

*На правах рукописи*

**ГОРДУКОВА  
Мария Александровна**

**РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО  
МЕТОДА АНАЛИЗА МОЛЕКУЛ ДНК ТРЕС И КРЕС ДЛЯ  
ДИАГНОСТИКИ ПЕРВИЧНЫХ ИММУНОДЕФИЦИТНЫХ  
СОСТОЯНИЙ**

14.03.10 - клиническая лабораторная диагностика

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Санкт-Петербург– 2021**

Работа выполнена в ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» Министерства Российской Федерации по делам гражданской обороны, чрезвычайных ситуаций и ликвидации последствий стихийных бедствий

**Научный руководитель:**

**Продеус Андрей Петрович**, доктор медицинских наук профессор

**Официальные оппоненты:**

**Кушлинский Николай Евгеньевич**, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория клинической биохимии, заведующий;

**Владимир Александрович Козлов**, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, ФГБНУ "Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии" Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, научный руководитель

**Ведущая организация:** Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Защита состоится «26» октября 2021 года в 12:00 часов на заседании диссертационного совета Д 205.001.01 при ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 4/2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 197374, Санкт-Петербург, ул. Оптиков, д.54 и на сайте <https://nrcerm.ru>

Автореферат разослан « » 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
к.м.н. доцент

Санников М.В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Первичные иммунодефицитные состояния (ПИД) представляют собой гетерогенную группу врожденных нарушений иммунной системы, которые являются следствием высокопенетрантных мутаций в более чем 300 генах (Picard, 2015). Эти мутации влияют на фенотип или функцию врожденной и/или адаптивной иммунной системы, изменяют функцию Т- и В-лимфоцитов за счет нарушения рекомбинации V(D)J, переключения классов и соматической гипермутации, что приводит к хронизации инфекционного процесса и воспалению (Derroorter, 2018). Характерной особенностью ПИД является повышенная восприимчивость к инфекционным заболеваниям, часто вызываемым микроорганизмами с низкой патогенностью. ПИД могут проявляться аутоиммунными и аутовоспалительными заболеваниями, а также злокачественными новообразованиями (ASCIA 2019; Knight 2019). Тяжелые формы ПИД, такие как тяжелая комбинированная иммунная недостаточность (ТКИН), приводят к раннему развитию рецидивирующих инфекционных заболеваний и смерти детей в первые два года жизни (Тузанкина, 2018). Менее тяжелые ПИД могут позже развить клиническую картину с разной неспецифической симптоматикой, имеют плохой долгосрочный прогноз, приводят к инвалидизации и снижают качество жизни ребенка (Slatter, 2006).

Согласно национальному регистру, распространенность ПИД в РФ составляет 1,35 человека на 100 тыс. населения, в то время как в Европейском регионе - 6-7 случаев на 100 тыс. новорожденных (Seidel, 2019; Мухина, 2019).

Основной проблемой ПИД (в т.ч. ТКИН) является поздняя диагностика, которая влечет за собой неадекватное и несвоевременное лечение таких больных (Тузанкина, 2018). Особенностью ПИД является отсутствие специфических признаков и клинических проявлений, которые можно было бы обнаружить при физикальном обследовании новорожденного. ТКИН является неотложным иммунологическим состоянием и требует быстрой диагностики и лечения. Известно, что результаты лечения пациентов значительно улучшаются, если терапия с помощью ТГСК проводится в возрасте до 3,5 месяцев, до появления тяжелых инфекций и других осложнений (Pai, 2014). Реально это возможно

осуществить только при раннем выявлении детей с ТКИН посредством программы скрининга новорожденных. ТКИН проявляется значительным снижением или отсутствием Т-лимфоцитов, и, таким образом, скрининг новорожденных на Т-клеточную лимфопению является идеальной стратегией для выявления заболевания. Ранняя диагностика и своевременное лечение ПИД позволяют либо вылечить эти заболевания, либо достичь стабилизации общего состояния и нормального качества жизни больных (Щербина, 2016а).

Эксцизионные кольца Т-клеточного рецептора (TREC) представляют собой небольшие кольцевые молекулы эписомальной ДНК, которые образуются во время реаранжировки генов Т-клеточного рецептора (TCR) в наивных Т-клетках и, таким образом, являются суррогатными маркерами для клеток - недавних эмигрантов тимуса (Douek, 1998). В 2005 году Чан и Пак впервые описали применение теста с TREC в крупномасштабном исследовании – популяционном скрининге на ТКИН и другие формы Т-клеточной лимфопении (Chan, 2005).

Также была описана возможность расширения скрининга для других нозологических форм с помощью исследования эксцизионных колец каппа-делеционного элемента (KREC), позволяющих идентифицировать детей с ПИД с В-клеточной лимфопенией. Примером могут служить Х-сцепленная агаммаглобулинемия (XLA) (возникает в результате мутации в гене ВТК) и аутосомно-рецессивные XLA-подобные расстройства. Как и у Т-лимфоцитов гены, кодирующие В-клеточный рецептор, также подвергаются перестройке вариабельных, разнообразных и соединяющихся доменов (V (D) J-рекомбинация) с тем, чтобы образовалось множество уникальных рецепторов к возможным антигенам. Этот процесс завершается формированием функционального рецептора на поверхности В-лимфоцита и также эписомальной кольцевой ДНК - KREC. van Zelm с соавт. описали этот процесс и разработали анализ KREC на основе ПЦР, а Nakagawa с соавт. показали возможность его применения для выявления новорожденных с В-клеточными дефектами, доказав, что у пациентов с XLA отсутствуют KREC в образцах цельной крови и в неонатальных картах Гатри (Nakagawa, 2011; van Zelm, 2007).

