

УДК: 616.155.011–089.843: [612.112.94:576.3]

DOI: 10.14427/jipai.2023.1.37

Оценка диагностической значимости определения маркеров неогенеза Т- и В-лимфоцитов (TREC/ KREC) после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

Е.А. Полякова, Т.В. Шман, И.Е. Гурьянова, А.С. Игнатович, В.И. Казак, А.В. Любушкин, М.В. Белевцев

Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минск

Assessment of the diagnostic value of T- and B-lymphocyte neogenesis marker (TREC/KREC) identification after hematopoietic stem cell transplantation

E.A. Polyakova, T.V. Shman, I.E. Guryanova, A.S. Ignatovich, V.I. Kazak, A.V. Liubushkin, M.V. Belevtsev

Belarussian research center for pediatric oncology, hematology and immunology, Minsk

Аннотация

Цель: Провести оценку валидности метода определения количества продуктов рекомбинации генов Т- и В-клеточного рецептора у пациентов после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

Материалы и методы: В качестве материала для исследования были использованы образцы ДНК периферической крови здоровых детей (n=98) в возрасте 0,0 (0–15,0) лет, пациентов после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (n=38) в возрасте 7,1 (0,3–15,0) лет.

Результаты и обсуждение: Посредством ROC-анализа выявлено: $AUC_{TREC} 0,9554 \pm 0,0102$ ($p < 0,001$) с диагностической чувствительностью и специфичностью 87,38% и 91,84% соответственно. AUC_{KREC} составила $0,9137 \pm 0,02349$ ($p < 0,001$). Определение KREC после ТГСК позволяет использовать данный метод с диагностической чувствительностью 85,71% и специфичностью 81,45%.

Заключение: Определение маркеров Т- и В-клеточного неогенеза TREC и KREC обладает высокой диагностической информативностью в оценке иммунной реконституции в послетрансплантационном периоде у реципиентов гемопоэтической стволовой клетки с врожденными дефектами иммунной системы и онкогематологическими заболеваниями.

Ключевые слова

TREC, KREC, диагностическая значимость, иммунная реконституция, ROC-анализ.

Summary

Aim: To evaluate methodical validity of T- and B-cell receptor gene recombination product number assessment in patients after hematopoietic stem cell transplantation.

Materials and methods: The DNA of peripheral blood of healthy children (n=98) aged 0.0 (0–15.0) years, who formed a control group, and patients after hematopoietic stem cell transplantation (n=38) aged 7.1 (0.3–15.0) years, was used in the study.

Results and discussion: $AUC_{TREC} 0.9554 \pm 0.0102$ ($p < 0.001$) with diagnostic sensitivity and specificity of 87.38% and 91.84%, respectively, was determined by ROC analysis. AUC_{KREC} was 0.9137 ± 0.02349 ($p < 0.001$). Evaluation of KREC after HSCT allows the method to be used with a diagnostic sensitivity of 85.71% and a specificity of 81.45%.

Conclusion: Identification of T- and B-cell neogenesis markers TREC and KREC is of high diagnostic value in the assessment of immune reconstitution in the post-transplant period in hematopoietic stem cell recipients with congenital defects of the immune system and oncohematological diseases.

Keywords

TREC, KREC, diagnostic value, immune reconstitution, ROC analysis.

Введение

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) относится к трансплантации стволовых клеток из различных источников (костный мозг, стимулированная фактором роста периферическая кровь и пуповинная кровь) для лечения злокачественных и незлокачественных гематологических, аутоиммунных и врождённых, генетически-детерминированных, нарушений иммунной системы [1-2]. Предтрансплантационная терапия с использованием различных методов кондиционирования, а также иммуносупрессивная терапия для предотвращения отторжения трансплантата обычно связаны с глубоким долгосрочным дефицитом гуморального и клеточного иммунитета. После ТГСК восстановление Т- и В-клеток из первичных лимфоидных органов является предпосылкой эффективного раннего восстановления лимфоцитов [3-4]. Восстановление иммунитета является важным событием, которое определяет результаты лечения [5].

