

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

УДК 616–097–008-07:577.213.3

ПОЛЯКОВА
Екатерина Александровна

**КОЛЬЦЕВЫЕ МОЛЕКУЛЫ ДНК Т- И В-КЛЕТОЧНОГО РЕЦЕПТОРА
ТРЭК/КРЭК: ЗНАЧЕНИЕ В ДИАГНОСТИКЕ ВРОЖДЕННЫХ
И ПРИОБРЕТЕННЫХ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

Минск 2022

Научная работа выполнена в государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»

Научный руководитель: **Белевцев Михаил Владимирович,** кандидат биологических наук, доцент, заместитель директора по научной работе государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»

Официальные оппоненты: **Державец Лилия Александровна,** доктор биологических наук, заведующий клинико-диагностической лабораторией государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова»

Нижегородова Дарья Борисовна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела иммунологии и биомедицинских технологий научно-исследовательской лаборатории государственного учреждения образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

Оппонирующая организация: государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека»

Защита состоится 29 марта 2022 года в 12.00 на заседании совета по защите диссертаций Д 03.18.04 при учреждении образования «Белорусский государственный медицинский университет» по адресу: 220116, г. Минск, пр-т Дзержинского, 83, e-mail: uchsovets@bsmu.by, тел. (017) 302-16-21.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет».

Автореферат разослан _____ февраля 2022 года.

Ученый секретарь совета
по защите диссертаций
кандидат медицинских наук, доцент



А.П. Музыченко

ВВЕДЕНИЕ

Современные исследования в области фундаментальной иммунологии, клеточной биологии, белковой и геной инженерии позволили по-новому взглянуть на механизмы функционирования иммунной системы и определить спектр и локализацию повреждений, приводящих к развитию различных видов нарушений с вовлечением иммунного механизма, в том числе первичных иммунодефицитных состояний (ПИД). У новорожденных, в особенности у недоношенных детей со сроком гестации менее 37 недель, в силу функциональной незрелости врожденного и адаптивного звеньев иммунной системы может наблюдаться лимфопения. Дефицит лимфоцитарных клеток может быть и причиной развития ПИД [А. Durandy, 2003; Т. Strunk, 2011; S. Hueneske, 2016; Л. С. Устьянцева, 2017]. Своевременная диагностика ПИД при использовании современных методов терапии позволяет добиться хороших результатов у большинства пациентов [А. R. Gennery, 2010; S. Y. Pai, 2014; V. Model, 2018]. Диагностический процесс осложняется не только наличием свыше 430 разновидностей ПИД, но и схожестью первоначальных клинических проявлений с инфекционными заболеваниями [С. S. Aranda, 2021]. Таким образом, ранняя диагностика первичных иммунодефицитов (еще до развития клинических проявлений) является ключевым моментом успешного лечения данной патологии.

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) является одним из основных методов лечения ПИД и гематологических заболеваний. Основной проблемой трансплантации является мониторинг качественного и количественного восстановления иммунокомпетентных Т- и В-лимфоцитов реципиента. Современные методы определения дефицита Т- и/или В-клеточного звеньев иммунитета при ПИД и ТГСК разнообразны. Необходим методологический подход оценки функционирования Т- и В-лимфоцитов, который будет обладать простотой, высокой специфичностью и эффективностью, с возможностью применения в клинической практике.

Существует метод оценки функционирования иммунной системы, основанный на оценке количества продуктов рекомбинации генов Т-клеточного рецептора (ТРЭК) и продуктов каппа-делеционных элементов, образующихся в результате рекомбинации генов В-клеточного рецептора (КРЭК), с использованием полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ).

Раннее выявление врожденных и приобретенных иммунологических нарушений остается сложной проблемой. В настоящее время проточная цитометрия доступна не во всех клиничко-диагностических лабораториях Республики Беларусь и анализ ТРЭК/КРЭК может представлять собой реальную альтернативу. Поэтому крайне важно не только расширить диагностику врожденных и приобретенных иммунологических нарушений в учреждениях с ограниченными ресурсами, но и разработать более рентабельные альтернативы.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами (проектами), темами

Диссертация выполнена в рамках научно-исследовательских работ:

– «Определение кольцевых молекул ДНК Т- и В-клеточного рецептора (TRAC/KREC) как маркеров функционального состояния иммунной системы» (2016–2018) государственной программы научных исследований «Медицина и фармация» «Фундаментальные и прикладные наук – медицине», подпрограмма «Диагностика и терапия заболеваний», № госрегистрации 20161249;

– «Разработать метод определения кольцевых продуктов реаранжировки генов Т- и В-клеточного рецептора методом мультиплексной количественной ПЦР «в реальном времени» для диагностики иммунопатологических состояний» подпрограммы 8 «Импортозамещающие диагностикумы и биопрепараты-2020», государственной программы «Научно-технологические и технические» (2016–2020), № госрегистрации 20180839;

– «Разработать и внедрить метод диагностики отдельных нарушений, вовлекающих иммунный механизм у недоношенных новорожденных с использованием кольцевых молекул ДНК Т- и В-клеточного рецептора (TRAC/KREC)» отраслевой научно-технической программы «Здоровье матери и ребенка – основа здоровья нации» (2019–2021), № госрегистрации 20191042.

Цель и задачи исследования

Цель исследования – повысить эффективность диагностики врожденных и приобретенных иммунологических нарушений путем количественного определения копий ТРЭК/КРЭК у детей различного возраста, включая период новорожденности.

Задачи исследования:

1. Разработать и внедрить эффективную технологию определения ТРЭК/КРЭК для диагностики отдельных нарушений, вовлекающих иммунный механизм у детей.

2. Оценить диагностическую значимость технологии определения ТРЭК/КРЭК у детей с различными врожденными дефектами иммунной системы.

3. Оценить эффективность применения технологии определения ТРЭК/КРЭК с целью оценки восстановления иммунной системы у детей с приобретенными иммунологическими нарушениями после ТГСК.

4. Оценить состояние иммунитета у недоношенных новорожденных с применением технологии определения ТРЭК/КРЭК.

Объект исследования – образцы клеток периферической крови здоровых детей, пациентов с первичными иммунодефицитами, пациентов после ТГСК.

Предмет исследования – количество копий ТРЭК и КРЭК, диапазон значений в норме и при патологии.

Научная новизна

1. Впервые в Республике Беларусь разработан метод, позволяющий оценить функционирование иммунной системы с использованием количественного определения кольцевых продуктов реаранжировки генов Т- и В-клеточного рецепторов ТРЭК и КРЭК.

2. Впервые определен диапазон нормальных значений ТРЭК и КРЭК у детей Республики Беларусь и установлен пороговый уровень ТРЭК и КРЭК в качестве диагностического критерия первичных иммунодефицитов у детей различного возраста, включая период новорожденности.

3. Впервые применена методика определения значений ТРЭК и КРЭК для оценки функционирования иммунной системы у пациентов после ТГСК.

4. Впервые обоснована необходимость оценки функционирования иммунной системы у недоношенных новорожденных методом количественного определения ТРЭК и КРЭК.

Положения, выносимые на защиту

1. Метод мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени» является эффективной технологией для количественного определения эксцизионных колец ДНК Т- и В-клеточного рецептора ТРЭК и КРЭК.

2. Применение технологии количественного определения копий ТРЭК и КРЭК имеет диагностическую значимость при первичных иммунодефицитах, характеризующихся поражением как Т-, так и/или В-лимфоцитарного звена при тяжелом комбинированном иммунодефиците, синдроме Ниймеген, атаксии-телеангиоэктазии, заболеваниях иммунной дисрегуляции, агаммаглобулинемии; не имеет диагностического значения при хронической гранулематозной болезни, синдроме Вискотта–Олдрича.

3. Исследование уровней ТРЭК и КРЭК имеет диагностическую значимость в оценке Т- и В-клеточной реконституции у пациентов после ТГСК. Динамика восстановления количества ТРЭК и КРЭК у пациентов с диагнозами первичный иммунодефицит, апластическая анемия, острый лимфобластный лейкоз имеет схожую направленность.

4. Количество копий ТРЭК и КРЭК зависит от гестационного возраста. Перинатальные и интранатальные факторы значимо не влияют на значения ТРЭК/КРЭК недоношенных новорожденных любой степени недоношенности.