**Степень разработанности темы.** Sottini с соавторами предложили одновременное определение TREC и KREC, но в дуплексном варианте и только с использованием прибора 7500 FastReal-Time PCR (Applied Biosystems). Borte et al. в 2012 использовали систему Sottini et al., 2010 в триплексном варианте. Однако в своей работе авторы не описали многие аналитические характеристики предложенного метода (например, нижние пределы детекции и измерений), несмотря на заявляемые низкие пороговые уровни отсечения измеряемых аналитов – 15 TREC/мкл и 10 KREC/мкл – для скрининга врожденных иммунодефицитов. Кроме того, имеющаяся в литературе информация о диагностической значимости одновременного выявления TREC и KREC остается неполной и, в некоторых случаях, даже противоречивой. Описанная авторами система не может быть использована без дальнейшего ее улучшения и адекватной характеристики.

Таким образом, можно заключить, что разработка высокочувствительного метода для одновременного определения концентрации TREC и KREC как в образцах ДНК из периферической крови, так и ДНК, полученной из сухих пятен крови, собираемых в ходе национальной программы скрининга новорожденных, является актуальной задачей, имеющей важное научно-практическое значение.

**Цель настоящей работы** - Разработать и валидировать анализ TREC и KREC для диагностики первичных иммунодефицитных состояний.

**Задачи исследования:**

1. Разработать и валидировать метод проведения мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени» для количественного анализа молекул ДНК TREC и KREC, а также однокопийного нормировочного локуса в геноме человека. Определить его аналитические характеристики.

2. Оценить эффективность различных протоколов выделения ДНК из сухих пятен крови новорожденных из карт Гатри, их совместимость с предложенным методом определения молекул ДНК TREC и KREC.

3. Определить референсные интервалы значений TREC и KREC на популяционной выборке сухих пятен крови новорожденных на картах Гатри.

4. Провести оценку диагностических характеристик разработанного набора реагентов с использованием коллекций образцов от пациентов с подтвержденными диагнозами ТКИИ и агаммаглобулинемия.

5. Охарактеризовать значения TREC и KREC у пациентов разного возраста с синдромами Ди Джорджи, повреждения Ниймегена, атаксией телеангиэктазией (Луи-Бар), Кавасаки, Дауна, с общим варибельным иммунодефицитом, гипер-IgM синдромом, избирательным дефицитом иммуноглобулина А.

6. Охарактеризовать информативность прогноза смертности у детей с тяжелыми состояниями на основе количественного анализа TREC/KREC.

7. У пациента со стабильным снижением количества TREC в цельной крови с неуточненным диагнозом "ОВИН?" провести расшифровку молекулярной этиологии заболевания с помощью экзомного секвенирования.

**Научная новизна работы.** В представленной работе проведена разработка нового высокочувствительного метода для одновременного определения нормированной концентрации TREC и KREC в образцах ДНК из венозной крови и сухих пятен крови для выявления иммунодефицитных состояний как у новорождённых до клинической манифестации заболевания, так и у детей более старшего возраста с целью диагностики различных иммунодефицитных состояний (ИДС), а также с целью дифференциальной диагностики Т- и В-клеточных ПИД от других типов ИДС. Разработан полный протокол определения TREC и KREC в сухих пятнах крови на картах Гатри с целью проведения неонатального скрининга ПИД. Проведено определение референсных значений TREC и KREC, характерных для Российской популяции. Впервые показано, что количество TREC может являться значимым предиктором летального исхода у критически больных детей на первом году жизни. Также впервые проведен анализ значений TREC и KREC при болезни Кавасаки. Разработанный в результате выполнения протокол определения нормированной концентрации TREC и KREC в образцах ДНК человека лег в основу первого получившего регистрационное удостоверение Росздравнадзора набора реагентов для клинического использования.

## **Теоретическая и практическая значимость работы.**

Разработанный протокол лабораторной диагностики ПИД позволяет проводить рутинный скрининг с использованием описываемого в работе отечественный набора реагентов для ранней диагностики ТКИН и других форм первичных иммунодефицитов у новорожденных. Продемонстрированы высокие аналитические и диагностические характеристики разработанного набора реагентов, позволяющего количественно оценивать тимопоз в норме, при комбинированных и изолированных Т- и В-клеточных иммунодефицитных состояниях, при критических состояниях в отделении реанимации. Данная работа является примером того, каким образом должно быть выстроено лабораторное обследование в диагностике ПИД: начиная от сухого пятна крови и заканчивая применением секвенирования следующего поколения для постановки диагноза. Разработанный набор реагентов может применяться в КДЛ, оснащенной стандартным оборудованием для проведения ПЦР в режиме реального времени. Полученные в настоящем исследовании данные о снижении TREC (суррогатный маркер количества наивных Т-клеток) при сепсисе и других осложнениях инфекционного процесса у детей могут являться отправной точкой для дальнейших фундаментальных исследований особенностей ответа иммунной системы при таких типах тяжелых состояний пациентов.

**Методология и методы исследования.** В работе применялись стандартные методы выделения ДНК, геной инженерии, ПЦР в реальном времени, капельной ПЦР, а также различные методы статистической обработки полученных данных в соответствии с типом анализируемых данных и проверяемой гипотезы.

### **Положения, выносимые на защиту.**

1. Разработанная тест-система на основе метода мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени» для определения нормированного количества ДНК TREC, KREC соответствует требованиям, предъявляемым к аналитическим характеристикам клинико-диагностических тестов.

2. Референсные значения TREC и KREC в сухих пятнах крови на картах Гатри определены по международным клинико-диагностическим стандартам и могут быть использованы для программы неонатального скрининга ПИД в РФ.

3. Разработанный метод количественного анализа TREC и KREC имеет высокую диагностическую эффективность для установления диагнозов тяжелая комбинированная иммунная недостаточность и агаммаглобулинемия.

4. Использование метода количественного анализа TREC и KREC имеет клиническое значение как для скрининга, так и для дифференциальной диагностики пациентов с синдромами Луи-Бар, Ниймеген, Ди Джорджи и Дауна.

