

ТРЕСИКРЕС КАК ГЕНЕТИЧЕСКИЕ БИОМАРКЕРЫ ХРОНИЧЕСКИХ ИММУНООБУСЛОВЛЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Задора И.С., Титов Л.П.*

Белорусский государственный медицинский университет,
кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии,
*ГУ «РНПЦ эпидемиологии и микробиологии», г. Минск

Ключевые слова: биомаркеры, TREC, KREC, иммунообусловленные заболевания.

Резюме: количественной анализ кольцевых участков ДНК — TREC и KREC помогает определить степень дифференцировки, зрелость и активность T и B лимфоцитов, что может использоваться в качестве предиктора тяжести состояния при хронических заболеваниях с целью своевременной коррекции лечения.

Resume: quantitative analysis of the ring sections of DNA — TREC and KREC helps to determine the degree of differentiation, maturity and activity of T and B lymphocytes, which can be used as a predictor of the severity of the condition in chronic diseases in order to timely correct treatment.

Актуальность. Нарушение баланса между различными звеньями иммунной системы может приводить к развитию аутоиммунных и онкологических патологий, понижает сопротивляемость организма инфекциям, повышает риск присоединения вторичных инфекций, а также иммунозависимых заболеваний. Установление надежных генетических биомаркеров при иммунопатологических процессах позволит оценить степень тяжести состояния пациентов.

Цель: оценить возможность определения количественного содержания TREC и KREC в иммунокомпетентных клетках для своевременной коррекции лечения при хронических иммунообусловленных заболеваниях.

Задачи: 1. Изучить механизм образования данных молекул; 2. Оценить их использование в медицинской практике.

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 по предметным заголовкам (MeSH) с использованием ключевых слов «TREC», «KREC» (12 статей, 3 автореферата диссертаций).

Результаты и их обсуждение. TREC и KREC представляют собой стабильные молекулы, которые являются предшественниками клеточных рецепторов T- и B-лимфоцитов. Соответственно, необходимо кратко рассмотреть активацию T- и B-клеточных рецепторов (ТКР и ВКР). T- и B-лимфоциты на ранних стадиях созревания экспрессируют генетически детерминированные ТКР и ВКР, а затем, в результате ферментативных механизмов, при генерации разнообразия рецепторов происходит реорганизация сегментов варибельных генов. Иммунный ответ B-лимфоцитов на антиген является клональным: отдельный клон предрасположен к ответу на один эпитоп антигена. Незрелые B-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 в процессе активации клеток антигеном [1].

Механизм образования TREC. 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 δ Rec и Ψ J α . Иссекаемая ДНК циркуляризуется благодаря лигированию тупых сигнальных концов ДНК, тем самым образуя стабильные кольцевидные продукты (рисунок 1а) [2].

Механизм образования KREC. 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 V κ и J κ сегментов и в дальнейшем сопровождается рекомбинацией с участием интронной последовательности (J κ -SkintronRSS) и каппа-делеционным элементом (Kde), что делает каппа-локус (IGK) нефункциональным и определяет исключение данного локуса, образуя круг эксцизии KREC (рисунок 1б) [3].