Личный вклад соискателя

Научные положения, выносимые на защиту, представляют собой результат анализа данных комплексного обследования 326 детей. Постановка цели и задач диссертационного исследования проведена совместно с научным

руководителем работы, к.б.н., доцентом Белевцевым М. В. Планирование, выполнение основных этапов исследования, анализ литературных данных, первичная обработка биологического материала и выделение ДНК, отработка молекулярно-генетических методов, внедрение в рутинную лабораторную диагностику методов определения количества копий ТРЭК и КРЭК, определение количества копий ТРЭК и КРЭК в образцах, анализ факторов, влияющих на значения ТРЭК и КРЭК у недоношенных новорожденных, у пациентов после ТГСК, оформление результатов диссертационного исследования, формирование компьютерной базы данных, статистическая обработка данных, формулирование выводов, оформление результатов диссертационного исследования выполнены диссертантом самостоятельно. Разработка метода определения ТРЭК и КРЭК, выполнение иммунологических, молекулярно-биологических исследований проводились совместно с сотрудниками государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» – к.б.н. Стеганцевой М. В., н.с. Сакович И. С., ст.н.с. Гурьяновой И. Е., зав. лабораторией иммунологических исследований, к.б.н. Шман Т. В., что нашло отражение в публикациях [1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16] (вклад 85%). Сбор клинических данных по новорожденным выполнен совместно с зав. лабораторией клинической неонатологии, реабилитации новорожденных и детей первого года жизни ГУ «РНПЦ «Мать и дитя», к.м.н. Остроушко Д. В., а также с н.с. Берестень С. А., что отражено в публикациях [4, 5, 6, 7, 11, 17] (вклад 80%).

Апробация результатов диссертации и информация об использовании ее результатов

По материалам диссертации сделаны доклады на: V Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы первичных иммунодефицитов» (Минск, 2018); IX Межрегиональном совещании НОДГО «Перспективы детской гематологии-онкологии: мультидисциплинарный подход-2018» (Санкт-Петербург, 2018); X Межрегиональном совещании НОДГО «Актуальные проблемы и перспективы развития детской гематологии-онкологии в Российской Федерации» (Сочи, 2019); XI Республиканской научно-практической конференции с международным участием «Современные перинатальные медицинские технологии и решение проблем демографической безопасности» (Минск, 2019); 3-м конгрессе «Дж. Проджект» (Конья, 2019); Виртуальном ежегодном совещании СНГ: Североамериканская конференция по иммунодефицитам и дисрегуляции (Шарлотта, 2021); VI конференции с международным участием «Актуальные вопросы первичных иммунодефицитов. Школа-семинар по клинической иммунологии» (Минск, 2021); Международной научно-практической конференции «Актуальные

вопросы клинической иммунологии» III съезде иммунологов Республики Казахстан (Нур-Султан, 2021).

Разработано 3 инструкции по применению, утвержденные Министерством здравоохранения Республики Беларусь, имеются акты о внедрении результатов в работу государственных учреждений «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» и «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека», г. Гомель.

Опубликование результатов диссертации

По материалам диссертации опубликовано: 5 статей в рецензируемых научных журналах (1,8 авторских листа), 2 статьи в сборниках научных трудов и 10 тезисов докладов и материалов конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 122 страницах компьютерного текста и иллюстрирована 22 таблицами и 46 рисунками. Работа состоит из введения, общей характеристики работы, обзора литературы, описания материала и методов исследования, четырех глав с изложением результатов собственных исследований, заключения и библиографического списка, представленного 156 источниками, из них 9 опубликованы на русском языке, собственных публикаций диссертанта, 7 приложений.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Материал и методы исследования

Характеристика пациентов, включенных в исследование.

В исследование были включены 326 детей (196 мужского и 130 женского пола): 115 недоношенных новорожденных (35,4 (23,5–37,0) недели гестации), 113 пациентов с первичными и вторичными иммунологическими нарушениями (7,0 (0,1–18,0) лет). Из них 78 пациентов с генетически верифицированным диагнозом ПИД, 35 пациентов с вторичными иммунологическими нарушениями после ТГСК (ПИД, АА, ОЛЛ); контрольную группу составили 98 здоровых детей (0 (0–15,0) лет).

Критерии включения пациентов в исследования были определены согласно протоколам диагностики и лечения детей с онкогематологическими заболеваниями и первичными иммунодефицитами. Критерием включения доношенных новорожденных был гестационный возраст более 37 недель с морфологическим и функциональным состоянием органов и систем, соответствующих сроку гестации; для недоношенных детей критерием включения был гестационный возраст менее 37 недель с низкой массой тела при рождении.

Материал для исследования. В качестве материала для исследования использовали периферическую кровь, геномную ДНК, выделенную из крови.

Исследование иммунного статуса. Определение субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови проводили с использованием проточного цитофлуориметра Navios (Beckman Coulter, США). Для пациентов после ТГСК субпопуляционный состав лимфоцитов определяли на +30, +60, +100, +180, +365 дни.

Полимеразная цепная реакция в реальном времени. Количество копий ТРЭК/КРЭК определялось методом ПЦР-РВ с использованием амплификатора Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, США). В качестве набора для исследования была использована собственная разработка, выполненная в ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» (инструкция по применению № 036-0520) [19]. Данные анализировали с помощью программного обеспечения Real-time RCR Data Analysis (Bio-Rad, США). Количество копий ТРЭК и КРЭК рассчитывали на 1 млн лейкоцитов крови по формуле 1:

$$\text{Количество копий ТРЭК (КРЭК)} = \frac{\text{Среднее (SQ) ТРЭК (КРЭК)}}{\text{Среднее (SQ) АЛБ/2}} \times 10^6 \quad (1)$$

Секвенирование методом Сенгера. Выявление генетических поломок в генах при ПИД проводили методом секвенирования с использованием генетического анализатора (Applied Biosystems 3130).

Статистическая обработка 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; $p < 0,05$. Для оценки взаимосвязи параметров, полученных различными методами, использовали метод линейной регрессии. Статистическую зависимость считали значимой с уровнем коэффициента детерминации $R^2 > 0,8$ ($p < 0,05$). Оценка соответствия вида распределения количественных показателей в выборке закону нормального распределения выполнялась при помощи критерия Шапиро–Уилка (Shapiro–Wilk's, W-test). На основании варьирования показателя и закономерности распределения использовали непараметрические методы представления данных в виде медианы, минимума-максимума и интерквартильного размаха (2,5%–97,5%). Значимость статистических различий определяли с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты собственных исследований

Технология определения ТРЭК и КРЭК для диагностики иммунологических нарушений методом ПЦР с детекцией результатов в «реальном времени». Нами был разработан метод, который включал подбор праймеров на ген внутреннего контроля (альбумин), а также на эписомальную ДНК Т- и В-клеточных рецепторов ТРЭК и КРЭК, получение калибраторов и отработку метода на основании полученных результатов.

В качестве калибраторов созданы и получены плазмидные стандарты на основе вектора pCR2.1-ТОРО Vector (Invitrogen, США), в который были клонированы фрагменты контрольного гена альбумина, ТРЭК и КРЭК.

Для построения калибровочной кривой использовали серийные разведения с концентрацией калибраторов 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 копий в 5 мкл плазмидной ДНК. Полученные разведения оценивали при помощи ПЦР-РВ как в моноплексном, так и в мультиплексном варианте.

Свойства калибровки определялось тремя параметрами: эффективностью ПЦР (90–110%), наклоном – 3,3 (3,6–3,10), коэффициентом корреляции R^2 (значение должно быть близко к 1) (таблица 1).

Таблица 1. – Параметры стандартных кривых амплификации плазмидной ДНК альбумина, ТРЭК, КРЭК

Вариант ПЦР-РВ	Мишень	Наклон	Коэффициент корреляции, R^2	Эффективность, %
Моноплексная	АЛБ	-3,3	0,99	99,2
	ТРЭК	-3,4	0,97	96,1
	КРЭК	-3,3	0,99	97,8
Мультиплексная	АЛБ	-3,3	0,98	98,0
	ТРЭК	-3,3	0,99	99,5
	КРЭК	-3,3	0,99	99,9

Специфичность метода для мишеней ТРЭК и КРЭК определяли в четырех клеточных линиях нелимфоидного происхождения: (Kasumi-1, K562, HL60, НЕК293Т). Амплификация в данных образцах не наблюдалась ни в одном случае, что свидетельствует о 100% специфичности.

Аналитическая чувствительность ПЦР-РВ для всех мишеней составила 1 копию на реакцию при разведении в ТЭ буфере и 10 копий – при разведении в поликлональной ДНК миелоидных клеточных линий как для моноплексного, так и для мультиплексного варианта ПЦР-РВ.