#### **Степень достоверности и апробация результатов.**

Достоверность полученных результатов исследования обеспечена обоснованностью исходных теоретических позиций, статистически обоснованными объемами исследуемых выборок, использованием современных лабораторных методов, воспроизводимостью результатов исследований, применением адекватных статистических методов и критериев. Объем выборки для определения референсных интервалов был выбран учетом распределения значений аналита TREC и KREC, которое имеет значительную асимметрию и не соответствует нормальному, и составил 2739 образцов сухих пятен крови. В параллели с методом «золотого стандарта» проточной цитометрией с определением популяций лимфоцитов CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+ и CD19+ было проведено 1533 исследования TREC и KREC у детей разного возраста и с разными диагнозами, что позволило оценить характеристики разработанного набора реагентов по отношению к результатам иммунофенотипирования.

**Апробация.** Результаты работы были представлены на конференциях: Объединенный иммунологический форум, Нижний Новгород, 2013 г.; V Всероссийская с международным участием школа-конференция по клинической иммунологии «Иммунология для врачей», Пушкинские Горы, Псковская область, 2014 г.; The 16th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (ESID 2014), Прага, 2014 г.; XX Всероссийская научно-практическая конференция «Достижения и перспективы развития лабораторной службы России», Москва, 2015 г.; The 17th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (ESID 2016), Барселона, 2016 г.; I междисциплинарная научная конференция «Аутоиммунные и иммунодефицитные заболевания», Москва, 2016 г.; XVI Всероссийский научный форум с международным участием

имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге», Санкт-Петербург, 2017 г.; XVII ассамблея «Здоровье Москвы», Москва, 2018 г.; IV московский городской Съезд педиатров с международным участием «Трудный диагноз» в педиатрии. Междисциплинарный подход. Москва, 2018 г.; The 18th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies Лиссабон, Португалия, 2018 г.; Национальная конференция «Клиническая иммунология и аллергология – междисциплинарные проблемы», Москва, 2019 г.; X Конгресс НОДГО «Актуальные проблемы и перспективы развития детской гематологии-онкологии в Российской Федерации», Сочи, 2019 г.; Объединенный иммунологический форум, Новосибирск, 2019 г.; XIX Конгресс детских инфекционистов России с международным участием, Москва, 2020 г.

**Внедрение результатов исследования.** Разработанный набор реагентов успешно прошел клинические испытания в ФГБУ «ННПЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России.

Получено регистрационное удостоверение №РЗН 2018/7447 на медицинское изделие «набор реагентов для диагностики *in vitro* «БиТ-тест» для количественного определения ДНК TREC и KREC методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени по ТУ 21.20.23-001-17608775-2017».

Получено регистрационное удостоверение РК-ИМН-5№017228, которое позволяет использовать разработанный набор реагентов на территории Казахстана.

Научные положения и практические рекомендации внедрены в клиническую практику клинико-диагностического центра детской иммунологии и аллергологии и первого педиатрического отделения (иммунология и аллергология) ГБУЗ "ДГКБ №9 им. Г. Н. Сперанского ДЗМ", а также в работу молекулярно-генетической лаборатории МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского ДЗМО и НИИ Матери и Ребенка г. Кишинев, Молдова.

Результаты полученные в ходе диссертационного исследования используются в процессе обучения врачей на циклах совершенствования и профессиональной переподготовки врачей ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский

университет имени И. М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский Университет).

**Личный вклад автора.** Все результаты, приведенные в настоящей работе, получены самим автором либо при его непосредственном участии.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 24 печатные работы, из них 11 в рецензируемых научных изданиях, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации, 2 публикации в международных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, 1 патент.

**Структура и объём работы.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка процитированной литературы. Работа изложена на 264 страницах, содержит 72 рисунка и 67 таблиц. Список процитированной литературы включает 529 источников.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Разработка мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме "реального времени" для количественного анализа TREC и KREC, а также однокопийного нормировочного локуса в геноме человека**

Первым этапом нашей работы стало клонирование протяженных (более 200 п.н.) фрагментов TREC, KREC, генов IL17RA и альбумина для создания плазмидных стандартных ДНК, которые необходимы как для оптимизации условий ПЦР, так и для определения динамического диапазона измерений, лимита квантификации (LOQ) и лимита детекции (LOD). Полученные рекомбинантные плазмиды линеризовали эндонуклеазами рестрикции, измеряли концентрацию флуорометрически и с помощью ddPCR (см. Материалы и Методы), разводили до концентраций  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$ ,  $10^0$  копий плазмиды на мкл для использования в дальнейших этапах работы

Мы протестировали олигонуклеотидные праймеры и зонды для TREC, описанные во многих работах по скринингу на ТКИИ (Baker, 2009; Borte, 2012) и констатировали недостаточную эффективность амплификации (менее 85% при использовании

четырёх разведений в четыре раза двух случайных ДНК здоровых детей с возрастом не более года). В экспериментах с плавлением с интеркалирующим красителем EvaGreen® и при любой температуре отжига праймеров было показано наличие неспецифичных продуктов амплификации. Таким образом, необходимо было подобрать другую пару праймеров и зондов для мишени TREC, отличающуюся более высокой специфичностью и позволяющей достичь лучших показателей эффективности амплификации.

При выборе праймеров и зондов для мишени KREC также были проанализированы предложенные ранее структуры (van Zelm, 2007). Ввиду наличия большого количества их вторичных структур, разброса в температурах отжига, было необходимо подобрать другую пару праймеров и соответствующий им зонд, которые бы при мультиплексировании с мишенями TREC и нормировочного локуса показывали адекватную эффективность ПЦР и не взаимодействовали друг с другом.

Часто используемый в указанных выше работах обратный праймер на геномный локус beta-actin 5'-CGTCACACTTCATGATGGAGTTG-3', используемый для оценки количества геномной ДНК человека, показал 100% гомологию с псевдогенами на различных хромосомах человека. Это может увеличивать вероятность образования неспецифичных продуктов ПЦР, что также побудило нас найти новый референсный ген и подобрать к нему пару олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченный зонд.

