

**ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КОЛЬЦЕВЫХ МОЛЕКУЛ ДНК (ТРЕС)
ДЛЯ ОЦЕНКИ Т-КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ИММУНИТЕТА ПАЦИЕНТОВ
С ПЕРВИЧНЫМ ИММУНОДЕФИЦИТОМ**

М.В. Стёганцева, И.Е. Гурьянова, И.С. Сакович, А.М. Кустанович, С.О. Шарпова

Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии

Первичные иммунодефициты (ПИД) — группа заболеваний, в основе которых лежат врожденные генетически детерминированные нарушения функций иммунной системы. В настоящее время описано уже более 140 генетических дефектов, определяющих развитие различных форм ПИД. Распространенность ПИД по данным Европейского Общества по Первичным Иммунодефицитам (ESID), составляет один случай на 25000–100000 населения [1]. Диагностика ПИД на сегодняшний день затруднена в связи с высокой гетерогенностью симптомов и молекулярно-генетических характеристик. В то время как множество генетических дефектов идентифицировано, постановка молекулярного диагноза для многих пациентов затруднена [2]. Различные варианты генетических нарушений в генах, ответственных за развитие заболевания, могут привести к разнообразным клиническим проявлениям [3]. В связи с этим необходим новый дополнительный метод для ранней идентификации заболевания и собственно диагностики с возможностью оценки вероятных осложнений.

Один из новых разработанных методов включает подсчет кольцевых молекул ДНК, которые образуются на ранних стадиях созревания лимфоцитов в процессе реаранжировки уникального Т- и В-клеточного рецептора. Процесс перестройки генов рецептора осуществляется за счет двухцепочечных разрывов ДНК, вносимых RAG1 и RAG2 на границе двух генных сегментов, окруженных сигнальной последовательностью рекомбинации. Образующиеся последовательности генных сегментов лигируются с образованием кодирующего и сигнального соединений, последнее из которых замыкается в кольцо. Это стабильные продукты, которые не реплицируются в клетке, не дублируются в процессе митоза и соответственно разводятся в процессе клеточного деления, в то время как специфический рецептор наследуется дочерними клетками [4].

Материал и методы. Объектом исследования послужили образцы ДНК костного мозга и периферической крови 41 пациента с диагнозом «первичный иммунодефицит». Информация о пациентах представлена в таблице.

Таблица

Имунофенотипическая и молекулярно-генетическая характеристика пациентов с врожденным иммунодефицитом

Диагноз	Количество пациентов	Медиана возраста, годы	Имунофенотип	Молекулярный диагноз*
Атипичный Т (low) В+ ТКИН	5	1,175	Т+В+НК+, Т-В+НК+	IL7-R
Атипичный Т (low) В- ТКИН	5	3,05	Т+В-НК+	RAG1
Классический Т-ТКИН	4	0,175	Т-В-НК-, Т-В+НК+	Jak3, CD132, g-IL-2, IL7-R
Оменн синдром (Т+) ТКИН	2	0,1	Т+В+НК+	RAG1, IL7-Ra
Синдром Ди-Джорджи	1	НВ**	НВ	НВ
NBS	15	6,5	НВ	NBS1
НВ	9	НВ	НВ	НВ

Примечание — *Указаны гены, в которых найдены патогенетические мутации/полиморфизмы. Каждый из пациентов имеет дефекты только в одном гене; **не выявлено.

Клетки для проточной цитофлюориметрии выделяли на градиенте плотности Nystopaque и помещали в пробирки с фосфатно-солевым буфером для последующего окрашивания. Клетки для молекулярно-генетического анализа выделяли методом осмотического лизиса эритроцитов. ДНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции.

Проточная цитофлюориметрия. Периферические мононуклеары окрашивали для подсчета целевых клеточных популяций: CD3+CD4+ (Т-хэлперы) и CD4+CD45RA+CD31+ (тимические мигранты). Окрашивание было произведено с использованием CD4+ — конъюгированный PC-5, CD45RA+ — конъюгированный флюоресцеин (FITC), CD31+ — конъюгированный фикоэритрин (PE) (Beckman coulter). Также в рамках первичной диагностики было произведено иммунофенотипирование пациентов в рамках расширенной панели клеток.

APPLICATION PROSPECTS OF CIRCULAR DNA MOLECULES (TREC) TO EVALUATE T-CELL IMMUNITY IN PATIENTS WITH PRIMARY IMMUNODEFICIENCY

M.V. Stsiohantsava, A.E. Hurianova, I.S. Sakovich, A.M. Kustanovich, S.O. Sharapova

This article deals with the quantification assay of TREC copy number by RQ-PCR to assess the functioning of T-cell immunity. TRECs are T-cell receptor excision circles which are formed during T-cell receptor gene rearrangement process. They determine early forms of T-cells. We found that only recent thymic emigrants (CD4+CD45RA+CD31+) and naïve T-cells (CD4+CD45+CD31-) contain TREC. We analysed 44 patients with different primary immune disorders (PID). It was found out that patients with PID have dramatically decreased level of TRECs ($p=0.01$). Also there was high correlation between TREC and RTE number ($R=0.89$; $p<0.05$). Estimation of TRECs is cheap, simple and fast method for identification of thymic output. It can be used in the cases when immunophenotyping is impossible and for neonatal screening of innate immune system defects.

Литература

1. ESID Online Database for Primary Immunodeficiency Diseases User Manual. Version 3. — 2011. — P. 1–25.
2. PID comes full circle: applications of V(D)J recombination excision circles in research, diagnostics and newborn screening of primary immunodeficiency disorders / M.C. Zelm [et al.] // Front. Immunol. — 2011. — Vol. 2. — P. 1–9.
3. Artemis spliced effects cause atypical SCID and can be restored in vitro by an antisense oligonucleotide / I.J. Speert [et al.] // GenesImmun. — 2011. — Vol. 16. — P. 1036–1044.
4. Replication history of B lymphocytes reveals homeostatic proliferation and extensive antigen induced B-cell expansion / M.C. Zelm [et al.] // J. Exp. Med. — 2007. — Vol. 204. — P. 645–655.
5. Test Definition: TREC T-Cell Receptor Excision Circles (TREC). Analysis for Immune Reconstitution / Mayo Clinic.