Для оценки воспроизводимости методов были проведены серии ПЦР-РВ с одним образцом ДНК в 10 повторах для обоих методов.

При оценке ΔCt АЛБ, ТРЭК и КРЭК в моноплексном варианте коэффициент вариации значений внутрисерийной воспроизводимости составил

0,5–1,1%, а межсерийной – 1,2–2,1%. При оценке количественных значений наблюдалась средняя вариация данных, которая составила 8,0–11,5% для внутрисерийной воспроизводимости, для межсерийной – 8,8–14,1%.

При оценке ΔCt в мультиплексном варианте для внутрисерийной воспроизводимости коэффициент вариации составил 1,1–1,5%, для межсерийной – 0,5–2,4%. При оценке количественных значений внутри серии коэффициент вариации составил 2,5–11,9%, при оценке межсерийной воспроизводимости коэффициент вариации составил 7,6–17,7%.

Для клинической валидации разработанного метода мультиплексной ПЦР-РВ были исследованы образцы крови пациентов (n=30) с первичными и вторичными иммунологическими нарушениями и здоровых детей (n=20). В качестве референсного метода для оценки конкордантности результатов ТРЭК и КРЭК использовали метод моноплексной ПЦР.

Для сравнения данных, полученных методом моноплексной и мультиплексной ПЦР, использовали метод линейной регрессии. Для ТРЭК коэффициент детерминации (R^2) составил 0,92 ($p < 0,001$), для КРЭК – 0,83 ($p < 0,001$).

Для оценки диагностической значимости результатов рассчитывали диагностическую чувствительность, которая составила 93,9% для ТРЭК, 91,4% – для КРЭК. Диагностическая эффективность для ТРЭК составила 96,0%, для КРЭК – 94,0%. Диагностическая специфичность равна 100% для обеих мишеней.

На основании полученных данных оба метода могут быть использованы для количественного определения копий ТРЭК и КРЭК. Однако вариант мультиплексной ПЦР может быть предпочтительнее по причине того, что позволяет сократить объем расхода реагентов в 3 раза.

Для определения диапазона нормальных значений исследованы образцы периферической крови доношенных новорожденных (n=58) и здоровых детей в возрасте от 1 до 15 лет (n=40) (таблицы 2, 3).

Таблица 2. – Диапазон нормальных значений количественного содержания копий ТРЭК у здоровых детей разных возрастных групп (n=98)

Количество копий на 10^6 клеток	Новорожденные 0–7 дней (n=58)	1–6 лет (n=6)	7–12 лет (n=25)	13–15 лет (n=9)
Мин	$2,2 \times 10^3$	$5,3 \times 10^3$	$4,0 \times 10^3$	$3,0 \times 10^3$
Макс	$4,5 \times 10^5$	$2,9 \times 10^4$	$6,1 \times 10^4$	$6,0 \times 10^4$
Медиана (2,5–97,5)	$4,0 \times 10^4$ ($3,3 \times 10^3$ – $2,4 \times 10^5$)	$1,5 \times 10^4$ ($4,1 \times 10^3$ – $5,9 \times 10^4$)	$1,9 \times 10^4$ ($4,3 \times 10^3$ – $6,0 \times 10^4$)	$1,3 \times 10^4$ ($3,3 \times 10^3$ – $5,6 \times 10^4$)

Таблица 3. – Диапазон нормальных значений количественного содержания копий КРЭК у здоровых детей разных возрастных групп (n=98)

Количество копий на 10^6 клеток	Новорожденные 0–7 дней (n=58)	1–6 лет (n=6)	7–12 лет (n=25)	13–15 лет (n=9)
Мин	$2,0 \times 10^3$	$3,9 \times 10^3$	$1,7 \times 10^3$	$1,7 \times 10^3$
Макс	$2,9 \times 10^5$	$9,6 \times 10^3$	$2,9 \times 10^4$	$9,5 \times 10^3$
Медиана (2,5–97,5)	$2,0 \times 10^4$ ($2,7 \times 10^3$ – $2,3 \times 10^5$)	$5,8 \times 10^3$ ($1,8 \times 10^3$ – $2,4 \times 10^3$)	$7,8 \times 10^3$ ($1,8 \times 10^3$ – $2,5 \times 10^4$)	$4,3 \times 10^3$ ($2,0 \times 10^3$ – $9,4 \times 10^3$)

Диагностическая значимость определения уровней ТРЭК и КРЭК при первичных иммунодефицитах. В исследование включены 78 пациентов с генетически верифицированным диагнозом ПИД: 1-я группа пациентов с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (ТКИН) (n=11), 2-я группа — с синдромом Вискотта–Олдрича (n=9), 3-я группа – с атаксией-телеангиоэктазией (АТ) (n=13), 4-я группа – с синдром Ниймеген (n=15), 5-я группа – с X-сцепленной агаммаглобулинемией (n=12), 6-я группа – с заболеваниями иммунной дисрегуляции (n=10), 7-я группа – с хронической гранулематозной болезнью (ХГБ) (n=8).

Пациенты с ТКИН характеризовались разными иммунофенотипами и имели генетические поломки в генах IL2RG, JAK3, IL7R, ADA (Т–В+) ТКИН, RAG1(Т–В–) ТКИН.

Согласно полученным данным значения ТРЭК и КРЭК во всей группе пациентов с (Т–В–) ТКИН были значимо ниже количества ТРЭК группы здоровых детей ($p < 0,0001$). В группе пациентов с (Т–В+) ТКИН ТРЭК были значимо ниже ($p < 0,001$) в сравнении с показателями группы здоровых детей, значения КРЭК статистически значимо относительно здоровых детей не отличались ($p = 0,16$) (рисунок 1).

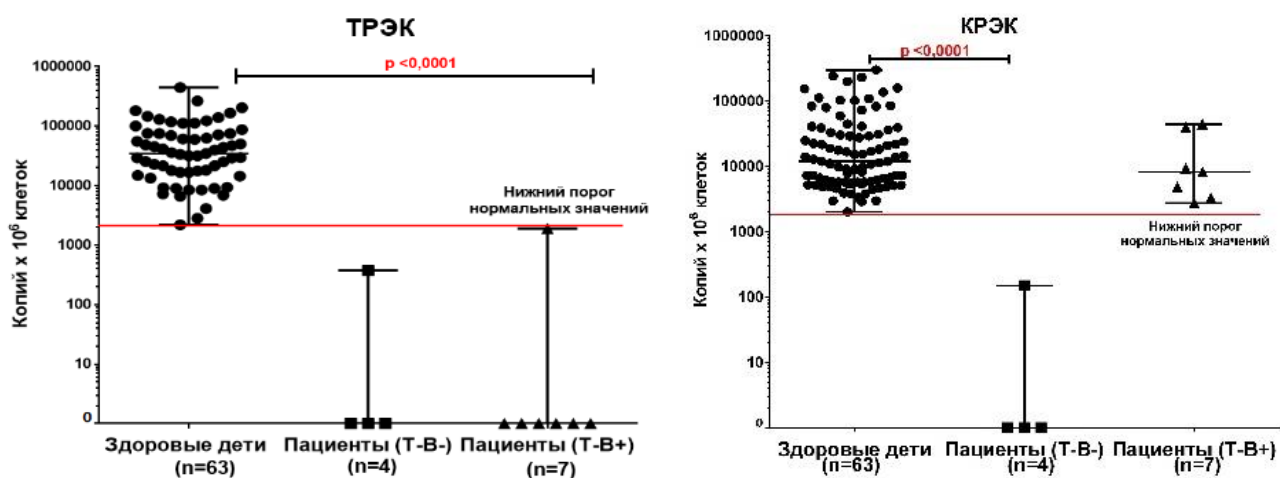


Рисунок 1. – Количество ТРЭК и КРЭК у пациентов с диагнозом ТКИН. Данные представлены в виде медианы, минимума-максимума значений

В группе с синдромом Вискотта–Олдрича количество копий ТРЭК/КРЭК у всех пациентов было в диапазоне нормальных значений, статистически показатели не отличались от группы здоровых детей соответствующего возраста. Медиана значений ТРЭК составила $1,2 \times 10^4$ копий, КРЭК – $7,6 \times 10^3$ на 1 млн лейкоцитов соответственно.

Среди пациентов с атаксией-телеангиоэктазией значения ТРЭК и КРЭК во всей группе пациентов были значимо снижены в сравнении со значениями ТРЭК и КРЭК здоровых детей: медиана на 1 млн лейкоцитов периферической крови составила $3,6 \times 10^2$ копий ($p < 0,0001$) и $3,0 \times 10^2$ ($p < 0,0001$) копий соответственно (рисунок 2).