Праймеры и зонды для ПЦР были подобраны с учетом нуклеотидных последовательностей TREC и KREC таким образом, чтобы исключить отжиг на матрице геномной ДНК (перестроенной и не перестроенной в Т- и В-лимфоцитах и в любых других клетках человека не лимфоцитарного ряда), а также с учетом минимизации образуемых в мультиплексной реакции праймер-димеров. Структуры разработанных и в дальнейшем используемых олигонуклеотидных праймеров и зондов приведены в разделе «Материалы и методы». Оптимальную температуру отжига праймеров, при которой в эксперименте не наблюдается образования неспецифических продуктов, но наблюдается высокая эффективность амплификации, подбирали с помощью градиентной

ПЦР с использованием как флуоресцентного зонда, так и интеркалирующего красителя (EvaGreen®) с последующим анализом кривых плавления. Оптимальную концентрацию ионов  $Mg^{2+}$  в реакционной смеси определяли, тестируя коммерчески доступные буферы для ПЦР с различной его концентрацией, она составила 3,5 мМ. Также нами были определены оптимальные концентрации праймеров и зондов, обеспечивающие максимальную эффективность амплификации всех типов ампликонов в области как больших, так и малых концентраций геномной ДНК человека (табл. 1).

**Таблица 1.** Оптимальные параметры разработанной системы: олигонуклеотидный состав

Выявляемая мишень	Название олигонуклеотида	Конечная концентрация в реакции, мкМ	Размер ампликона
sjTREC (T cell receptor excision circles)	TREC2 forward	от 0,45 до 0,65	144 п.н.
	TREC2 reverse	от 0,6 до 0,85	
	TREC2 probe	0,15-0,25	
sjKREC (k-deleting recombination excision circles)	KREC3	от 0,6 до 0,85	112 п.н.
	KREC4	от 0,6 до 0,85	
	KREC4 probe	0,15-0,25	
ВКО - Homo sapiens ген альбумина	Alb-U	0,25-0,35	98 п.н.
	Alb-R	0,25-0,35	
	Alb-PR	0,1-0,15	

Для повышения чувствительности и специфичности ПЦР был применен "горячий старт", который обеспечивался как использованием химически модифицированной Taq-полимеразы, так и с использованием специфических к Taq-полимеразе моноклональных антител. С целью увеличения чувствительности без снижения специфичности был оценен вклад различных соединений, способных улучшать ПЦР: бетаин, ДМСО, БСА, коммерческая ПЦР-смесь "Синтол" с энхансерами (Frackman, 1998), однако, они не оказали существенного влияния на эффективность ПЦР.

### **Аналитическая характеристика разработанной системы**

Для определения LOD (limit of detection - минимальное количество ДНК матрицы, при котором результаты ПЦР положительны в 95% повторов) и LOQ (limit of quantification - наименьшее количество аналита, которое может быть измерено с приемлемой точностью) был проведен мультиплексный анализ 4х разведений стандартных образцов ДНК TREC, KREC и ALB в 20 повторах с построением калибровочной кривой на 4х повторах этих же стандартных ДНК. В проведенном анализе только при концентрации 5 копий на реакцию одна из 20 реплик по каналу TREC (FAM) являлась ложно-негативной. Таким образом, LOD (95%) для мишени TREC составил 5 копий на реакцию. Дальнейший анализ коэффициента вариации на всех 3 мишенях показал, что при концентрации 10 коп/реак коэффициент вариации составил для TREC – 38,3%, что близко к 35% стандартному значению, а для KREC и ALB (%) – 27,5 и 29,9% (менее 35%), соответственно. Таким образом, LOQ составил 10 копий измеряемых ДНК мишеней на реакцию.

Надежность (robustness) - это мера способности аналитической процедуры не менять свои аналитические характеристики при незначительных, но вероятных вариациях. К одной из наиболее значимых таких вариаций относится выполнение анализа на схожих по назначению, но разных (по производителю) приборах. В связи с этим, надежность оценивалась в постановках на приборах CFX96 (Bio-rad), ABI7500 (Applied Biosystems), RG3000 (Corbett Research) и Light Cycler 96 (Roche). Анализ показал, что вне зависимости от используемого прибора сохраняется определенный ранее уровень детекции по всем трем мишеням – не хуже 6 копий на реакцию.

Для того, чтобы оценить чувствительность разработанного набора реагентов для амплификационной части и для этапа экстракции ДНК совместно, был проведен эксперимент, заключающийся в создании пулированных образцов крови, полученных от детей с установленными диагнозами ТКИН и агаммаглобулинемия, подтвержденными данными проточной цитометрии, добавлением к ним крови здоровых детей того же возраста в разном соотношении, и экстракции ДНК из 100 мкл полученных пулированных образцов. Образцы пулированной крови были разбавлены кровью от большого с ТКИН или агаммаглобулинемией в различных соотношениях от

10% до 100%. Анализ показал, что система позволяет воспроизводимо оценивать количество молекул TREC/KREC в модельных образцах крови, содержащих всего 10% крови здоровых детей. Следовательно, можно заключить, что 10 мкл крови достаточно для проведения подобного анализа.

Для проверки аналитической специфичности разработанной ПЦР использовали ДНК клеточных линий нелимфоидного происхождения, несущих неперестроенные T- и B-клеточные рецепторы, а именно - HEK293, HeLa, H460, а также образцы гДНК из мочи и слюны. По результатам проведенного тестирования специфичность составила 100%.

Линейный диапазон количественного определения копийности TREC, KREC и ALB определяли с помощью ПЦР на разведениях стандартных плазмид от  $10^9$  коп/мл до  $10^3$  коп/мл. В области исследуемых концентраций для всех трех мишеней наблюдается линейный диапазон изменения Ct от концентрации с коэффициентом корреляции  $R^2$  не хуже 0,98.