Иммунное восстановление различных субпопуляций лимфоцитов происходит последовательно и в разные моменты времени после ТГСК. В то время как клетки врождённого иммунитета восстанавливаются в течение нескольких недель после трансплантации, клеткам адаптивной иммунной системы могут потребоваться месяцы или годы, чтобы полностью восстановиться в отношении как количества, так и выполняемой функции [6]. Лимфоциты в донорском трансплантате пролиферируют у реципиента после трансплантации, но имеют ограниченный репертуар и компетентность. Наиболее важным является неогенез наивных лимфоцитов из первичных лимфоидных органов реципиента для долгосрочной защиты от патогенов, контроля опухоли [5, 7].

Неогенез лимфоцитов с определением субпопуляций наивных клеток можно количественно определить с помощью проточной цитофлуориметрии [8]. Однако для данного метода существует рентабельная альтернатива посредством количественной оценки кольцевых фрагментов ДНК, которые образуются на ранних стадиях формирования Т-клеточных рецепторов (TREC) (с англ. T-cell receptor excision circles) и кольцевых фрагментов рекомбинации каппа-делегирующего В-клеток (KREC) (с англ. kappa-deleting recombination excision circles) [9-12].

В ряде исследований описано, что определение TREC и KREC является эффективным

методом в оценке иммунной реконституции в посттрансплантационном периоде и количественная оценка TREC и KREC может быть информативной при ведении пациентов не только с врождёнными, но и с приобретёнными иммунодефицитами [11-12]. Появление TREC и KREC в периферической крови реципиента является наиболее прогностическим индикатором долгосрочного восстановления Т- и В-клеток. Частый мониторинг реконституции Т- и В-клеточного иммунитета и числа TREC и KREC после ТГСК может помочь выявить тех пациентов, у которых восстановление лимфоцитов не происходит даже в течение года после ТГСК, что требует дополнительных методов или коррекции лечения, которые можно было бы начать своевременно [13].

Цель: Провести оценку валидности метода определения количества фрагментов эксцизии Т- и В-клеточного рецептора (TREC и KREC) у пациентов после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

Материалы и методы

В исследование были включены здоровые дети (n=98) в возрасте 0,0 (0–15,0) лет, которые составили контрольную группу, пациенты (n=38) в возрасте 7,1 (0,3–15,0) лет, которым была проведена ТГСК (n=38). В качестве материала для исследования использовали геномную ДНК, экстрагированную из периферической крови.

Реконституция Т- и В-клеточного звеньев иммунитета после ТГСК была исследована в 3 группах пациентов с иммунологической и онкогематологической патологией: первичный иммунодефицит (ПИД) (n=11), апластическая анемия (АА) (n=15), острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) (n=12). Для определения количества копий ТРЭК/КРЭК после ТГСК у реципиентов производился набор периферической крови на +30, +45, +60, +100, +145, +180, +245, +365 день.

Для полимеразной цепной реакции в «реальном времени» (RQ-PCR) были использованы последовательности олигонуклеотидных праймеров и зондов для специфической амплификации гена внутреннего контроля – альбумина (ALB), Т-клеточного рецептора δ TREC- ψ Ja TREC, каппа-делегирующего элемента KREC [14].

Уровни ALB, TREC, KREC определяли посредством мультиплексной количественной RQ-PCR в 25 мкл реакционной смеси с использованием амплификатора CFX96 (Bio-Rad, США). Реакционная смесь включала 12,5 мкл ДНК-полимеразы в 2-кратном буфере для проведения ПЦР в «ре-

альном времени» (АртБиоТех, Беларусь), 6,25 мкл деионизированной, свободной от нуклеаз воды, 1,25 мкл смеси олигонуклеотидных праймеров и зондов. Постановку осуществляли в двух повторах. Данные анализировали Real_time RCR Data Analysis (Bio-Rad, США).

Стандартные кривые для точного количественного определения ALB, TREC, KREC были получены путём построения калибровочной кривой из последовательно разведённых генетических конструкций от 10^2 до 10^5 копий в 5 мкл, содержащих область соединения гена внутреннего контроля, TREC, KREC.