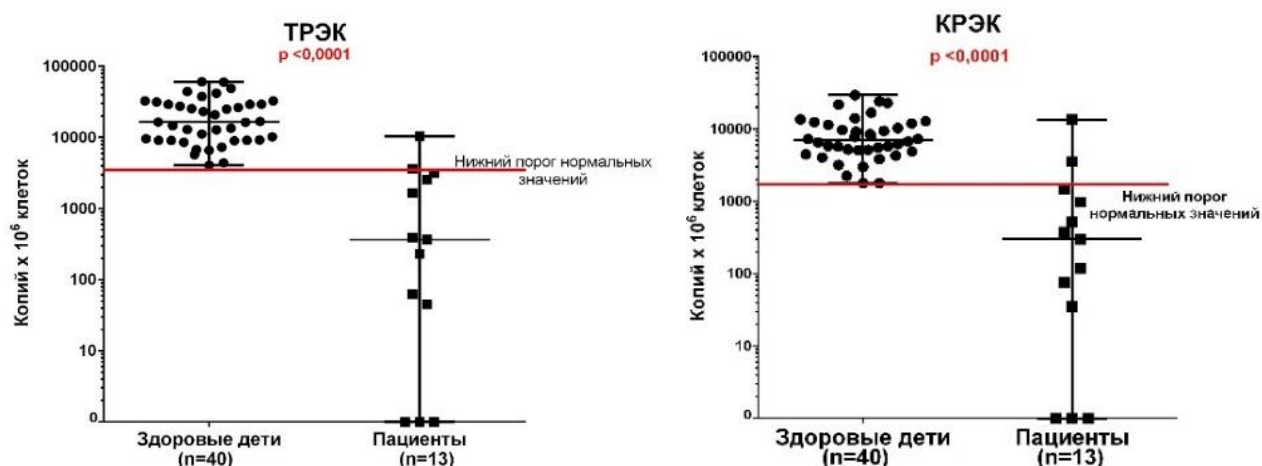


Рисунок 2. – Количество ТРЭК и КРЭК у пациентов с АТ. Данные представлены в виде медианы, минимума-максимума значений

В группе пациентов с синдромом Ниймеген значения как ТРЭК, так и КРЭК были снижены и статистически значимо отличались от показателей группы здоровых детей ($p < 0,0001$) (рисунок 3).

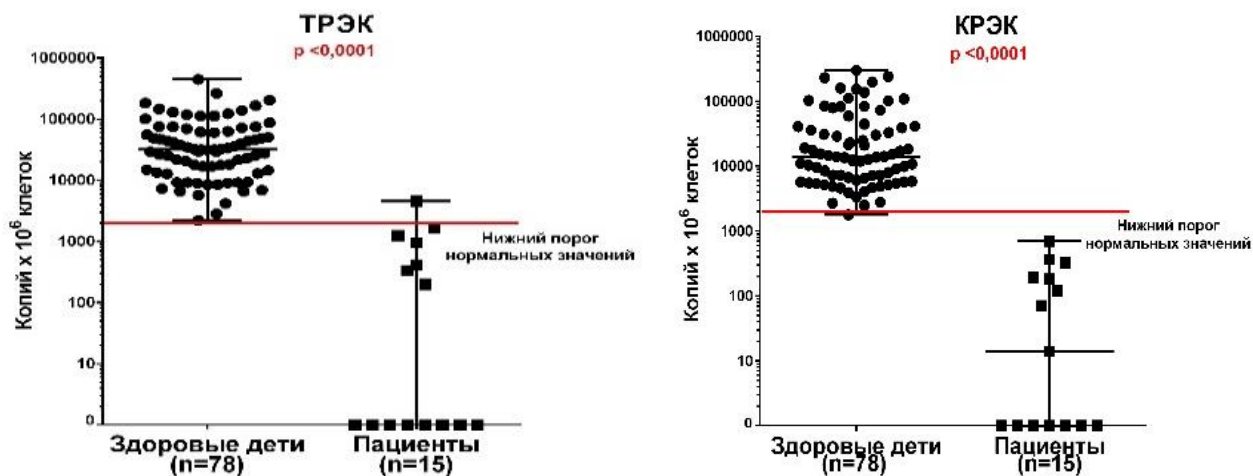


Рисунок 3. – Количество ТРЭК и КРЭК у пациентов с синдромом Ниймеген. Данные представлены в виде медианы, минимума-максимума значений

У пациентов с X-сцепленной агаммаглобулинемией количество копий ТРЭК было в норме, медиана значений – $1,2 \times 10^4$ копий. КРЭК были значимо снижены, медиана значений составила $2,9 \times 10^2$ копий ($p < 0,0001$) на 1 млн лейкоцитов периферической крови.

У пациентов с ХГБ медиана ТРЭК составила $2,3 \times 10^4$ копий ($p = 0,83$), КРЭК – $1,8 \times 10^4$ ($p = 0,1$) копий на 1 млн лейкоцитов без статистически значимых различий относительно группы здоровых детей.

В группе пациентов с заболеваниями иммунной дисрегуляции значения ТРЭК были снижены у 6 пациентов из 10 ($p < 0,0001$). Низкие показатели значений КРЭК наблюдались у 4 из 10 пациентов ($p < 0,0001$) в сравнении с группой здоровых детей (рисунок 4).

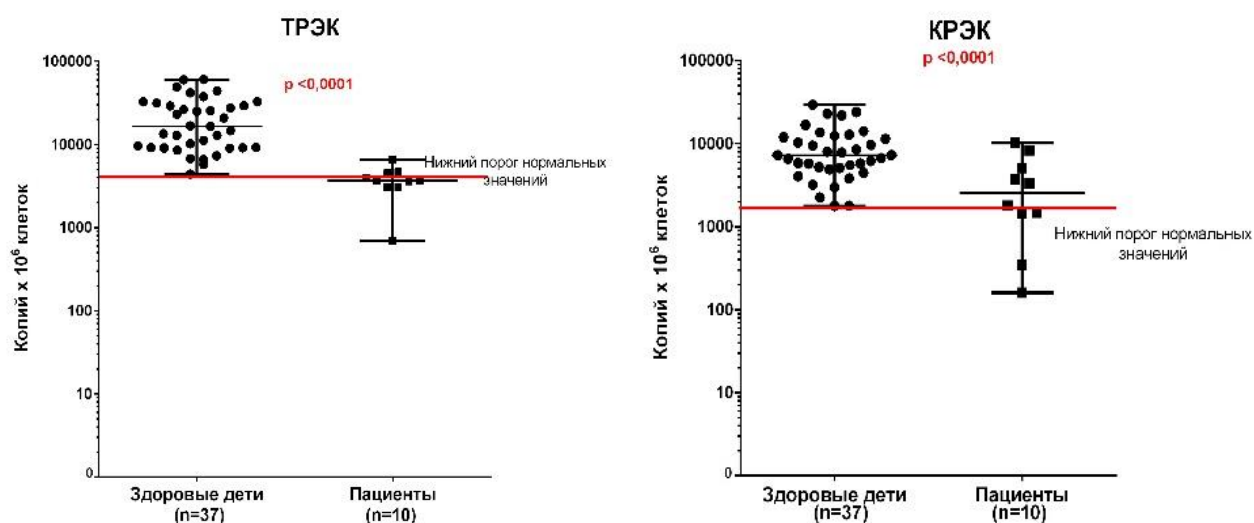


Рисунок 4. – Количество ТРЭК и КРЭК у пациентов с синдромом иммунной дисрегуляции. Данные представлены в виде медианы, минимума-максимума значений

Диагностическая значимость определения ТРЭК/КРЭК у пациентов с приобретенными иммунологическими нарушениями после ТГСК. В исследование включено 35 пациентов, которым выполнена ТГСК. У 11 пациентов диагностирован ПИД, из них 4 – с синдромом Вискотта–Олдрича, 4 – с ТКИН, 1 – с гемофагоцитарным лимфогистиоцитозом, 1 – с недостаточностью HLA-DR II класса, 1 – с ХГБ. У 15 пациентов – АА, у 9 пациентов – ОЛЛ.

16 пациентам ТГСК выполнена от родственного донора, 19 – от неродственного HLA-совместимого донора. 11 пациентам проведено миелоаблативное кондиционирование, 24 – кондиционирование со сниженным режимом интенсивности. В качестве источника трансплантата у 20 пациентов использован костный мозг (КМ), у 5 – пуповинная кровь (ППК), у 10 – периферическая стволовая клетка (ПСК).

