разведения линеаризированной плазмидной ДНК со вставками TREC, KREC, альбумин соответственно с концентрацией 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^5 копий в 5 мкл. Число копий TREC



AGE – агаммаглобулинемия, **ТКИН** – тяжелый комбинированный иммунодефицит, **НС** – синдром Ниймеген, **АТ** – атаксия – телеангиоэктазия, **ИДС** – болезни иммунной дисрегуляции, **ВОС** – синдром Вискотта – Олдрича, **ХГБ** – хроническая гранулематозная болезнь

Рисунок. Медиана количества копий TREC (А) и KREC (Б) у доноров и пациентов с разными формами ПИД; * – $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

и KREC на 1 млн клеток рассчитывалось по формуле: $1000000 \times \text{среднее TREC (KREC)} / \text{среднее ALB/2}$.

Реакционная смесь состояла из 12,5 мкл Taq Man Master Mix (США), 6,25 мкл воды и стока праймеров с концентрацией 6 пмоль для прямого и обратного праймеров и 4 пмоль для флуоресцентной пробы. Постановка осуществлялась в дублях. Данные анализировались с привлечением программного обеспечения Real_time RCR Data Analysis.

Статистическую обработку проводили с помощью пакета Statistica 8.0. Для сравнения экспериментальных групп применяли критерий Манна – Уитни. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Полученные данные представлены на рисунке.

Включенные в исследование пациенты с ТКИН характеризовались разными фенотипами и имели мутации в генах IL-2RG, FOXN1, RAG1. Дефект в них блокирует развитие Т-лимфоцитов, что сопровождается Т-клеточной лимфопенией. Медиана значений TREC составила 0, KREC – 25 копий на 1 млн клеток периферической крови. У пациентов наблюдался глубокий дефицит Т- и В-клеток. Только у одного человека с иммунофенотипом Т+В-NK- количество CD3+ превышало норму (92,3%), однако это не говорит об их функциональной активности, что подтверждается низким содержанием копий TREC. Количество ранних тимических мигрантов CD4+CD45RA+CD31 также было низким (медиана – 5,9%). При сравнении количества тимических мигрантов и копий TREC установлена высокая прямая корреляция ($R=0,92$, $p < 0,05$). Обнаружена общая тенденция к крайне малым значениям

TREC у пациентов с ТКИН. Содержание копий TREC и KREC было достоверно меньше нормативных значений, определенных в контрольной группе здоровых доноров ($p < 0,01$).

У пациентов с агаммаглобулинемией Брутона, вызванной мутацией в гене ВТК, количество копий TREC было в норме (за исключением 4 исследуемых, у которых оно было меньше 1000). Поскольку этот дефект обусловлен дефицитом гуморального звена иммунитета вследствие блока дифференцировки В-лимфоцитов, у пациентов данной группы было менее 500 копий KREC (Me 24,5). Медиана процентного содержания В-лимфоцитов составила 0, абсолютного – $0,1 \times 10^9/\text{л}$. Различия уровней TREC и KREC по сравнению со здоровыми донорами статистически достоверные (см. рисунок).

В группе пациентов с синдромом Луи – Бар (дефект в гене ATM) и синдромом Ниймеген (дефект в гене NBN) количество копий TREC и KREC было достоверно ниже по сравнению с контрольной группой.

Мутации в генах ATM и NBN приводят к двуниевым разрывам ДНК в процессе рекомбинации генов иммуноглобулинов и Т-клеточного рецептора. Вследствие этого наблюдается снижение функциональной активности Т-клеток и нарушение антителообразования.

Среди наблюдаемых с дефектами репарации ДНК у 8 пациентов с синдромом Луи – Бар отмечалась Т-клеточная лимфопения. Медиана значений TREC на 1 млн клеток периферической крови составила 299 копий, KREC – 209. Медиана по относительному и абсолютному содержанию CD3+ лимфоцитов – 45,25%

и $0,81 \times 10^9$ /л, соответственно. В-клеточная лимфопения выявлена у 5 пациентов (Ме 4,6). Аналогичные результаты (снижение TREC и KREC) описаны в работах Kraus M. et al. и Kwan A. et al. [15].

При диагнозе «синдром Ниймеген» было низкое либо не детектируемое содержание копий как по мишени TREC, так и KREC (Ме 0 и 7 копий соответственно). Т-клеточная лимфопения наблюдалась лишь у 2 чел.: CD3+ (Ме 45,8%). Однако количество TREC и KREC было низким более чем в 70% случаев. Наивные CD4+ Т-лимфоциты меньше нормы (Ме 4,4). Похожие результаты получены и другими авторами: в проспективном исследовании группы пациентов с синдромом Ниймеген TREC были снижены у 63% пациентов, KREC – у 69% [16].

У 2 пациентов с синдромом Вискотта – Олдрича установлена выраженная лимфопения, медиана относительного количества Т-лимфоцитов CD3+ составила 43,5%. У 2 чел. с X-сцепленной тромбоцитопенией также наблюдается относительное уменьшение содержания CD3+ Т-лимфоцитов (Ме 45%). У 1 чел. было 52 копии TREC и еще у одного – 37 копий KREC на 1 млн клеток периферической крови, В-лимфоциты в норме. Достоверных различий нет. В литературе описано снижение TREC, однако результаты неоднозначные [17].