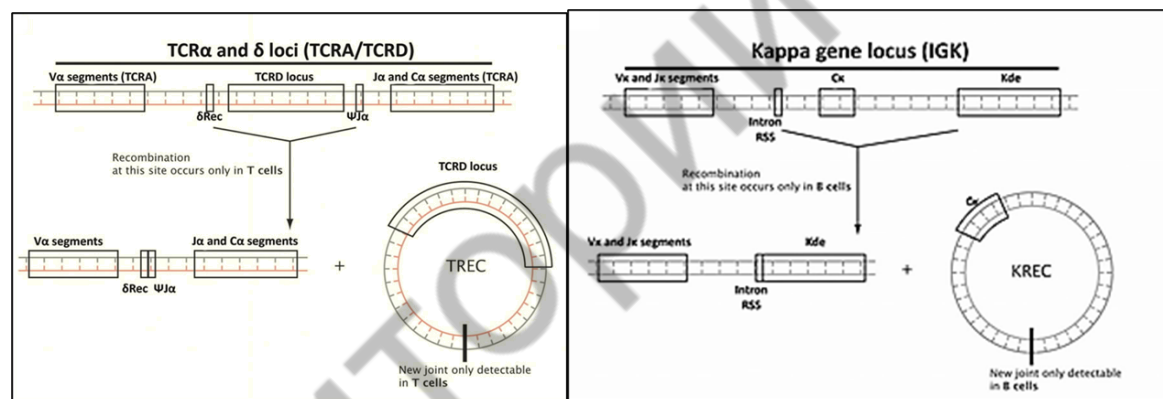


Рис. 1 – Схема образования TREC (1а) и KREC (1б)

Использование маркеров в медицинской практике. На сегодняшний день использование TREC и KREC в качестве диагностических молекулярных маркеров в педиатрической практике широко распространено по всему миру, а в некоторых штатах США данные показатели включены в скрининговую программу тестирования новорожденных на наличие ТКИН (тяжелый комбинированный иммунодефицит). Установлено, что уровни TREC среди CD4⁺ Т-клеток с возрастом снижаются в 50-100 раз, а уровни KREC остаются стабильными [4], что позволяет использовать их количественные параметры в оценке функционального состояния лимфоцитов при различных физиологических и патологических состояниях.

При каких-либо нарушениях в процессе образования Т-клеток индуцируется апоптотическая гибель дефектных клеток, вследствие чего наблюдается снижение количества Т-лимфоцитов и низкое число TREC. ДНК KREC также может быть суррогатным маркером зрелых наивных В-лимфоцитов и использоваться для оценки их пролиферативной истории [3].

Уровень TREC широко исследуется у детей с первичными иммунодефицитами (ПИД), синдроме Оменна, у пациентов с дефицитом протеинкиназы, с мутациями в

лиганде CD40 и альфа-цепи рецептора интерлейкина 10, с синдромом делеции 22q, синдромом CHARGE и трисомией 21 и 18. Кроме того, низкий TREC определяется при атаксии-телеангиэктазии, комбинированных иммунодефицитных заболеваниях, недостатке DOCK, EDA-ID, синдромах Нунана, Якобсена, Неймегена, Фринса, костной дисплазии, неонатальном лейкозе, аутоимунных заболеваниях, ВИЧ - инфекции, а также при таких цитогенетических нарушениях как делеция 14, 17 хромосомы, удвоение 17p хромосомы. Уровень KREC также может оцениваться как низкий у пациентов с дефектами созревания В-клеток, с сочетанным (Т и В) иммунодефицитом, у пациентов, страдающих X-сцепленной агаммаглобулинемией (XLA) и XLA-подобными заболеваниями. Измерение KREC было предложено в качестве потенциального инструмента для идентификации этих двух заболеваний, потому что дефекты созревания В-клеток происходят до событий IGKDEL, и поэтому молекулы KREC должны отсутствовать у этих пациентов [5].

В исследовании Е.А. Блиновой «Количество TREC в периферических Т-лимфоцитах человека в норме и при иммунопатологических состояниях» наглядно демонстрируется роль TREC при следующих хронических заболеваниях [6]: ревматоидный артрит, бронхиальная астма, атопический дерматит (таблица 1). В данной работе исследователем была сформирована следующая выборка: 15 условно здоровых доноров и 30 пациентов с ревматоидным артритом, 17 пациентов с бронхиальной астмой менее 1 года, 32 пациента с бронхиальной астмой более 1 года и 22 донора, 26 пациентов с атопическим дерматитом и 22 донора к этой группе пациентов.