Исходя из того, что в трех группах пациентов после ТГСК восстановление ТРЭК и КРЭК наблюдалось схожими темпами и по показателям ТРЭК и КРЭК

группы пациентов в динамике значимо не отличались, была сформирована одна группа и последующее представление данных трех нозологий проводили совместно ($p > 0,05$ во всех временных точках).

Согласно полученным результатам, ТРЭК детектируются на +145 день и к +180 дню пересекают нижний порог нормальных значений у 7/11 пациентов в группе пациентов с ПИД, у 9/15 пациентов с АА, у 6/9 пациентов с ОЛЛ без динамического спада до +365-го дня (рисунок 5). При этом по данным иммунофенотипирования CD3+ Т-лимфоциты так же, как и ТРЭК к +180 дню пересекают нижний порог нормальных значений.

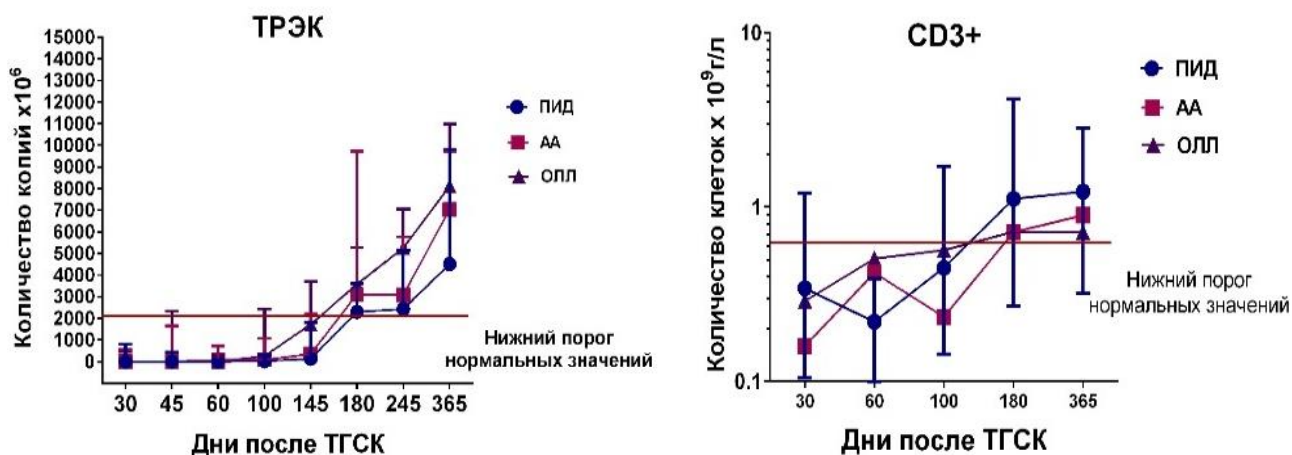


Рисунок 5. – Динамика количества ТРЭК-позитивных лимфоцитов и CD3+ Т-лимфоцитов у пациентов в течение первого года после ТГСК. Данные представлены в виде медианы, минимума-максимума значений

КРЭК к +100 дню пересекают порог нормальных значений у 8/11 пациентов с ПИД, у 12/15 пациентов с АА, у 7/9 пациентов с ОЛЛ (рисунок 6).

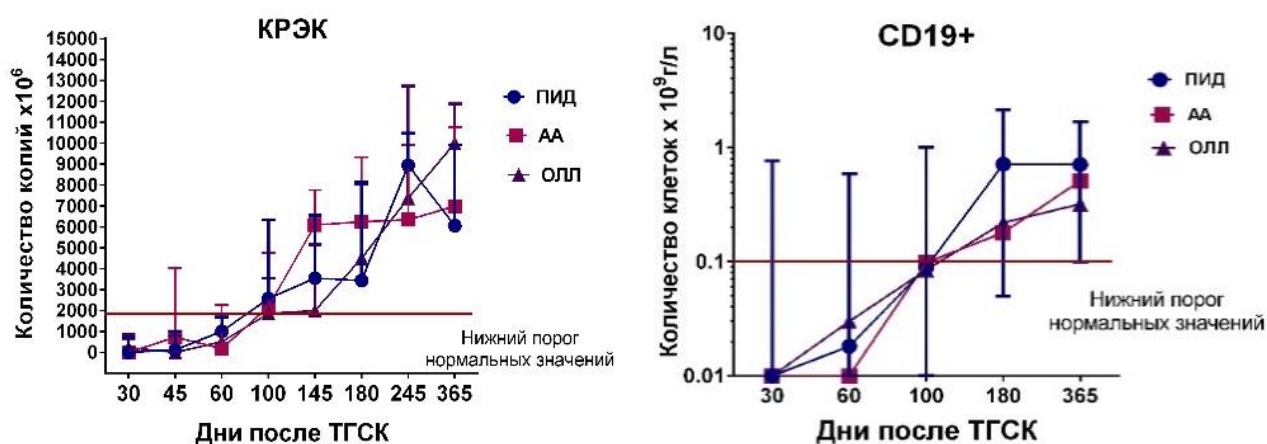


Рисунок 6. – Динамика количества КРЭК-позитивных лимфоцитов и CD19+ В-лимфоцитов у пациентов в течение первого года после ТГСК. Данные представлены в виде медианы, минимума-максимума значений

На +100 день после трансплантации CD19+ В-лимфоциты пересекают порог нормальных значений так же, как и КРЭК.

Статистически значимых различий в динамике восстановления по ТРЭК и КРЭК между группами пациентов с трансплантатом, полученным от родственного и неродственного донора, выявлено не было ($p>0,05$ во всех временных точках).

При анализе влияния типа кондиционирования на восстановление ТРЭК и КРЭК у пациентов после ТГСК значимых различий между двумя группами выявлено не было ($p>0,05$ во всех временных точках).

Более высокие значения ТРЭК наблюдались у пациентов, у которых в качестве трансплантата использовалась ППК, вплоть до +245 дня, медиана значений составила $4,7 \times 10^3$ в сравнении с пациентами, у которых источником трансплантата был КМ – $2,7 \times 10^3$ и ПСК – $2,4 \times 10^3$ копий на 1 млн лейкоцитов соответственно. Однако к +365 дню медиана значений ТРЭК у реципиентов костного мозга составила $7,2 \times 10^3$ и превышала значения медианы ТРЭК реципиентов пуповинной крови $4,5 \times 10^3$ ($p=0,87$) и ПСК – $2,4 \times 10^3$ ($p=0,61$) копий на 1 млн лейкоцитов.

В свою очередь, у пациентов, у которых источником трансплантата была ППК, наблюдалось наибольшее количество КРЭК, медиана значений к +100 дню составила $2,8 \times 10^3$ на 1 млн лейкоцитов. Реконституция КРЭК-позитивных В-лимфоцитов у реципиентов КМ имела схожую направленность, и медиана значений КРЭК к +100 дню составила $2,7 \times 10^3$ копий в 1 млн лейкоцитов. У пациентов, для которых в качестве источника трансплантата использовали ПСК, КРЭК позитивные В-лимфоциты восстанавливались несколько медленнее, ближе к +145 дню медиана значений КРЭК составила $4,1 \times 10^3$ на 1 млн лейкоцитов. Вплоть до + 365 дня количество копий КРЭК было большим у реципиентов ППК в сравнении с реципиентами КМ и ПСК без статистически значимых различий.

Значение определения ТРЭК и КРЭК у недоношенных новорожденных. Для исследования влияния гестационного возраста на количество копий ТРЭК и КРЭК обследованные новорожденные были разделены на 4 группы по степени недоношенности ($n=115$):

I группа ($n=40$ детей, $n=47$ исследований) – новорожденные со сроком гестации 36,5 (36–37) недель; II группа ($n=64$ детей, $n=75$ исследований) – новорожденные со сроком гестации 34,9 (32–35) недели; III группа ($n=7$ детей, $n=9$ исследований) – новорожденные со сроком гестации 29,5 (29–31) недель; IV группа ($n=4$ детей, $n=5$ исследований) – новорожденные со сроком гестации 26,9 (28 и менее) недель.

Значения ТРЭК у недоношенных новорожденных 28 недель и менее ($p=0,0023$), 29–31 недели ($p=0,0007$), 32–35 недель ($p=0,0013$), 36–37 недель ($p=0,324$) были значимо ниже ($p<0,01$) с 28 по 36 неделю гестации в сравнении со значениями ТРЭК доношенных детей.