При хронической гранулематозной болезни субпопуляционный состав Т-лимфоцитов в пределах нормы, у 4 пациентов повышено относительное содержание CD19+ (Ме 32,1%). Медиана TREC – 23465 копий, KREC – 18012 копий на 1 млн клеток.

У обследуемых с болезнями иммунной дисрегуляции с мутациями в генах *AIRE*, *FAS* показатели Т- и В-лимфоцитов и TREC и KREC были в норме. Только у 1 пациента количество TREC (695 копий; $p=0,005$) и у 3 – KREC было снижено (Ме 344,0; $p=0,0012$). В работах, выполненных израильскими учеными, TREC и KREC при болезнях иммунной дисрегуляции были в диапазоне нормы, однако со временем снижались, что авторы связывали с клиническим иммунодефицитом [18].

Таким образом, нами установлено, что количество молекул TREC и KREC может служить критерием для предварительной дифференциальной диагностики первичного иммунодефицита, сопровождающегося нарушением неогенеза лимфоцитов. Так, для ТКИН, синдрома Ниймеген, атаксии – телеангиоэктазии характерен одновременный дефицит TREC и KREC, что подтверждается результатами иммунофенотипирования и характеризует

фенотипическое проявление данных заболеваний. Снижение или отсутствие KREC характерно для агаммаглобулинемии. Различия по анализируемым маркерам при иммунной дисрегуляции статистически значимые. Вероятно, это связано с генерацией аутореактивных Т-клеток, которые избегают селекции в тимусе. Описанная методика может быть рекомендована как надежный, простой и легко воспроизводимый скрининговый тест для обнаружения Т- и В-клеточной лимфопении. ■

■ **Summary.** The reduction of functional T- and B-lymphocytes serves as a diagnostic criterion for primary immunodeficiencies. The TREC and KREC circle structures have recently been used to detect T- or B-lymphopenia in newborns based on region-specific excision levels. Our studies show that the number of TREC and KREC is reduced or not detected in patients with severe combined immunodeficiency, Nijmegen syndrome and ataxia – telangiectasia, which is comparable with the results of immunophenotyping in these groups of patients. Low KREC values were found in patients with agammaglobulinemia, and in the group with chronic granulomatous disease, no decrease in the number of ring molecules was found. Statistically significant differences in the level of TREC and KREC were found in the group of patients with immune dysregulation diseases, which are associated with impaired immunity – the lymphocyte-receptor repertoire.

■ **Keywords:** primary immunodeficiency, TREC/KREC excision circles, immune dysregulation, Nijmegen syndrome, lymphopenia, agammaglobulinemia.

■ <https://doi.org/10.29235/1818-9857-2019-8-75-78>

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Global report on primary immunodeficiencies: 2018 update from the Jeffrey Modell Centers Network on disease classification, regional trends, treatment modalities, and physician reported outcomes / V. Modell, J. Orange, J. Quinn, F. Modell // Immunol. Research. 2018. Vol. 66, Iss. 3. P. 367–380. // <https://doi.org/10.1007/s12026-018-8996-5>.
2. Modell V. Primary immunodeficiencies worldwide: an updated overview from the Jeffrey Modell Centers Global Network / V. Modell, J. Quinn, J. Orange // Immunol. Research. 2016. Vol. 64. P. 736–753.
3. Population-based newborn screening for severe combined immunodeficiency: Steps toward implementation / J. M. Puck et al. // J. Allergy Clin. Immunol. 2007. Vol. 120. P. 760–768.
4. High-Throughput Multiplexed T-Cell – Receptor Excision Circle Quantitative PCR Assay with Internal Controls for Detection of Severe Combined Immunodeficiency in Population-Based Newborn Screening / L. Jacalyn et al. // Clin. Chemistry. 2010. Vol. 56. P. 1466–1474
5. Newborn screening for severe combined immunodeficiency and T-cell lymphopenia in California: results of the first 2 years / A. Kwan et al. // J. Allergy Clin. Immunol. 2013. Vol. 132. P. 140–150.
6. High-throughput multiplexed T-cell-receptor excision circle quantitative PCR assay with internal controls for detection of severe combined immunodeficiency in population-based newborn screening / J. L. Gerstel et al. // Clin. Chemistry. 2010. Vol. 56. P. 1466–1474.
7. Van Zelm M. C. PID comes full circles: applications of V(D)J recombination excision circles in research, diagnostics and newborn screening of primary immunodeficiency disorders / M. C. Van Zelm, van der Burg, J.M. van Dongen // Frontiers in Immunol. 2011. Vol. 2, N12. P. 1–7.
8. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection / D. C. Doue et al. // Nature. 1998. Vol. 396. P. 690–695.
9. Chan K. Development of population-based newborn screening for severe combined immunodeficiency / K. Chan, J. M. Puck // J. Allergy Clin. Immunol. 2005. N2. P. 391–398.
10. 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 / Serana F. et al. // J. Trans. Med. 2013. Vol. 11. N119.
11. Neonatal screening for severe primary immunodeficiency diseases using high-throughput triplex real-time PCR / S. Borte et al. // Blood. 2011. V.119, N11. P. 2552–2555.

Полный список использованных источников размещен на сайте

Статья поступила в редакцию 22.04.2019 г.

SEE http://innosfera.by/2019/08/circles_molecules