Табл.1. Сравнительная оценка количества копий молекул TREC в популяциях CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов при хронических иммунозависимых заболеваниях

TREC/10 ⁶ CD4+ ME (P25-P75) у пациентов	TREC/10 ⁶ CD4+ ME (P25- P75) у доноров	Уровень значимости (p)Д vs П	TREC/10 ⁶ CD8+ ME (P25-P75) у пациентов	TREC/10 ⁶ CD8+ ME (P25-P75) у доноров	Уровень значимости (p)Д vs П
Ревматоидный артрит					
1650 (976-2800)	3700 (1050-5800)	p<0,05	1500 (838-2400)	4200 (719-8500)	p<0,05
Бронхиальная астма (больные менее 1 года)					
20 000 (7800-42100)	5550 (1740-14900)	p<0,05	20 050 (8890-40300)	7750 (927-12000)	p<0,05
Бронхиальная астма (больные более 1 года)					
3880 (2000-5760)	5550 (1740-14900)	p>0,05	3415 (1400-7300)	7750 (927-12000)	p>0,05
Атопический дерматит					
10260 (5330-14915)	13800 (9800-22740)	p>0,05	7400 (4800-15500)	11850 (9100-20900)	p<0,05

Из приведенной таблицы следует, что при ревматоидном артрите, бронхиальной астме с длительностью заболевания менее 1 года, атопическом дерматите 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 [6].

Поскольку в различных фазах заболеваний наблюдается различное количество как Т- и В-лимфоцитов, то количество TREC и KREC позволяет оценить процессы формирования и дифференцировки Т и В-лимфоцитов, изменения соотношения процессов тимопоэза и периферической экспансии в поддержании Т- и В-клеточного пула на периферии. Количество TREC коррелирует с числом именно наивных Т-лимфоцитов, вышедших в кровоток, слабо или совсем не вовлекавшихся в пролиферацию. Они являются лучшими предикторами серьезности возникшего иммунодефицита, чем общее количество Т-клеток. Так как в процессе дифференцировки незрелые Т- и В-клетки проходят несколько этапов развития, то изучение изменений структуры генов ТКР и ВКР, их экспрессии и корреляции с поверхностными CD3, CD4, CD8 и CD19 также позволяет оценить функциональное состояние иммунной системы пациента.

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].

Количество копий TREC, KREC на 1 млн клеток или на 1 мл крови устанавливают методом ПЦР в режиме реального времени. В качестве материала для выделения ДНК могут быть использованы свежие образцы периферической крови, «сухие пятна», а также мазки крови. Ключевым подходом для выбора метода являются минимальная пороговая концентрация рабочего раствора геномной ДНК 10-15 нг/мкл, а также критерии чистоты выделения геномной ДНК: значение A260/A280 в диапазоне 1,7–2,0 и A260/A230 в диапазоне 2,0–2,3 соответственно [8]. Анализ ПЦР-РВ имеет ряд преимуществ, включая высокую чувствительность, высокую пропускную способность, низкую стоимость и возможность исследовать ДНК, полученную из минимального объема образцов крови, собранных на карты Гатри с сухими пятнами крови.

Выводы: 1. Количественный анализ кольцевых участков ДНК — TREC и KREC помогает определить зрелость и функциональную активность Т- и В-лимфоцитов, что может использоваться в качестве предиктора тяжести состояния при иммунозависимых заболеваниях с целью своевременной коррекции лечения; 2. Количество TREC и KREC позволяет оценить процессы формирования и дифференцировки Т- и В-лимфоцитов, изменения соотношения процессов тимопоэза и периферической экспансии в поддержании Т- и В-клеточного пула на периферии, следовательно эти показатели являются потенциальными генетическими маркерами состояния иммунной системы.

Литература

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

3. 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.

4. Junge, S. Correlation between recent thymic emigrants and CD31+(PECAM-1) CD4+T cells in normal individuals during aging and in lymphopenic children / Sonja Junge [et al] // European Journal of Immunology. -2007. - № 37(11). – P. 3270-3280. DOI: 10.1002/eji.200636976

5. King, J. Newborn Screening for Primary Immunodeficiency Diseases: The Past, the Present and the Future / Jovanka King, Jonas F. Ludvigsson, Lennart Hammarström // Int. J. Neonatal Screen. – 2017. - №3(3). doi.org/10.3390/ijns3030019

6. 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.

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. Инструкция по применению «Метод определения кольцевых молекул ДНК TREC и KREC для оценки функционального состояния иммунной системы у пациентов детского возраста»: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 30.11.18. – Минск: Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, 2018. – 16 с.