Значения КРЭК у детей 28 недель и менее ($p=0,0385$), 29–31 недели ($p=0,0378$), 32–35 недель ($p=0,061$), 36–37 недель ($p=0,065$) были значимо ниже у недоношенных детей с 28 недели и менее по 32 неделю ($p < 0,05$) в сравнении с доношенными детьми.

Также наблюдались значимые межгрупповые различия между новорожденными разного срока гестации: ТРЭК у детей 28 недель и менее были ниже в сравнении с группами новорожденных 32–35 недель ($p=0,0136$), 36–37 недель ($p=0,041$), в группе 29–31 недели значения были ниже по отношению к группе 32–35 недель ($p=0,042$) и 36–37 недель ($p=0,009$). Межгрупповых различий по количеству КРЭК выявлено не было.

В группе недоношенных детей была проведена оценка влияния перинатальных и интранатальных факторов на количество копий ТРЭК и КРЭК.

При анализе акушерско-гинекологического анамнеза матери установлено, что у новорожденных от женщин без репродуктивных потерь в анамнезе в сравнении с новорожденными от матерей с репродуктивными потерями в анамнезе значения ТРЭК ($p=0,16$) и КРЭК ($p=0,35$) значимо не отличались.

Значения ТРЭК ($p=0,79$) и КРЭК ($p=0,08$) в группе новорожденных от матерей с физиологическим течением беременности в сравнении с группой детей, рожденных от матерей с угрозой прерывания беременности, значимо не отличались.

При исследовании типа родоразрешения у детей, рожденных через естественные родовые пути, и у детей, рожденных путем операции кесарево сечение, значения ТРЭК ($p=0,53$) и КРЭК ($p=0,56$) значимо не отличались.

При изучении влияния плодности беременности на значения количества копий ТРЭК и КРЭК установлено, что у детей, рожденных от одноплодной беременности, в сравнении с детьми, рожденными от многоплодной беременности, значения ТРЭК ($p=0,21$) и КРЭК ($p=0,59$) значимо не отличались.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Разработанный метод мультиплексной полимеразной цепной реакции в «реальном времени» позволяет с высокой чувствительностью и специфичностью определять количество ТРЭК и КРЭК, используя в качестве материала для исследования как цельную периферическую кровь, так и кровь, забранную методом сухой капли. Диагностическая чувствительность для ТРЭК составляет 93,9%, для КРЭК – 91,4%. Диагностическая эффективность для ТРЭК составляет 96,0%, для КРЭК – 94,0%. Диагностическая специфичность равна 100% для обеих мишеней [1, 2].

2. Диапазон нормальных значений ТРЭК для новорожденных от 0 до 7 дней составляет от $4,0 \times 10^4$ ($2,2 \times 10^3 - 4,5 \times 10^5$), КРЭК – $2,0 \times 10^4$ ($2,0 \times 10^3 - 2,9 \times 10^5$), для детей от 1 года до 6 лет ТРЭК – $1,5 \times 10^4$ ($5,3 \times 10^3 - 2,9 \times 10^4$), КРЭК – $5,8 \times 10^3$ ($3,9 \times 10^3 - 9,6 \times 10^3$), для детей от 7 до 12 лет ТРЭК – $1,9 \times 10^4$ ($4,0 \times 10^3 - 6,1 \times 10^4$), КРЭК – $7,8 \times 10^3$ ($1,7 \times 10^3 - 2,9 \times 10^4$), от 13 до 15 лет диапазон нормальных значений ТРЭК составляет $1,3 \times 10^4$ ($3,0 \times 10^3 - 6,0 \times 10^4$), КРЭК – $4,3 \times 10^3$ ($1,7 \times 10^3 - 9,5 \times 10^3$) [1, 4, 18, 19].

3. Для тяжелого комбинированного иммунодефицита с иммунофенотипом (Т–В–), синдрома Ниймеген, атаксии-телеангиоэктазии характерен одновременный дефицит ТРЭК и КРЭК ($p < 0,01$), для тяжелого комбинированного иммунодефицита с иммунофенотипом (Т–В+) характерна глубокая Т-клеточная лимфопения со статистически значимым снижением ТРЭК ($p < 0,01$) и с нормальным значением КРЭК. При заболеваниях иммунной дисрегуляции наблюдается статистически значимое снижение количества ТРЭК и КРЭК ($p < 0,01$). Х-сцепленная агаммаглобулинемия характеризуется статистически значимым снижением КРЭК ($p < 0,001$) в сравнении с здоровыми детьми. ПИД, такие как синдром Вискотта–Олдрича и хроническая гранулематозная болезнь, при которых нарушения не затрагивают процесс реаранжировки генов Т- и В-клеточного рецептора, характеризуются нормальным количественным содержанием ТРЭК и КРЭК ($p > 0,05$) в сравнении с здоровыми детьми [2, 13, 16].

4. После ТГСК восстановление КРЭК начинается с +45 дня и к +100 дню достигает порога нормальных значений у пациентов с первичным иммунодефицитом, апластической анемией, острым лимфобластным лейкозом. ТРЭК начинают детектироваться сравнительно позже – с +145-го дня и пересекают порог нормальных значений к +180 дню. Тип трансплантации и тип кондиционирования не оказывают влияния на Т- и В-клеточную реконституцию. Использование в качестве трансплантата костного мозга и пуповинной крови позволяет добиваться лучших результатов восстановления ТРЭК и КРЭК-позитивных Т- и В-лимфоцитов [3, 8, 9, 10, 12, 14, 15].

5. Количество копий ТРЭК и КРЭК нарастает с увеличением гестационного возраста. У недоношенных новорожденных с 28 недели и менее по 36 неделю гестации количество копий ТРЭК значимо ниже ($p < 0,01$) в сравнении со значениями ТРЭК доношенных детей. У недоношенных детей с 28 недели и менее по 32 неделю гестации значения КРЭК значимо низкие ($p < 0,05$) в сравнении с доношенными детьми. Перинатальные (акушерско-гинекологические, осложнения течения беременности) и интранатальные факторы (тип родоразрешения, одноплодная/многоплодная беременность) не оказывают значимого влияния на величину значений ТРЭК и КРЭК у недоношенных новорожденных [4, 5, 6, 7, 11, 17, 20].

Рекомендации по практическому использованию результатов

1. Метод количественного определения ТРЭК и КРЭК рекомендуется использовать у пациентов с подозрением на врожденные иммунопатологические нарушения с целью определения необходимости углубленного иммунологического обследования для ранней диагностики ПИД [1, 2, 13, 16, 18, 19, 20].

2. Рекомендуется использовать разработанный метод для мониторинга Т- и В- клеточного неогенеза после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток [3, 8, 9, 10, 14].

3. Для количественной оценки функции тимуса и костного мозга у недоношенных новорожденных рекомендуется учитывать срок гестации недоношенного ребенка. При проведении исследования у недоношенного новорожденного со сроком гестации менее 35–36 недель и получении низких показателей количества копий ТРЭК (менее 1×10^3 копий в 1 млн лейкоцитов) и КРЭК (менее $5,0 \times 10^2$ копий в 1 млн лейкоцитов крови) при нормальном количестве контрольного гена (>1000 копий) необходимо повторить исследование по достижению новорожденным срока гестации не менее 37 недель для получения наиболее информативных данных о состоянии иммунной системы ребенка. Новорожденным, у которых будет обнаружено низкое/отрицательное количество ТРЭК и КРЭК при нормальном количестве копий контрольного гена, необходимо провести иммунологическое исследование клеточного и гуморального иммунитета с определением субпопуляций Т- и В-лимфоцитов [4, 11, 17, 20].

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ

Статьи в научных журналах

1. Метод количественного определения кольцевых молекул ДНК Т- и В-клеточного рецептора, TREC и KREC, в периферической крови с использованием ПЦР в реальном времени / М. В. Стеганцева, И. Е. Гурьянова, И. С. Сакович, Е. А. Полякова, М. В. Белевцев // Евраз. онколог. журн. – 2017. – Т. 5, № 3. – С. 449–456.

2. Кольцевые молекулы Т- и В-клеточного рецепторов (TREC/KREC) в дифференциальной диагностике первичных иммунодефицитов / Е. А. Полякова, М. В. Стеганцева, И. Е. Гурьянова, И. С. Сакович, М. В. Белевцев // Наука и инновации. – 2019. – № 8. – С. 75–78.

