

*И. С. Задора*

## **TREC И KREC КАК БИОМАРКЕРЫ СЕПСИСА**

*Научный руководитель: д-р мед. наук, проф. Л. П. Титов\**

*Кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии,*

*Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск*

*\*РНПЦ «Эпидемиологии и микробиологии», г. Минск*

*I. S. Zadora*

## **TREC AND KREC AS BIOMARKERS OF SEPSIS**

*Tutor: professor L. P. Titov\**

*Department of Microbiology, Virology, Immunology,*

*Belarusian State Medical University, Minsk*

*\*RSPC «Epidemiology and microbiology», Minsk*

**Резюме.** Молекулы TREC, KREC стабильны, не дублируются в процессе митоза и являются показателем успешной перестройки ТКР и ВКР, что позволяет их использовать в качестве маркеров пролиферации лимфоцитов. Они широко используются в медицинской практике для оценки тяжести при различных иммунодефицитных состояниях.

**Ключевые слова:** TREC, KREC, сепсис, биомаркеры.

**Resume.** TREC and KREC molecules are stable, don't duplicate during mitosis, and are an indicator of successful rearrangement of TCR and BCR, which allows them to be used as markers of lymphocyte proliferation. They are widely used in medical practice to assess the severity of various immunodeficiency conditions.

**Keywords:** TREC, KREC, sepsis, biomarkers.

**Актуальность.** Несмотря на достигнутые к настоящему времени успехи в борьбе с гнойно-воспалительными заболеваниями, генетические и иммунофенотипические особенности сепсиса остаются недостаточно изученными. Сегодня около 30% всех случаев диагностированного сепсиса заканчиваются летальным исходом. Патофизиология данного заболевания многофакторна, и в развитии патологических процессов, сопутствующих сепсису, иммунная система принимает самое деятельное участие [1].

**Цель:** оценить перспективу использования лабораторных показателей TREC и KREC в диагностике сепсиса.

### **Задачи:**

1. Изучить механизм образования данных молекул.
2. Оценить их использование в медицинской практике.
3. Изучить особенности дисфункции иммунной системы при сепсисе.

**Материал и методы.** Проведен мета-анализ научных статей, посвященных изучению проблемы сепсиса и использования показателей TREC и KREC в медицинской практике. Поиск осуществлялся по медицинским базам данных PubMed, Elsevier, Cyberleninka в 2 направлениях: по предметным заголовкам (MeSH) с использованием ключевого слова «Sepsis» (14 статей), и по маркерам «TREC», «KREC» (12 статей, 3 автореферата диссертаций).

**Результаты и их обсуждение.** Поскольку TREC и KREC являются предшественниками клеточных рецепторов лимфоцитов необходимо кратко рассмотреть

активацию Т- и В-клеточных рецепторов. Т- и В-лимфоциты на ранних стадиях созревания экспрессируют генетически детерминированный ТКР и ВКР, а затем, в результате ферментативных механизмов, при генерации разнообразия рецепторов происходит реорганизация сегментов варибельных генов. Иммунный ответ В-лимфоцитов на антиген является клональным: отдельный клон предрасположен к ответу на один эпитоп антигена. Незрелые В-лимфоциты в костном мозге приобретают способность формировать специфический ВКР и синтезировать антитела посредством перестройки генов Ig тяжелой и легкой цепей V (variable), D (Diversity), J (Joining). При этом, гены иммуноглобулинов, в отличие от генов ТКР, подвергаются гипермутациям при активации антигеном [2].

*Механизм образования TREC, KREC.* Побочным продуктом Т-клеточной дифференциации является образование молекулы TREC (*T-cell receptor excision circles*). Во время перестройки TCRA локуса в большинстве незрелых Т-лимфоцитов происходит делеция TCRD локуса, находящегося внутри и фланкированного V и J сегментами. Этот процесс является специфичным и проходит при участии делеционных последовательностей  $\delta$ Rec и  $\Psi$ Ja. Иссекаемая ДНК циркуляризуется благодаря лигированию тупых сигнальных концов ДНК, тем самым образуя стабильные круглые продукты (рисунок 1а) [3].