Значения TREC и KREC вычисляли и выражали в виде копий на 100 000 ядросодержащих клеток-лейкоцитов следующим образом:

$$\left[\frac{\text{среднее SQ TREC (KREC)}}{\text{среднее SQ ALB}} / 2 \right] \times 1\,000\,000 \text{ [15]}$$

Обработку данных и построение графиков выполняли при помощи программного обеспечения «GraphPad Prizm 6.0».

Сравнительный межгрупповой анализ проводили с использованием непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Значимыми считали различия с р-уровнем гипотезы менее 5% ($p < 0,05$). Данные для количественных непараметрических переменных представлены в виде медианы и минимума-максимума значений.

Интегральную оценку результатов бинарной классификации и определение эффективности метода проводили путём построения ROC-кривых с вычислением площади под кривой AUC (с англ. Area Under Curve). Для создания моделей прогностического характера были выбраны признаки с уровнем значимости $p < 0,05$. Значение показателя площади под кривой AUC оценивали согласно экспертной шкале [16].

Исследование проведено в рамках научно-исследовательской темы (НИР: № госрегистрации 20180839. «Разработать метод определения кольцевых продуктов реаранжировки генов Т- и В-клеточного рецептора методом мультиплексной количественной ПЦР в «реальном времени» для диагностики иммунопатологических состояний» (2016-2020). Программа ГПНИ «Медицина и фармация»).

Результаты и обсуждение

Количество копий TREC и KREC определяли в каждой группе нозологий отдельно во всех точках мониторинга. Данные представлены в таблице 1.

В группе ПИД TREC достигали порога нормальных значений у 7/11 реципиентов на +180 день, так же, как и в группе АА у 9/15 реципиентов и ОЛЛ у 11/12 реципиентов. Однако с +30 до +365 дня после ТГСК уровни TREC в группе реципиентов с ПИД, АА и ОЛЛ были значимо ниже в сравнении с контрольной группой. Нами не было выявлено значимых различий по уровням TREC в группах реципиентов с ПИД, АА и ОЛЛ во всех временных точках.

Для определения значимости исследуемых показателей KREC в оценке восстановления В-клеточного звена иммунитета значения, полученные у реципиентов, сравнивали с контрольной группой и между группами нозологий во всех точках проводимого мониторинга. Данные представлены в таблице 2.

Согласно нашим наблюдениям, KREC начинают появляться в периферической крови раньше TREC. Так, в группе ПИД у 8/11 реципиентов на +100 день после ТГСК KREC пересекали нижний порог нормальных значений. Также на +100 день после ТГСК таковые данные наблюдались у 12/15 реципиентов с АА и у 10/12 реципиентов с ОЛЛ.

Согласно нашим наблюдениям в процессе исследования, KREC начинают появляться в периферической крови несколько раньше. Так, в группе ПИД у 8/11 реципиентов на +100 день после ТГСК KREC пересекали нижний порог нормальных значений. Также на +100 день после ТГСК таковые данные наблюдались у 12/15 реципиентов с АА и у 10/12 реципиентов с ОЛЛ.

Однако с +30 до +245 дня после ТГСК уровни KREC в группе реципиентов с ПИД, АА и ОЛЛ были значимо ниже в сравнении с контрольной группой ($p < 0,05$). С +365 дня значения KREC значимо не различались с таковыми в контрольной группе здоровых детей. Во всех временных точках группы реципиентов с ПИД, АА и ОЛЛ нами не было установлено значимых различий между группами.

По причине отсутствия статистических различий по количеству TREC и KREC между группами далее анализ диагностической значимости проводили совместно.

Оценка реконституции Т- и В-клеточного звена иммунитета является важной с точки зрения прогноза и эффективности ТГСК. Использование определения копий TREC/KREC – простой и экономически эффективный метод, поэтому важно оценить и его диагностическую возможность.

