ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ТИМУСА И КОСТНОГО МОЗГА НОВОРОЖДЕННЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ TREC И KREC

Полякова Екатерина Александровна[1], Гнедько Татьяна Васильевна[2], Берестень Светлана Анатольевна[2], Белевцев Михаил Владимирович[1]

[1] Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии». Ул. Фрунзенская, д. 43, Минский район, Беларусь.

[2] Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя». Ул. Орловская, 66, г. Минск, Беларусь.

E-mail: polyakovakat86@gmail.com

Ключевые слова: тимус; костный мозг; новорожденные; TREC; KREC

Введение. Лимфопоэз начинается на 8–15 неделе эмбрионального развития в лимфоидных сплетениях и тимусе, однако массовое заселение лимфатических узлов предшественниками Т В-лимфоцитов начинается с 16 недели. Вначале появляются Т-лимфоциты, несущие на своей поверхности δ> Т-клеточные рецепторы, участвующие во врожденном иммунитете, затем появляются Т-клетки с αβ ТКР — основные участники адаптивного иммунитета. При формировании αβ-Т-лимфоцитов образуются TREC, как побочные продукты реаранжировки Т-клеточного рецептора, которые составляют около 70% от общего пула Т-лимфоцитов. К 10 неделе 25% тимоцитов содержат на своей поверхности Т-клеточный рецептор. Число таких тимоцитов в ходе эмбрионального развития постепенно увеличивается и после рождения превышает 95%. Очаги костномозгового кроветворения у плода появляются на 12 неделе внутриутробного развития, а с 20 недели костный мозг становится единственным органом кроветворения. Здесь во время формирования В-клеточного рецептора образуются KREC. Которые составляют 30–50% от общего пула В-лимфоцитов При врожденной генетической патологии иммунитета нарушается продукция Т-и-В-лимфоцитов, вследствие чего развивается лимфопения, что является угрожающим жизни ребенка признаком наличия первичного иммунодефицита. Оценить функциональную активность тимуса и костного мозга для раннего выявления первичного иммунодефицита возможно с использованием простого и быстрого метода определения TREC/KREC.

Цель исследования. Определить количество копий TREC и KREC у недоношенных новорожденных.

Материалы и методы. В качестве материала для исследования использовали геномную ДНК, выделенную из «сухого пятна» крови 100 недоношенных новорожденных со сроком гестации от 23,5 до 37,0 недель.

Количество TREC и KREC определяли методом ПЦР в «реальном времени» на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США). В качестве внутреннего контроля использовали ген альбумин (ALB). Для количественной оценки копий TREC и KREC и контрольного гена ALB использовали серийные разведения линеаризированной плазмидной ДНК, содержащих вставки TREC, KREC и альбумин, соответственно, с концентрацией 10^2, 10^3, 10^4, 10^5 копий в 5 мкл. Данные анализировали с помощью программного обеспечения Real-time RCR Data Analis (Bio-Rad, США). Количество копий TREC/KREC рассчитывалось по формуле: [1000000 х среднее TREC (KREC)/среднее ALB/2].

Результаты. У 100 недоношенных новорожденных было выполнено определение количества копий эписомальной ДНК Т-и В-клеточного рецептора TREC и KREC. Полученные значения варьировали в диапазоне для TREC от 301 копии до 324 520 копий (Me = 23 392,0), для KREC в диапазоне от 503 до 290 090 (Me = 12 759,5) копий на 1 млн лейкоцитов периферической крови.

Самое низкое количество копий TREC наблюдалось в группе недоношенных новорожденных 28,0 недели и менее (медиана TREC — 1 043 копии/10^6 клеток), самое низкое количество копий KREC наблюдалось в группе детей 29–32 недели гестации (медиана KREC — 6830 копий/10^6 клеток). Показатели количества копий TREC были достоверно ниже у недоношенных новорожденных с 23,5–35,0 неделю гестации ($p < 0,05$) относительно количества TREC доношенных новорожденных. Количество копий KREC было достоверно ниже с 23,5–32,0 неделю гестации ($p < 0,05$) относительно доношенных детей.

Определение TREC/KREC проводили в динамике у глубоконедоношенных детей с самыми низкими показателями TREC и KREC по достижении ими срока гестации 37,0 недель. С увеличением гестационного возраста количественное содержание TREC/KREC у детей нарастало, что свидетельствовало о нормальном лимфопоэзе новорожденных и исключении генетически детерминированного первичного иммунодефицита. Таким образом низкие показатели TREC/KREC у недоношенных новорожденных могут свидетельствовать о наличии как генетически обусловленной иммунопатологии, так и наличии физиологического иммунодефицита, обусловленного

незрелостью системы иммунитета ребенка. Крайне важно отслеживать в динамике количество TREC/KREC по достижении новорожденного ребенка срока гестации не менее 37,0 недель. Получение низких показателей в динамике свидетельствует о нарушении костномозговой функции, а также функции тимуса, что требует углубленного иммунологического исследования для выявления генетически обусловленных иммунологических нарушений.

Заключение. TREC и KREC могут быть использованы в качестве маркеров функциональной активности тимуса и костного мозга у новорожденных детей.