На этапе пре-В лимфоцитов формируются молекулы KREC (*kappa deleting recombination excision circle*). Если перестройка прошла правильно, начинается рекомбинация в IGK локусе, кодирующем последовательности легкой каппа-цепи иммуноглобулинов. Она начинается слиянием Vk и Jk сегментов и в дальнейшем сопровождается рекомбинацией с участием интронной последовательности (Jк-Ск intronRSS) и каппа-делеционным элементом (Kde), что делает каппа-локус (IGK) нефункциональным и определяет исключение данного локуса, образуя таким образом круг эксцизии KREC (рисунок 1а) [4].

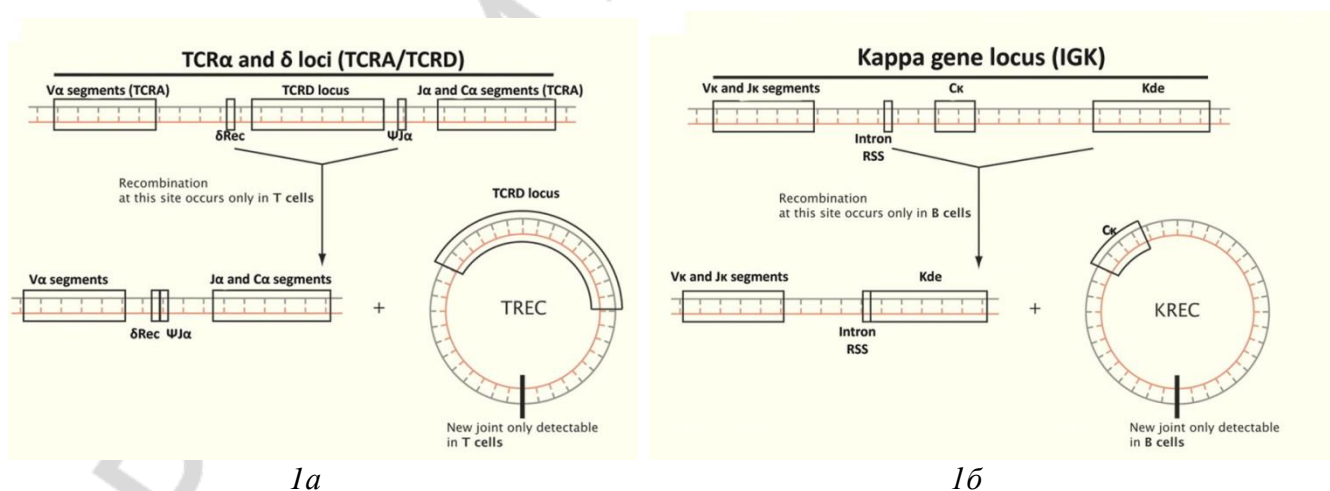


Рис. 1 – Схема образования TREC (1а) и KREC (1б)

*Использование маркеров в медицинской практике.* На сегодняшний день использование TREC и KREC в качестве диагностических маркеров для оценки пролиферации Т и В-лимфоцитов в педиатрической практике широко распространено по всему миру (таблица 1), а в некоторых штатах США данные показатели включены с скрининговую программу тестирования новорожденных на ТКИИ. Установле-

но, что уровни TREC снижаются с возрастом в связи с инволюцией тимуса, а уровни KREC стабильны.

**Табл. 1.** Использование показателей TREC, KREC в педиатрической практике

TREC	KREC
Первичные и комбинированные иммунодефициты	Дефекты созревания В-клеток, сочетанных (Т и В) иммунодефицитов
Костная дисплазия, неонатальный лейкоз	Х-сцепленная агаммаглобулинемия (ХЛА)
Делеция 14, 17 хромосомы, удвоение 17р хромосомы	ХЛА-подобные заболевания
Синдромы Нунана, Якобсена, Неймегена, Фринса, CHARGE	X
ВИЧ инфекция, аутоимунные заболевания	X

Существуют работы по оценке количества TREC [5] и при хронических патологиях: переменный неклассифицируемый иммунодефицит, кожная Т-клеточная лимфома, рассеянный склероз, ревматоидный артрит, бронхиальная астма, атопический дерматит (таблица 2). Количество копий TREC, KREC на 1 млн клеток или на 1 мл крови подсчитывают с помощью ПЦР в реальном времени. В качестве материала могут быть использованы свежие образцы периферической крови, «сухие пятна», а также мазки крови на гематологических стеклах.