Оценка интегральной диагностической информативности метода посредством построе-

Таблица 1. Количество копий TREC в группах реципиентов с ПИД, АА, ОЛЛ после ТГСК

День после ТГСК	ПИД (n=11)		АА (n=15)		ОЛЛ (n=12)	
	Медиана (мин-макс)	Статистическая величина, p	Медиана (мин-макс)	Статистическая величина, p	Медиана (мин-макс)	Статистическая величина, p
+30	0 (0-88)	p=0,00001	0 (0-969)	p=0,0001	0 (0-456)	p=0,0001
+45	0 (0-430)	p=0,00001	0 (0-12)	p=0,0001	0 (0-342)	p=0,0001
+60	0 (0-69)	p=0,00001	0 (0-642)	p=0,0001	0 (0-287)	p=0,0001
+100	23 (0-328)	p=0,00001	61 (0-974)	p=0,0001	265 (0-941)	p=0,0001
+145	134 (12-1804)	p=0,0001	355 (0-1983)	p=0,0001	790 (256 -1958)	p=0,0001
+180	2301 (922-3608)	p=0,0001	3308 (48-7730)	p=0,006	3577 (180-5285)	p=0,005
+245	2432 (625-5149)	p=0,0007	3082 (245-5979)	p=0,003	3553 (945 -5285)	p=0,003
+365	4510 (425-9813)	p=0,004	7033 (365-9695)	p=0,003	5117 (629 -10252)	p=0,002

Примечание: ПИД – первичный иммунодефицит, АА – апластическая анемия, ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз.

Таблица 2. Количество копий KREC в группах реципиентов с ПИД, АА, ОЛЛ после ТГСК

День после ТГСК	ПИД (n=11)		АА (n=15)		ОЛЛ(n=12)	
	Медиана (мин-макс)	Статистическая величина, p	Медиана (мин-макс)	Статистическая величина, p	Медиана (мин-макс)	Статистическая величина, p
+30	0 (0-1042)	p=0,00001	0 (0-1110)	p=0,0001	230 (0-941)	p=0,0001
+45	119 (0-1336)	p=0,00001	723 (0-1063)	p=0,0001	0 (0-942)	p=0,0001
+60	1009 (0-1528)	p=0,00001	180 (0-1707)	p=0,0001	516 (60-1539)	p=0,0001
+100	2578 (0-9587)	p=0,001	2178 (0-8544)	p=0,0001	1856 (100-7260)	p=0,0001
+145	3553 (0-7028)	p=0,0008	6088 (0-9195)	p=0,003	2690 (104 -6958)	p=0,0001
+180	3441 (152-9474)	p=0,013	6249 (1604-11654)	p=0,04	4506 (180-13218)	p=0,02
+245	8948 (77-10544)	p=0,012	6347 (2349-10755)	p=0,03	7373 (326 -13496)	p=0,01
+365	6057,5 (1402-11593)	p=0,18	6990 (1703-11847)	p=0,14	10000 (968 -13370)	p=0,8

Примечание: ПИД – первичный иммунодефицит, АА – апластическая анемия, ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз.

ния характеристических ROC-кривых и определения площади под кривой AUC позволяет оценить, насколько информативен метод/тест при использовании в какой-либо области исследований.

Показатель AUC должен варьировать в диапазоне от 0,5 до 1,0, о высокой информативности результатов свидетельствует показатель AUC, значение которого близко к 1 (таблица 3) [16].

Таблица 3. Интервалы AUC и их диагностическая информативность [16]

Интервал	Диагностическая информативность
0,5–0,6	Неудовлетворительная
0,6–0,7	Средняя
0,7–0,8	Хорошая
0,8–0,9	Очень хорошая
0,9–1,0	Отличная

Согласно опубликованным данным, определение TREC/KREC обладает высокой диагностической чувствительностью и специфичностью в отношении выявления T- и/или B-клеточной лимфопении и у пациентов с врожденными ошибками иммунной системы [17,18]. По изучению диагностической информативности в оценке иммунной системы при вторичных иммунодефицитах опубликовано очень мало данных. Однако применение метода TREC и KREC эффективно позволяет установить дефицит иммунитета [7-10, 12].

Для оценки диагностической информативности определения TREC после ТГСК были выбраны показатели во всех временных точках.

AUC_{TREC} посредством ROC-анализа составила 0,9554±0,0102 с 95% ДИ (0,9352–0,9756) (p<0,001) с диагностической чувствительностью 87,38%, при которой показатель диагностической специфичности составил 91,84% (рис. 1А).