Для оценки вариации значений Ct по всем трем мишеням были рассчитаны среднее значение и стандартное отклонение по 120 запускам на приборе Rotor-Gene 3000 и 50 запускам на приборе CFX96 для калибратора №2 (K2) с концентрацией  $3 \times 10^5$  копий на мл, соответственно, всего было произведено 170 измерений этой точки. В случае набора реагентов Enlite™ Neonatal TREC производитель оценил вариацию путем 108 измерений Ct 7-ми образцов сухих пятен, SD для TREC колебалось от 0,65 до 0,87 (EnLite Neonatal TREC kit). В работе Audrain в многоцентровом исследовании на территории Франции диапазон SD для TREC составил 0,25 – 0,45 (Audrain, 2018). Значения Ct для K2 в 120 постановках на амплификаторе Rotor-gene по TREC характеризовались разбросом Ct от 19,93 до 22,72 (среднее Ct – 21,77 [95% CI 21,68– 21,85]) и стандартным отклонением 0,47, что меньше, чем заявлено в инструкции к набору реагентов производства PerkinElmer, и близко к значению SD, полученному во Франции.

### **Определение референсных интервалов TREC и KREC для скрининга новорожденных**

Сухие пятна крови представляют собой небольшую каплю капиллярной крови, полученной из прокола пальца или из пятки

новорожденных ланцетом, помещенную на бумажный фильтр и затем высушенную. Данный способ получения клинического образца для проведения дальнейших диагностических процедур имеет низкую себестоимость, менее инвазивный, чем отбор венозной крови из локтевой вены, и не требует специальных условий хранения. Для определения референсных интервалов требуется группа клинически здоровых индивидуумов с целью установления «нормальных» значений тестируемого аналита. Определение референсных норм у новорожденных стоит в ряду организационно сложных задач, для которых популяционные подходы с минимальным отбором на стадии формирования выборки и дальнейшим статистическим анализом целевого аналита являются методом выбора (Poole, 2016). Особенно это применимо для редких заболеваний, для которых попадание «больных» субъектов в референсную группу имеет низкую вероятность. К такой группе заболеваний относятся первичные иммунодефицитные состояния (ПИД), и в частности, ТКИН.

Мы использовали популяционную выборку сухих пятен крови новорожденных на картах Гатри размером 2739 индивидуальных образцов для определения референсных интервалов значений молекул ДНК TREC и KREC. Медиана полученных абсолютных значений TREC и KREC составила 195 (CI95%: 185-206) и 185 (CI95%: 176-197) копий на мкл, соответственно, нормированных значений для TREC – 2780 (CI95%: 2690-2840) и для KREC – 2790 (CI95%: 2700-2900) копий на  $2 \times 10^5$  копий гена альбумина или  $10^5$  ядросодержащих клеток. Референсный интервал рассчитывался для 99 и 99,9 перцентилей всех величин TREC и KREC. Для фильтрации «выпадающих» значений был применен критерий Тьюки после логарифмической трансформации данных, ввиду их несимметричного распределения. При анализе абсолютных значений (TREC/KREC на мкл крови) не было идентифицировано «выпадающих» значений TREC, для KREC из дальнейшего анализа было исключено 18 значений (от 9,8 до 13,5). В нормированных значениях TREC/KREC «выбросов» не выявлено. Полученные нижние референсные значения TREC и KREC (на уровне 0,1 перцентиля) составили 458 и 32 на  $10^5$  ядросодержащих клеток, 23 и 17 на мкл крови новорожденных соответственно.

### **TREC и KREC в сухих пятнах крови от умерших детей.**

В ретроспективное исследование вошли образцы от 24 детей, умерших на первом году жизни от генерализованных вирусных и бактериальных инфекций, что позволяет заподозрить у них ПИД. Для проверки этой гипотезы из ГБУЗ «НПЦ ПЗДП им. Г.Е. Сухаревой ДЗМ» были получены карты новорожденных от этих детей, содержащие сухие пятна крови. Из 24 образцов ДНК присутствовала и была пригодна для анализа для 22 образцов. Из них в 18 образцах TPEC и KPEC превышали граничное значение. Из четырех образцов, в которых полученные значения TREC оказались сниженными, трое принадлежали недоношенным детям, для которых незрелость иммунной системы является временным фактором, обусловленным гестационным возрастом. Исследование выявило одного ребенка, в сухом пятне крови которого отсутствовали TREC, а KREC находились на нижней границе нормы. В возрасте 1,5 месяцев пациенту было проведено иммунофенотипирование, подтвердившее результаты анализа TREC и KREC и диагноз ПИД, ТКИН. Несмотря на относительно раннюю постановку диагноза, этот ребенок умер в связи с генерализацией ЦМВ-инфекции.

### **Установление пороговых значений TREC<sub>n</sub> и KREC<sub>n</sub> для различных ИДС**

ТКИН – генетически неоднородная группа заболеваний (более 15 генетических вариантов), но все пациенты имеют общую составляющую: полное отсутствие или очень низкий уровень функциональных Т-лимфоцитов из-за нарушения развития Т-клеток в тимусе, что приводит к выраженным дефектам клеточных и гуморальных параметров иммунитета (Buckley, 2004). Х-сцепленная агаммаглобулинемия (XLA) характеризуется ограниченным количеством или отсутствием зрелых В-лимфоцитов или секретирующих антитела плазматических клеток, острые и хронические заболевания легких являются ведущей причиной смерти (41% случаев) при этом заболевании.

Для определения пороговых нормированных значений TREC для диагноза ТКИН и KREC для диагноза XLA был проведен ROC-анализ, в который вошли образцы цельной крови от 40 детей с ТКИН и 23 детей с XLA. Группу сравнения для ТКИН составил 181

ребенок в возрасте до 1 года, для XLA - 171 ребенок той же возрастной группы.

**Таблица 2.** Пороговые значения TREC/KREC для ТКИН и XLA

Диагноз	ТКИН	XLA
Диагностическое граничное значение TRECn	94	-
Диагностическое граничное значение KRECn	-	12
Чувствительность	97,50%	96,65%
Специфичность	100,0%	100,0%

Аналогично, ROC-анализ для установления пороговых значений TRECn и KRECn был проведен для 37 детей с атаксией-телеангиэктазией, 28 детей с синдромом Ниймеген, 75 детей с синдромом Ди Джорджи, 13 детей с синдромом Дауна, 136 детей с ОВИН, 11 детей с гипер-IgM синдромом, 45 детей с селективным дефицитом IgA, 10 детей с синдромом Кавасаки.