**Табл. 2.** Сравнительная оценка значений TREC в популяциях CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов при хронических заболеваниях

TREC/10 <sup>6</sup> CD4+ ME у пациентов	TREC/10 <sup>6</sup> CD8+ ME у пациентов	TREC/10 <sup>6</sup> CD4+ ME у доноров	TREC/10 <sup>6</sup> CD8+ ME у доноров
Ревматоидный артрит			
1650 (n=30)	1500 (n=30)	3700 (n=15)	4200 (n=15)
Бронхиальная астма (больные менее 1 года)			
20 000 (n=17)	20 050 (n=17)	5550 (n=22)	7750 (n=22)
Бронхиальная астма (больные более 1 года)			
3880 (n=32)	3415 (n=32)	5550 (n=22)	7750 (n=22)
Атопический дерматит			
10 260 (n=26)	7400 (n=26)	13800 (n=22)	11850 (n=22)

Из приведенной таблице следует, что при хронических патологиях количество TREC-клеток среди CD4+ и CD8+ лимфоцитов по сравнению с донорами снижено, что указывает на больший вклад пролиферации периферических лимфоцитов в поддержание Т-клеточного пула. Одной из причин уменьшения уровня TREC в Т-лимфоцитах является клеточная пролиферация, обусловленная либо гомеостатическими механизмами, либо стимуляцией антигенами [5].

В различных источниках количественные показатели TREC и KREC у детей с иммунодефицитами (таблица 3) варьируют, что связано с особенностями диагностики, применяемых тестов и методик исследования, а также клинического диагноза [8].

**Табл. 3.** Количественные значения уровней TREC и KREC (копий на 104 лейкоцитов)

Группа наблюдения	Копий TREC/10 <sup>4</sup> лейкоцитов (МЕ)	Копий KREC/10 <sup>4</sup> лейкоцитов (МЕ)
Дети с иммунозависимой патологией (n=65)	276,4	88,6
Условно здоровые дети (n=52)	641,9	147,3

*Иммунная система при сепсисе.* Предполагалось, что ключевую роль в иммунопатогенезе сепсиса играет так называемый «цитокиновый шторм», возникающий при нарушении адекватного ответа системы комплимента при распознавании паттерн-рецепторов патогена с помощью TLR, что приводит к высвобождению большого количества цитокинов, а воздействие ЛПС бактерий на факторы врожденного иммунитета приводит беспорядочному выбросу хемоаттрактантов C3a и C5a. Т-лимфоциты секретируют цитокины, повышая пролиферацию и выживаемость В-лимфоцитов, тучных клеток, базофилов, нейтрофилов и макрофагов [2].

Активно развивается идея «компенсаторного противовоспалительного ответа», направленного на компенсацию чрезмерного провоспалительного процесса в первой фазе сепсиса. Одновременно с продукцией провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12, IFN $\gamma$ , вырабатываются и противовоспалительные цитокины – IL-4, IL-10, TGF $\beta$ . Однако, в большинстве случаев баланс теряется и развивается неконтролируемая воспалительная реакция с выходом на полиорганную недостаточность, присоединение оппортунистического заболевания («второй удар»). Вторая фаза сепсиса создает условия, при которых многие иммунокомпетентные клетки теряют свои свойства и погибают. Лимфоциты также теряют способность вырабатывать главные провоспалительные цитокины и увеличивают количество рецепторов для апоптоза. Т-лимфоциты, выделенные у пациентов, погибших от сепсиса, больше не способны активироваться в ответ на антиген. Это их состояние получило название «истощение Т-клеточного иммунитета», наблюдаемое во второй фазе сепсиса.