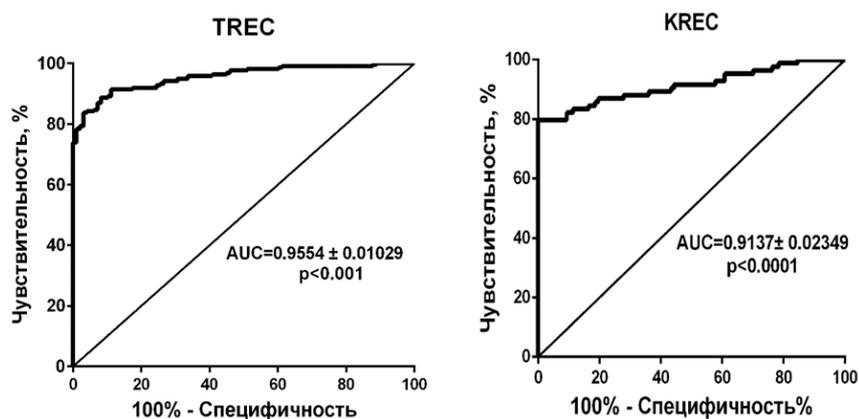


Рис. 1. ROC-кривые показателей TREC (А) и KREC (Б) при определении диагностической значимости метода в оценке иммунной реконституции после ТГСК

С целью оценки диагностической информативности определения KREC после ТГСК были выбраны показатели, которые значимо отличались от контрольной группы с +30 по +245 день.

По результатам ROC-анализа AUCKREC составила $0,9137 \pm 0,02349$ с 95% ДИ ($0,8677 - 0,9598$) ($p < 0,001$). Определение KREC после ТГСК позволяет использовать данный метод с диагностической чувствительностью 85,71% и специфичностью 81,45% (рис. 1Б).

Заключение

Проведенные исследования и полученные данные демонстрируют высокую диагностическую информативность метода количественного определения копий TREC/KREC в послетрансплантационном периоде у пациентов с онкогематологическими заболеваниями и заболеваниями, связанными с врожденными дефектами иммунитета, что позволяет предложить метод определения TREC и KREC в оценке Т- и В-клеточного звена иммунитета у реципиентов после ТГСК.

Литература

- Serana F., Chiarini M., Zanotti C. et al. Use of V(D) J recombination excision circles to identify T- and B-cell defects and to monitor the treatment in primary and acquired immunodeficiencies. *Journal of Translational Medicine*. 2013;V.11. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-119>.
- Myers L.A., Patel D.D., Puck J.M., Buckley R.H. Hematopoietic stem cell transplantation for severe combined immunodeficiency in the neonatal period leads to superior thymic output and improved survival. *Blood*. 2002;V.99:872-878. <https://doi.org/10.1182/blood.v99.3.872>.
- Storek J., Geddes M., Khan F. et al. Reconstitution of the immune system after hematopoietic stem cell transplantation in humans. *Seminars in immunopathology*. 2008;V.30:425-437. <https://doi.org/10.1007/s00281-008-0132-5>.
- Bemark M., Holmqvist J., Abrahamsson J. et al. Translational mini-review series on B cell subsets in disease. Reconstitution after haematopoietic stem cell transplantation – revelation of B cell developmental pathways and lineage phenotypes. *Clinical and experimental immunology*. 2012;V. 167:15-25. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2011.04469.x>.
- Parikh S.H., Satwani P., Ahn K.W. et al. Survival Trends in Infants Undergoing Allogeneic Hematopoietic Cell Transplant. *Journal of the American Medical Association pediatrics*. 2019;V.173:e190081. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2019.0081>.
- Storek J. Immunological reconstitution after hematopoietic cell transplantation - its relation to the contents of the graft. *Expert opinion on biological therapy*. 2008;V. 8:583-597. <https://doi.org/10.1517/14712598.8.5.583>.
- Douek D.C., Vescio R.A., Betts M.R. et al. Assessment of thymic output in adults after haematopoietic stem-cell transplantation and prediction of T-cell reconstitution. *Lancet*. 2000;V.355:1875-1881. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02293-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02293-5).
- Ravkov E., Slev P., Heikal N. Thymic output: Assessment of CD4+ recent thymic emigrants and T-cell receptor excision circles in infants. *Cytometry. Part B, Clinical cytometry*. 2017;V.92:249-257. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21341>.
- Van Zelm M.C., van der Burg M., Langerak A.W. et al. PID comes full circle: Applications of V(D)J recombination excision circles in research, diagnostics and newborn screening of primary immunodeficiency disorders. *Frontiers in Immunology*. 2011;V.2:1-9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00012>.
- Van Zelm M.C., Szczepański T., Van Der Burg M. et al. Replication history of B lymphocytes reveals homeostatic proliferation and extensive antigen-induced B cell expansion. *Journal of Experimental Medicine*. 2007;V.204:645-655. <https://doi.org/10.1084/jem.20060964>.
- Koning C., Plantinga M., Besseling P. et al. Immune reconstitution after allogeneic hematopoietic cell transplantation in children. *Biology of blood and marrow transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2016; V. 22:195-206. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2015.08.028>.
- Hazenbergh M.D., Verschuren M.C., Hamann D. et al. T cell receptor excision circles as markers for recent thymic emigrants: basic aspects, technical approach, and guidelines for interpretation. *Journal of molecular medicine*. 2001;V. 79:631-640. <https://doi.org/10.1007/s001090100271>.