**Таблица 3.** Пороговые значения TREC/KREC для различных ИДС

Диагноз	Атаксия-телеангиэктазия	Синдром Ниймеген	Синдром Ди Джорджи	Синдром Дауна
Диагност. гранич. значение TRECn	318	209	499	209
Чувствительность	91,89%	93,33%	64,00%	84,62%
Специфичность	97,18%	95,32%	85,83%	93,79%
Диагност. гранич. значение KRECn	230	85	679	209
Чувствительность	86,49%	80,00%	84,00%	92,31%
Специфичность	96,61%	97,66%	24,87%	59,89%
	ОВИН	Гипер-IgM синдром	Селект. дефицит IgA	Синдром Кавасаки
Диагност. гранич. значение TRECn	319	>1939	>1414	1270
Чувствительность	36,03%	81,82%	53,33%	50,0%
Специфичность	90,64%	48,02%	70,18%	71,75%
Диагност. гранич. значение KRECn	146	1070	>445	899
Чувствительность	25,00%	9,09%	82,22%	10,00%
Специфичность	92,40%	70,06%	37,43%	75,71%

Следовательно, для разных ИДС исследование TREC и KREC имеет разную диагностическую значимость, а для некоторых - селективный дефицит IgA, гипер-IgM синдром и синдром Кавасаки - не применимо вовсе.

**Тяжелые состояния.** В 2018-2019 гг. было проведено проспективное обсервационное исследование, в которое вошли пациенты в возрасте до 1 года, кому по тяжести состояния потребовалась госпитализация в отделение ИОРИТ в виду необходимости респираторной поддержки, нарушения сердечного ритма или органной недостаточности, гипоперфузии. Статистический анализ распределения значений TRECn, KRECn, СРБ и ПКТ в группах новорожденных «тяжело болеющих» (1-я группа) и «умерших» (2-я группа) с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни и введением поправки Бонферрони позволил выявить статистически значимое снижение TREC ( $p = 0,0004$ ) и увеличение уровня прокальцитонина ( $p = 0,004$ ) во второй группе («умершие»). Распределение значений TRECn в группах - популяционная норма, тяжело болеющие и умершие дети - имело статистически значимые отличия ( $p < 0,0001$ ). Разница медиан для TRECn в исследуемых группах также оказалась высоко статистически значима ( $p < 0,001$ ). различий в количестве KREC в цельной крови в группах «тяжелых состояний» и «умерших» выявлено не было: медианы нормированных значений KREC составили 742,4 и 501,3 копий KREC на  $10^5$  лейкоцитов соответственно ( $p = 0,3963$ ).

**Молекулярная диагностика для пациента с диагнозом "ОВИН?".** Полноэкзомное секвенирование было проведено с целью установления окончательного диагноза 17-летнему мальчику, имевшему в анамнезе признаки общей вариабельной иммунной недостаточности (ОВИН), рецидивирующие легочные инфекции, хроническую вирусную ЭБВ, лимфаденопатию, снижение субкласса IgG3 и отсутствие субкласса IgG4, и количество TRECn на нижней границе нормы, многократно госпитализированного в отделение иммунопатологии многопрофильного стационара. Мы показали наличие гетерозиготной миссенс-мутации E1021K в гене PIK3CD, кодирующем p110d (с.3061G > A [p.E1021K]). Присутствие данной мутации в геноме пациента было подтверждено с помощью секвенирования по Сэнгеру, а ее отсутствие в образцах ДНК от

родителей пациента свидетельствует о возникновении этой мутации de novo. Другие мутации в генах, задействованных в функционировании иммунной системы, также были подтверждены секвенированием по Сэнгеру, включая TLR3 p.L412F, TNFRSF1A p.R121Q (rs4149584), ассоциированные с периодической болезнью. В результате полноэкзомного секвенирования диагноз "ОВИН?" был уточнен и изменен на "синдром активированной фосфоинозитол 3-киназы- $\delta$ ", для которого описаны возможные таргетные пути терапии. Для выявления мутации в PIK3CD нами был предложен тест на основе HRM, что позволило исследовать выборку образцов ДНК от пациентов с диагнозами ОВИН, гипогаммаглобулинемия и гипер-IgM синдром (96 пациентов). Ни у одного обследуемого не была выявлена эта мутация.

### **Выводы**

1. Разработанный нами метод мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени» для количественного анализа молекул ДНК TREC, KREC, гена альбумина показал приемлемые аналитические характеристики (специфичность – 100%, LOD (95%) для 3 мишеней - 5 копий на реакцию, LOQ (95%) для 3 мишеней - 10 копий на реакцию, высокую робастность), позволяющие применить его в клинико-диагностической практике.

2. С использованием разработанного метода нами определены референсные значения TREC и KREC в сухих пятнах крови на картах Гатри (медианы полученных нормированных значений для TREC - 2780 (CI95%: 2690-2840), для KREC - 2790 (CI95%: 2700-2900) копий на  $10^5$  ядросодержащих клеток; нижние границы (99.9% референсный интервал) – 458 TREC и 32 KREC копий на  $10^5$  ядросодержащих клеток), которые можно рассматривать как отправную точку для организации программ неонатального скрининга ПИД, базирующихся на анализе количества TREC/KREC в крови новорожденных.

3. Валидация предложенного метода количественного анализа TREC и KREC на образцах крови пациентов с ТКИН и агаммаглобулинемией показала высокую диагностическую эффективность. Анализ TREC для выявления ТКИН - AUC=0,975 (ДИ95% 0,945 - 0,991), SE - 97,50%, SP - 100,0%, cut-off < 94 копий

TREC/10<sup>5</sup> лейкоцитов; анализ KREC для выявления агаммаглобулинемии - AUC=0,996 (ДИ95% 0,973 - 1,000), SE - 95,65%, SP - 100,0%, cut-off < 12 копий KREC/10<sup>5</sup> лейкоцитов.