TREC и KREC это стабильные молекулы, которые не дублируются в процессе митоза и являются показателем успешной перестройки ТКР и ВКР, что позволяет их использовать в качестве маркеров пролиферации лимфоцитов. Количественное определение встречаемости sjTRECs (signal joint) в периферической крови позволяет установить число ранних тимических мигрантов, что в свою очередь является показателем эффективности функционирования тимуса. TREC обнаруживаются в ~70% Т лимфоцитов, а KREC в 50% В-лимфоцитов соответственно [6]. При нарушениях в процессе образования Т-клеток индуцируется апоптотическая гибель дефектных клеток, в следствии чего наблюдается снижение количества Т-лимфоцитов и низкое число TREC. Поскольку в фазах сепсиса наблюдается различное количество как Т- и В-лимфоцитов (активация провоспалительных цитокинов, пролиферация в первой фазе, а также глубокое угнетение пролиферативных процессов и апоптоз во второй фазе), то оценка количества TREC и KREC позволяет оценить процессы формирования и дифференцировки Т и В-лимфоцитов, изменения соотношения процессов тимопоэза и периферической экспансии в поддержании Т-клеточного пула на периферии при иммунопатологических заболеваниях. Посколь-

ку количество TREC коррелирует с числом именно наивных Т-лимфоцитов, вышедших в кровотоки, они являются лучшими предикторами серьезности возникшего иммунодефицита при сепсисе, чем общее количество Т-клеток.

Кроме этого, изучение данных показателей позволяет оценить являлся ли исходный иммунодефицит организма одной из причин развития сепсиса или это результат вторичного иммунодефицита в ответ на прямое или опосредованное воздействие патогенов на Т- и В-клетки в органах и крови [7]. Это позволяет говорить о возможной генетической предрасположенности и факторах риска развития сепсиса.

#### **Выводы:**

1. TREC и KREC представляют собой кольцевые молекулы образуются в ходе реаранжировки генов Т- и В-клеточного рецептора.

2. Данные молекулы стабильны, не дублируются в процессе митоза и широко используются в скрининге иммунодефицитов в педиатрической практике, а также при диагностике ряда хронических заболеваний.

3. Сепсис следует рассматривать как следствие существенных нарушений в иммунной системе, проходящих от «фазы гипервоспаления» к состоянию «иммунопаралича».

4. Количественный анализ кольцевых участков ДНК — TREC и KREC помогает определить степень дифференцировки, зрелость и активность Т и В лимфоцитов., что может использоваться в качестве предиктора тяжести состояния при сепсисе и септическом шоке с целью своевременной коррекции лечения.

#### **Литература**

1 Козлов, В.К. Дисфункция иммунной системы в патогенезе сепсиса / В.К. Козлов, Л.И. Винницкий // Общая реаниматология. – 2005. - № 1. – С. 65-75.

2 Титов, Л.П. Молекулярные механизмы активации Т-и В-лимфоцитов / В кн.: Современные проблемы инфекционной патологии человека. - Минск, 2001. – С.287-317.

3. Определение значений нормы TREC и KREC в периферической крови новорожденных / Любимова Н.Е., Останкова Ю.В., Семенов А.В. и др. // Медицинская иммунология. – 2015. – Т.17, №5. – С. 353.

4 Корсунский, И.А. Ранняя диагностика иммунодефицитных состояний у детей: клинические и лабораторные аспекты: автореф. дис. ... д-ра. мед. наук: 14.01.08, 14.03.09 / И.А. Корсунский. – Москва, 2019. – 47 с.

5 Блинова, Е.А. Количество TREC в периферических Т-лимфоцитах человека в норме и при иммунопатологических состояниях: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 14.03.09 / Е.А. Блинова. – Новосибирск, 2012. – 19 с.

6. Определение кольцевых структур ДНК Т-клеточного (TREC) и В-клеточного (KREC) рецептора как маркера эффективности функционирования иммунной системы / М.В. Стеганцева, А.М. Кустанович, С.О. Шарапова, [и др.] // Актуальные вопросы детской онкологии, гематологии и иммунологии : сб. науч. тр. Минск, 2012. - С. 206-214.

7 Титов, Л.П. Молекулярные основы иммунного ответа и их значение в борьбе с новыми и вновь возникающими инфекциями / Л.П. Титов // Смолевичи, 1997. – С.11-22.

8 Дерябина, С.С. Роль количественного определения кольцевых участков днк т-клеточного и в-клеточного рецепторов лимфоцитов в оценке функционирования иммунной системы новорожденных и детей первого года жизни: автореф. дис. ... канд.биол.наук: 14.03.09 / Дерябина С.С. – Челябинск, 2017. – 23 с.