13. Hassan A., Booth C., Brightwell A. et al. Inborn Errors Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation and European Society for Immunodeficiency. Outcome of hematopoietic stem cell transplantation for adenosine deaminase-deficient severe combined immunodeficiency. *Blood*. 2012; V.120:3615–3624. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-12-396879>.

14. Полякова Е.А., Гурьянова И.Е., Шарапова С.О. и соавт. Количественное определение кольцевых фрагментов ДНК Т- и В-клеточного рецептора ТREC/КREC у пациентов с атаксией-телеангиоэктазией с мутацией в гене АТМ. *Иммунопатология, аллергология инфектология*. 2022; №2:6-11. <https://doi.org/10.14427/jipai.2022.2.6>.

15. Sottini A., Ghidini C., Zanotti C. et al. Simultaneous quantification of recent thymic T-cell and bone marrow B-cell

emigrants in patients with primary immunodeficiency undergone to stem cell transplantation. *Clinical Immunology*. 2010;V. 136:217–227. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2010.04.005>.

16. Metz C.E. *Fundamental ROC Analysis*, 2000.

17. Сайтгалина М.А., Останкова Ю.В., Любимова Н.Е. и соавт. Модифицированный метод количественного определения уровней ТREC и КREC в периферической крови у больных с иммунодефицитными состояниями. *Инфекция и иммунитет*. 2022; Т. 12, №5: 981-996. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-MMF-2039>.

18. Rechavi E., Atar L., Simon J.A. et al. First year of Israeli Newborn Screening for severe combined immunodeficiency – Clinical achievements and insights. *Frontiers in Immunology*. 2017; V.8: 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01448>.

Сведения об авторах

Полякова Е.А. – к.б.н., заведующий лабораторией генетических биотехнологий ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии». Адрес: 223053, д. Боровляны, ул. Фрунзенская, 43. E-mail: polyakovakat86@gmail.com.

Шман Т.В. – к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологических исследований «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии». E-mail: t_shman@yahoo.com.

Гурьянова И.Е. – к.б.н., заведующий лабораторией молекулярно-генетических исследований ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии». E-mail: gurjanovairina1985@gmail.com.

Игнатович А.С. – младший научный сотрудник лаборатории генетических биотехнологий ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии». E-mail: ias.work@inbox.ru.

Казак В.И. – младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии». E-mail: vk250998@gmail.com.

Любушкин А.В. – младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии». E-mail: sasha36601@yandex.by.

Белевцев М.В. – к.б.н., зам. директора по научной работе ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии». E-mail: belevtsev_m@mail.ru.

Поступила 06.01.2023.