4. Скрининг на основе анализа TREC/KREC эффективен для выявления пациентов с синдромами Луи-Бар (TREC AUC=0,984 (0,957 - 0,996) TRECn-D < 318, SE=91,9% и SP=97,2%; KREC AUC=0,961 (0,926 - 0,983) KRECn-D < 230, SE=86,5% и SP=96,6%) и Ниймеген (TREC AUC=0,980 (0,950 - 0,995) TRECn-D < 209, SE=93,33% и SP=95,32%; KREC AUC=0,881 (0,828 - 0,923) KRECn-D < 85, SE=80,0% и SP=97,66%). Несмотря на меньшую диагностическую чувствительность в изолированном варианте, дополнительная квантификация KREC может увеличивать чувствительность скрининга. В динамике, в течение нескольких лет, значения TREC и KREC могут стабильно сохраняться на уровне ниже референсных значений.

5. Скрининг на основе анализа TREC позволяет выявлять значимые количество пациентов с синдромами ДиДжоржи и Дауна, не информативен для пациентов с общим варибельным иммунодефицитом, гипер-IgM синдромом, избирательным дефицитом иммуноглобулина А.

6. Впервые охарактеризованы в отношении количества TREC пациенты с болезнью Кавасаки. Несмотря на описанный ранее дисбаланс субпопуляций Т-клеток, содержание TREC в крови этих пациентов не отличается от популяционного контроля и не может являться диагностическим маркером (AUC=0,533 (0,459 - 0,606).

7. Количество TRECn (AUC=0,822 (CI95%: 0,752 - 0,879) TRECn-D<528, SE=91,67% и SP=63,12%, p < 0,0001) лучше предсказывает летальный исход у критически больных детей на первом году жизни, чем ПКТ (AUC=0,788 (CI95%: 0,714—0,850) Пороговый уровень > 2,62 SE=83,33% и SP=70,21%, p < 0,0001).

8. Экзомное секвенирование является новым эффективным подходом для изучения молекулярных механизмов гетерогенной группы пациентов с ОВИН, что было продемонстрировано на примере пациента с таким диагнозом, для которого выявлено наличие гетерозиготной миссенс-мутации E1021K в гене PIK3CD, кодирующем p110d (c.3061G>A [p.E1021K]). Дальнейший скрининг 47 пациентов с диагнозом ОВИН и «ОВИН?», 39 пациентов с диагнозом гипогаммаглобулинемия или дефицит субклассов IgG и

10 пациентов с диагнозом гипер-IgM синдром показал, что данный тип мутации отсутствует в геномах исследуемых пациентов, что может свидетельствовать о меньшем распространении этой мутации в российской популяции по сравнению с европейскими.

### **Практические рекомендации**

Результаты проведенного исследования позволяют сформулировать практические рекомендации для врачей клинической лабораторной диагностики, иммунологов-аллергологов:

1) Количественный анализ TREC и KREC в образцах ДНК, выделенной из мононуклеарной фракции периферической крови и пятен крови на Гатри картах, рекомендуется для диагностики пациентов с тяжелыми комбинированными иммунодефицитами и агаммглобулинемией, а также для дифференциальной диагностики Т-клеточных и Т- и В-клеточных ПИД.

2) Количественный анализ TREC и KREC в образцах ДНК, выделенной из мононуклеарной фракции периферической крови и пятен крови на Гатри картах, рекомендуется в качестве дополнительного теста для скрининга пациентов с синдромами Луи-Бар и Ниймеген.

3) Рекомендуется повторное проведение количественного анализа TREC и KREC с целью исключения ПИД для детей, попавших в инфекционную реанимацию, для увеличения специфичности теста.

### **Перспективы дальнейшей разработки темы**

Перспективно исследовать возможность применения набора реагентов при других редких состояниях, связанных с изменением количества Т- и В-лимфоцитов, например, при гемофагоцитарном лимфогистиоцитозе и других. Важна разработка алгоритмов применения анализа для определения эффективности ВААРТ у взрослых пациентов.

## **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

Статьи в научных изданиях, входящих в перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, а также в международных базах данных, для опубликования основных научных результатов диссертации по специальности: 14.03.10 - клиническая лабораторная диагностика (биологические науки):

1. Гордукова, М.А. и др. Разработка набора реагентов для количественного определения молекул ДНК TREC и KREC в цельной крови и сухих пятнах крови методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени / М.А. Гордукова и др. // Медицинская иммунология. – 2015. – Vol. 17, № 5. – P. 467-478.

2. Образцов, И.В. и др. Эксцизионные кольца V(D)J рекомбинации В- и Т-клеток как показатели иммунологической реконституции у детей с острым лимфобластным лейкозом / И.В. Образцов, М.А. Гордукова, Е.В. Цветкова и др. // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2016. – Vol. 15, № 4. – P. 42–50.

3. Образцов, И.В. и др. Эксцизионные кольца V(D)J рекомбинации В- и Т-клеток как прогностический маркер при В-клеточном хроническом лимфолейкозе / И.В. Образцов, М.А. Гордукова, Н.А. Северина и др. // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2017. – Vol. 10, № 2. – P. 131–140.

4. Корсунский, И.А. и др. Клинические и эпидемиологические аспекты первичных иммунодефицитных состояний и их раннего обнаружения / И.А. Корсунский, М.А. Гордукова, И.Г. Козлов и др. // Медицинская иммунология. – 2017. – Vol. 19, № 5. – P. 505–512.

5. Корсунский, И.А. и др. Выявление синдрома Ниймеген с помощью исследования уровней эксцизионных колец рекомбинации Т- и В-клеток / И.А. Корсунский, Е.С. Пушкова, С.Б. Зимин, М.А. Гордукова, и др. // Доктор.Ру. – 2017. – Vol. 15, № 144. – P. 35–37.