3. Роль кольцевых молекул Т- и В-клеточного рецептора (TREC/KREC) в мониторинге иммунного восстановления после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток / Е. А. Полякова, М. В. Стеганцева, И. Е. Гурьянова, Т. В. Шман, Н. В. Минаковская, М. В. Белевцев // Лаб. диагностика. Вост. Европа. – 2020. – Т. 9, № 3. – С. 214–225.

4. Оценка содержания кольцевых молекул ДНК Т- и В-клеточного рецептора (TREC/KREC) у новорожденных различного гестационного возраста / Е. А. Полякова, Д. В. Остроушко, М. В. Стеганцева, И. Е. Гурьянова, Ю. В. Тимохова, М. В. Белевцев // Мед.-биол. проблемы жизнедеятельности. – 2021. – № 1. – С. 135–142.

5. Оценка влияния перинатальных и интранатальных факторов на количество копий ТРЭК/КРЭК у недоношенных новорожденных / Е. А. Полякова, С. А. Берестень, М. В. Стеганцева, И. Е. Гурьянова, Д. В. Луцкович, М. В. Белевцев // Мед.-биол. проблемы жизнедеятельности. – 2021. – № 2. – С. 121–127.

Статьи в научных сборниках и материалы конференций

6. Показатели TREC/KREC у недоношенных детей в зависимости от активности воспалительного процесса [Электронный ресурс] / Т. В. Гнедько, Ю. В. Рожко, В. И. Капралова, С. А. Берестень, Е. А. Полякова // Актуальные проблемы медицины : сб. науч. ст. Респ. науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвящ. 30-летию юбилею Гомел. гос. мед. ун-та, Гомель, 12–13 нояб. 2020 г. : в 5 т. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Гомел. гос. мед. ун-т ; редкол.: И. О. Стома [и др.]. – Гомель, 2020. – Вып. 21, т. 4. – С. 159–163. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

7. Количественная оценка TREC/KREC у недоношенных новорожденных в зависимости от постнатального возраста / Т. В. Гнедько, Ю. В. Рожко, С. А. Берестень, В. И. Капралова, Е. А. Полякова // Современные перинатальные медицинские технологии в решении проблем демографической

безопасности : сб. науч. тр. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Респ. науч.-практ. центр «Мать и дитя» ; редкол.: Е. А. Улезко [и др.]. – Минск, 2020. – Вып. 13. – С. 267–270.

Тезисы

8. Использование молекул TREC и KREC для оценки восстановления наивных лимфоцитов после трансплантации гемопоэтических клеток при ПИД / Е. А. Полякова, М. В. Стеганцева, И. Е. Гурьянова, М. В. Белевцев // Молекулярная диагностика 2018 : сб. тр. Междунар. науч.-практ. конф., Минск, 27–28 сент. 2018 г. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Федер. служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека ; под ред. В. И. Покровского. – Минск, 2018. – С. 377–378.

9. Количественный анализ молекул TREC и KREC у пациентов с первичным иммунодефицитом после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток / Е. А. Полякова, М. В. Стеганцева, В. А. Лавриненко, Н. В. Минаковская, М. В. Белевцев, О. В. Алейникова // Перспективы детской гематологии-онкологии: мультидисциплинарный подход – 2018 : сб. материалов IX Межрегион. совещ. НОДГО, Санкт-Петербург, 26–28 апр. 2018 г. – [Опубл. в журн.] Рос. журн. дет. гематологии и онкологии. – 2018. – Спец. номер. – С. 44–45.

10. Мониторинг иммунного восстановления после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у пациентов с апластической анемией методом количественного определения кольцевых структур TREC и KREC / Е. А. Полякова, М. В. Стеганцева, И. Е. Гурьянова, Т. В. Шман, Ю. Е. Марейко, М. В. Белевцев, О. В. Алейникова // Актуальные проблемы и перспективы развития детской гематологии-онкологии в Российской Федерации : сб. материалов Десятого конгр. НОДГО, Сочи, 25–27 апр. 2019 г. – [Опубл. в журн.] Рос. журн. дет. гематологии и онкологии. – 2019. – Т. 6, прил. 1. – С. 170–171.

11. Оценка количества копий TREC и KREC у недоношенных новорожденных различной гестационной зрелости в динамике / Е. А. Полякова, И. Е. Гурьянова, Д. В. Остроушко, С. А. Берестень, В. И. Капралова, М. В. Белевцев // Здоровые дети – будущее страны : материалы IV Нац. конгр. С междунар. участием, Санкт-Петербург, 28 окт. 2020 г. – [Опубл. в журн.] Дет. медицина Северо-Запада. – 2020. – Т. 8, № 1. – С. 275.

12. Оценка иммунного восстановления с использованием TREC/KREC у пациентов с острым лимфобластным лейкозом после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток / Е. А. Полякова, Т. В. Филипович, М. В. Стеганцева, Е. Ю. Русакович, Т. В. Шман, И. Е. Гурьянова, М. В. Белевцев // Актуальные проблемы и перспективы развития детской онкологии и гематологии в Российской Федерации – 2020 : сб. материалов I объедин. Конгр.

НОДГО и РОДО, онлайн формат, 23–25 нояб. 2020 г. – [Опубл. в журн.] Рос. журн. дет. гематологии и онкологии. – 2020. – Т. 7, № 4, прил. – С. 113–114.

13. Применение количественной ПЦР в реальном времени для определения кольцевых продуктов реаранжировки генов T- и B-клеточного рецептора у пациентов с первичными и вторичными иммунологическими нарушениями / Е. А. Полякова, М. В. Стеганцева, И. Е. Гурьянова, М. В. Белевцев // Современные проблемы радиационной медицины: от науки к практике : материалы Междунар. науч.-практ. конф., Гомель, 29 апр. 2021 г. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Респ. науч.-практ. центр радиац. медицины и экологии человека ; под общ. ред. А. В. Рожко. – Гомель, 2021. – С. 178–179.

14. Polyakova, E. Monitoring of post-transplant naïve lymphocytes reconstitution in PID patients using TREC and KREC quantification / E. Polyakova, M. Stegantseva, M. Belevtsev // 2021 Virtual annual meeting: immune deficiency and dysregulation North American conference : selected abstr. from the 12th annual meeting of the Clin. Immunol. Soc., 14–17 Apr. 2021. – [Publ.] J. of Clin. Immunol. – 2021. – Vol. 41, suppl. 1. – P. S111. – Abstr. 182.

15. Динамика TREC и KREC у пациентов после терапии анти-CD20 моноклональными антителами [Электронный ресурс] / Е. А. Полякова, М. В. Стеганцева, Т. А. Углова, Д. В. Луцкович, М. В. Белевцев // Современные биотехнологии для науки и практики : сб. тез. VIII Междунар. конф., посвящ. Дню ДНК-2021, Санкт-Петербург, 22–23 апр. 2021 г. / Первый С.-Петерб. гос. мед. ун-т им. акад. И. П. Павлова [и др.] ; под ред.: М. И. Зарайского, В. Л. Эмануэля. – СПб., 2021. – С. 37–38. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

16. Проблемы раннего выявления первичных иммунодефицитов в Республике Беларусь / Е. А. Полякова, М. В. Стеганцева, С. О. Шарапова, И. Е. Гурьянова, М. В. Белевцев // Современные проблемы клеточной инженерии, иммунологии и аллергологии : тез. докл. Междунар. науч. конф., Минск, 20–21 мая 2021 г. / Ин-т биофизики и клеточ. инженерии Нац. акад. наук Беларуси ; редкол.: А. Е. Гончаров [и др.]. – Минск, 2021. – С. 43.

17. Оценка функциональной активности тимуса и костного мозга новорожденных с использованием метода количественного определения TREC и KREC / Е. А. Полякова, Т. В. Гнедько, С. А. Берестень, М. В. Белевцев // Здоровые дети – будущее страны : материалы V Нац. конгр. с междунар. участием. – [Опубл. в журн.] Children's Med. of the North-West. – 2021. – Т. 9, № 1. – С. 291–292.

Инструкции по применению

18. Метод определения кольцевых молекул ДНК TREC и KREC для оценки функционального состояния иммунной системы у пациентов детского возраста : инструкция по применению № 133-1118 : утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 30.11.2018 / ГУ «Республиканский научно-

практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» ; М. В. Стеганцева, Е. А. Полякова, И. Е. Гурьянова, И. С. Сакович, С. О. Шарапова, С. Н. Алешкевич, Ю. С. Жаранкова, Н. В. Минаковская, М. В. Белевцев, О. В. Алейникова. – Минск, 2018. – 16 с.