6. Гордукова, М.А. и др. Случай пациента с диагнозом “Овин?”: выявление гетерозиготной миссенс-мутации E1021K в гене *Pik3Cd* с помощью экзомного секвенирования / М.А. Гордукова и др. // Российский Иммунологический Журнал. – 2018. – Vol. 12, № 1. – P. 54–64.

7. Дерипапа, Е.В. и др. Синдром Ниймеген у детей: клинико-лабораторная характеристика и оценка эффективности различных

видов терапии / Е.В. Дерипапа, Ю.А. Родина, А.Л. Лаберко, М.А. Гордукова и др. // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. – 2018. – Vol. 97, № 4. – P. 116–124.

8. Корсунский, И.А. и др. Целесообразность неонатального скрининга первичных иммунодефицитных состояний / И.А. Корсунский, М.А. Гордукова, А.С. Смирнова и др. // Российский медицинский журнал. – 2018. – № 9. – P. 29–32.

9. Гордукова, М.А. и др. Определение референсных интервалов TREC и KREC для скрининга новорожденных с иммунодефицитными состояниями в РФ / М.А. Гордукова и др. // Медицинская иммунология. – 2019. – Vol. 21, № 3. – P. 527–538.

10. Хачирова, Л.С. и др. Диагностическая значимость эксцизионных колец реаранжировки генов T- и В-клеточных рецепторов для диагностики иммунных нарушений у новорожденных / Л.С. Хачирова, Л.Ю. Барычева, Л.Т. Кубанова, М.А. Гордукова и др. // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2019. – Vol. 14, № 4. – P. 631–635.

11. Deripapa, E. и др. Prospective study of a cohort of Russian Nijmegen breakage syndrome patients demonstrating predictive value of low kappa-deleting recombination excision circle (KREC) numbers and beneficial effect of hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) / E. Deripapa, D. Balashov, Y. Rodina, A. Laberko, N. Myakova, N. Davydova, M. Gordukova и др. // Frontiers in Immunology. – 2017. – Vol. 8, № JUL.

12. Korsunskiy, I.A. и др. TREC and KREC levels as a predictors of lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry / I.A. Korsunskiy, O. Blyuss, M.A. Gordukova и др. // Frontiers in Physiology. – 2019. – Vol. 9, – P. 1877.

Статья, индексируемая в РИНЦ из списка в ВАК не по специальности

13. Корсунский, И.А. и др. Скрининг новорожденных на первичные иммунодефициты и группу риска иммунорегуляторных расстройств, требующих диспансерного наблюдения / И.А. Корсунский, А.П. Продеус, А.Г. Румянцев, М.А. Гордукова и др. // Педиатрия. Журнал им. Сперанского. – 2019. – Vol. 98, № 3. – P. 49–54.

## Патент

14. Гордукова, М.А. и др. Патент на изобретение № Ru 2587540 от 06.08.2015 Способ диагностики состояния иммунной системы пациента и набор праймеров, зондов и стандартных образцов для количественной оценки ДНК молекул TREC, KREC и количества геном эквивалентов ДНК / М.А. Гордукова и др. // – 2015. – – P. 1–18.

## Тезисы докладов и конференций

15. Gordukova, M.A. и др. ESID-0630 The Quantification of T-cell receptor recombination excision circles (TREC) and Ig kappa – deleting recombination excision circles (KREC) in children with predominant T-cell immunodeficiency in Russia / М.А. Gordukova и др. // J Clin Immunol. – 2014. – Vol. 34, – P. S139–S515.

16. Korsunsky, I.A. и др. ESID-0649 The quantification of T-Cell receptor recombination excision circles (TREC) and IG kappa – deleting recombination excision circles (KREC) in children with B-Cell immunodeficiencies / I.A. Korsunsky, M.A. Gordukova и др. // J Clin Immunol. – 2014. – – P. 4121233–4121235.

17. Obratsov, I. V. и др. V(D)J recombination excision circles as markers of T- and B-cell immune reconstitution in patients with acute lymphoblastic leukaemia / I. V. Obratsov. M.A. Gordukova и др. // 10th SIOP Asia 10th SIOP Asia. – 2016. – – P. 16.

18. Образцов, И.В. и др. Разнообразие антигенного репертуара В- и Т-клеток как прогностический маркер при В-ХЛЛ / И.В. Образцов, М.А. Гордукова и др. // Гематология и трансфузиология. – 2016. – Vol. 61, № 1. – P. 154.

19. Gordukova, M.A. и др. A case of CVID patient: exome sequencing revealed heterozygous missense mutation E1021K in the PIK3CD gene / М.А. Gordukova и др. // ESID 2016, 17th Biennial Meeting. – 2016. – – P. 66.

20. Davydova, N.V. и др. ESID6-0278. Abnormalities in the T and B lymphocytes phenotypes in patients with chromosome instability syndromes / N.V. Davydova, A.S. Smirnova, M.A. Gordukova и др. // ESID 2016, 17th Biennial Meeting. – 2016. – – P. 310

21. Davydova, N.V. и др. ESID6-0285. Autoimmune complications in children with chromosome 22q11.2 deletion syndrome / N.V. Davydova, O.V. Shvez, A.S. Smirnova, M.A. Gordukova и др. // ESID 2016, 17th Biennial Meeting. – 2016. – – P. 416.

22. Dorif, A. и др. Quantification of TREC/KREC levels in blood of newborns in Moldova / A. Dorif, M.A. Gordukova, M.L. Filipenko и др. // Romanian journal of rare disease. – 2017. – – P. SP8.5.

23. Korsunskiy, I.A. и др. Trec and krec utility in primary immunodeficiency diseases diagnosis / I.A. Korsunskiy, O. Blyuss, M.A. Gordukova и др. // European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress. – 2018. – – P. 304.

24. Dorif, A. и др. History and opportunities of primary immunodeficiency screening around the world / A. Dorif, M.A. Gordukova, M.L. Filipenko и др. // Proceedings of 5th medical genetics congress with international participation. – 2018. – – P. 151–157.