19. Определение эксцизионных колец ДНК Т- и В-клеточного рецептора методом мультиплексной ПЦР в реальном времени : инструкция по применению № 036-0520 : утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 04.06.2020 / ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», ГУ «Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя» ; Е. А. Полякова, М. В. Стеганцева, С. Н. Алешкевич, Ю. С. Жаранкова, Н. В. Минаковская, Д. В. Остроушко, С. А. Берестень, М. В. Белевцев. – Минск, 2020. – 24 с.

20. Метод диагностики отдельных нарушений, вовлекающих иммунный механизм, у недоношенных новорожденных : инструкция по применению № 120-1120 : утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 29.12.2020 / ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», ГУ «Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя» ; Е. А. Полякова, А. Н. Купчинская, Т. В. Гнедько, В. И. Капралова, М. В. Белевцев. – Минск, 2020. – 11 с.

РЭЗІЮМЭ

Палякова Кацярына Аляксандраўна
Кальцавыя малекулы ДНК Т- і В-клеткавага рэцэптара ТРЭК/КРЭК:
значэнне ў дыягностыцы прыроджаных і набытых
імуналагічных парушэнняў

Ключавыя словы: ТРЭК, КРЭК, першасныя імунадэфіцыты, трансплантацыя гемапаэтычных ствалавых клетак, нованароджаныя.

Мэта працы: павялічыць эфектыўнасць дыягностыкі прыроджаных і набытых імуналагічных парушэнняў шляхам колькаснага вызначэння копій ТРЭК/КРЭК у дзяцей рознага ўзросту, уключаючы перыяд нованароджанасці.

Метады даследавання: клінічныя, лабараторныя, статыстычныя.

Атрыманыя вынікі і іх навізна: распрацаваная тэхналогія вызначэння ТРЭК і КРЭК валодае высокай адчувальнасцю і спецыфічнасцю. Вызначаны дыяпазон нармальнага значэнняў ТРЭК і КРЭК для дзяцей ад 0 да 15 гадоў у якасці дыягнастычнага крытэрыю першасных імунадэфіцытаў. Для пацыентаў з (Т–В–) ЦКІН, атаксіяй-тэлеангіэктазіяй, сіндромам Ніймеген, хваробамі імуннай дысрэгуляцыі характэрна значнае зніжэнне ТРЭК і КРЭК. Для пацыентаў з (Т–В+) ЦКІН характэрна значнае зніжэнне ТРЭК з нармальным значэннем КРЭК. Для пацыентаў з Х-сашчэпленай агамаглабулінеміяй характэрна значнае зніжэнне КРЭК. Для ПД, такіх як сіндром Віскотта–Олдрыча і ХГЗ, пры якіх парушэнні не закранаюць рэаранжыроўку генаў Т- і В-клеткавага рэцэптара, характэрны нармальныя значэнні ТРЭК і КРЭК. Пасля ТГСК КРЭК да +100 дня дасягаюць парога нармальнага значэнняў у пацыентаў з ПД, АА і ВЛЛ. ТРЭК перасякаюць парог нармальнага значэнняў да +180 дня. Тып трансплантацыі, тып кандыцыянавання не ўплываюць на Т- і В-клеткавую рэканстытуцыю. Выкарыстанне ў якасці трансплантата касцявога мозга і пупавіннай крыві дазваляе дабівацца лепшых вынікаў аднаўлення. Паказана неабходнасць ацэнкі функцыянавання імуннай сістэмы ў нованароджаных метадам колькаснага вызначэння ТРЭК і КРЭК.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: вынікі працы могуць быць выкарыстаны для ацэнкі функцыянальнага стану імунітэту ў пацыентаў з прыроджанымі і набытым імуналагічнымі парушэннямі, а таксама ў неданошаных нованароджаных для ранняга выяўлення парушэнняў, што залучаюць імунны механізм.

Галіна прымянення: імуналогія, транспланталогія, клінічная лабараторная дыягностыка.

РЕЗЮМЕ

Полякова Екатерина Александровна
Кольцевые молекулы ДНК Т- и В-клеточного рецептора ТРЭК/КРЭК:
значение в диагностике врожденных и приобретенных
иммунологических нарушений

Ключевые слова: ТРЭК, КРЭК, первичные иммунодефициты, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, новорожденные.

Цель работы: повысить эффективность диагностики врожденных и приобретенных иммунологических нарушений путем количественного определения копий ТРЭК/КРЭК у детей различного возраста, включая период новорожденности.

Методы исследования: клинические, лабораторные, статистические.

Полученные результаты и их новизна: разработанная технология определения ТРЭК и КРЭК обладает высокой чувствительностью и специфичностью. Определен диапазон нормальных значений ТРЭК и КРЭК для детей в возрасте от 0 до 15 лет в качестве диагностического критерия первичных иммунодефицитов. Для пациентов с (Т–В–) ТКИН, атаксией-телеангиоэктазией, синдромом Ниймеген, заболеваниями иммунной дисрегуляции характерно значимое снижение ТРЭК и КРЭК. Для пациентов с (Т–В+) ТКИН характерно значимое снижение ТРЭК с нормальным значением КРЭК. Для пациентов с X-сцепленной агаммаглобулинемией характерно значимое снижение КРЭК. Для ПИД, таких как синдром Вискотта–Олдрича и ХГБ, при которых нарушения не затрагивают процесс реаранжировки генов Т- и В-клеточного рецептора, характерны нормальные значениями ТРЭК и КРЭК. После ТГСК количество КРЭК к +100 дню достигает порога нормальных значений у пациентов с ПИД, АА и ОЛЛ. ТРЭК пересекают порог нормальных значений к +180 дню. Тип трансплантации, тип кондиционирования не оказывают влияния на Т- и В-клеточную реконституцию. Использование в качестве трансплантата костного мозга и пуповинной крови позволяет добиваться лучших результатов восстановления. Показана необходимость оценки функционирования иммунной системы у новорожденных методом количественного определения ТРЭК и КРЭК.

Рекомендации по использованию: результаты работы могут быть использованы для оценки функционального состояния иммунитета у пациентов с врожденными и приобретенными иммунологическими нарушениями, а также у недоношенных новорожденных для раннего выявления нарушений, вовлекающих иммунный механизм.

Область применения: иммунология, трансплантология, клиническая лабораторная диагностика.

ABSTRACT

Polyakova Ekaterina Alexandrovna

**Circular DNA molecules of T and B-cell receptor TREC / KREC:
significance in the diagnosis of congenital and acquired immunological disorders**

Key words: TREC, KREC, primary immunodeficiencies, hematopoietic stem cell transplantation, newborns.

Purpose of the study: to improve the efficiency of diagnosis of congenital and acquired immunological disorders by quantitative determination of TREC/KREC copies of children of various ages, including the neonatal period

Methods and equipment used: clinical, laboratory, statistical.

Research results and their novelty: the developed technology for the quantitative determination of TREC and KREC has high sensitivity and specificity. The range of normal values of TREC KREC for children aged 0 to 15 years has been determined as a diagnostic criterion for primary immunodeficiencies. For patients with (T–B–) SCID, ataxiatelangiectasia, Nijmegen syndrome, immune dysregulation diseases there is a significant decrease of TREC and KREC. Patients with (T–B+) SCID are characterized by a significant decrease of TREC with a normal value of KREC. Patients with X-linked agammaglobulinemia are characterized by a significant decrease of KREC values. PIDs, such as Viscott Aldrich and CGD, in which the disorders do not affect the process of rearrangement of T- and B-cell receptor genes, are characterized by normal values of TREC and KREC. After HSCT, the amount of KREC reaches the threshold of normal values for patients with PID, AA and ALL by +100 days. TREC cross the threshold of normal values by +180 days. The type of transplantation, the type of conditioning do not affect T- and B-cell reconstitution. Bone marrow and umbilical cord blood usage as a transplant allows to reach better recovery results. The need to assess functioning of immune system of newborns by the method of quantitative determination of TREC and KREC has been proved.

Recommendations for use: the results of the study can be used to assess the functional state of immunity in patients with congenital and acquired immunological disorders, as well as in premature infants for early detection of disorders involving the immune mechanism.

Field of applications: immunology, transplantology, clinical laboratory diagnostics.

Подписано в печать 24.02.22. Формат 60×84/16. Бумага писчая «Херох office».
Ризография. Гарнитура «Times».
Усл. печ. л. 1,39. Уч.-изд. л. 1,39. Тираж 60 экз. Заказ 68.

Издатель и полиграфическое исполнение: учреждение образования
«Белорусский государственный медицинский университет».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/187 от 18.02.2014.
Ул. Ленинградская, 6, 220006, Минск.