

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

На правах рукописи

САЙТГАЛИНА Мария Александровна

**ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПАЦИЕНТОВ
ПРИ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЯХ С ПОМОЩЬЮ
КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОЛЕКУЛ ТРЕС И КРЕС В
ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ**

3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика

3.2.7. Иммунология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:
академик РАН, д.м.н., профессор Тотолян А.А.
к.б.н. Останкова Ю.В.

Санкт-Петербург - 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|----|
| ВВЕДЕНИЕ..... | 5 |
| ГЛАВА 1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИММУННОГО СТАТУСА ПРИ ПЕРВИЧНЫХ И ВТОРИЧНЫХ ИММУНОДЕФИЦИТНЫХ СОСТОЯНИЯХ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)..... | 16 |
| 1.1. Первичные иммунодефицитные состояния..... | 16 |
| 1.2. Первичные иммунодефициты, выявляемые у взрослых людей..... | 17 |
| 1.3. Вторичные иммунодефицитные состояния..... | 20 |
| 1.4. Роль клеток адаптивного иммунитета в развитии иммунодефицитных состояний | 22 |
| 1.5. Методы, применяемые для оценки иммунного статуса... .. | 24 |
| 1.6. Генетическая рекомбинация антигенраспознающих рецепторов..... | 26 |
| 1.6.1. Формирование эксцизионных колец TREC и KREC..... | 26 |
| 1.6.2. Процессы генетической рекомбинации, характерные для большинства дифференцирующихся Т- и В-клеток..... | 32 |
| 1.7. Доступные методы количественной оценки TREC и KREC в периферической крови..... | 34 |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ..... | 37 |
| 2.1. Характеристика биологического материала..... | 37 |
| 2.2. Отбор и транспортировка образцов | 39 |
| 2.3. Экстракция нуклеиновых кислот | 40 |
| 2.4. Амплификация нуклеиновых кислот..... | 41 |
| 2.5. Количественная оценка уровней TREC и KREC..... | 44 |
| 2.6. Фенотипирование клеток крови | 45 |
| 2.7. Статистический анализ..... | 46 |
| 2.8. Оценка аналитических характеристик разработанного метода | 47 |
| 2.8.1. Оценка аналитической специфичности..... | 47 |

| | |
|---|-----------|
| 2.8.2. Оценка предела обнаружения и аналитического диапазона измерений..... | 47 |
| 2.8.3. Оценка линейности измерений..... | 48 |
| 2.8.4. Оценка точности измерений..... | 48 |
| 2.8.5. Оценка воспроизводимости результатов..... | 49 |
| 2.9. Оценка вклада ошибок преаналитического этапа в количественный результат анализа | 50 |
| 2.10. Сравнение методов экстракции нуклеиновых кислот..... | 50 |
| 2.11. Оценка эквивалентности результатов анализа при работе с цельной кровью и сухими каплями крови..... | 52 |
| 2.12. Оценка показателей диагностической значимости разработанного метода..... | 52 |
| ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДА КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА ДНК-ФРАГМЕНТОВ TREC И KREC В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ НА ОСНОВЕ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ..... | 56 |
| 3.1. Выбор нормировочных генов | 56 |
| 3.2. Подбор компонентов реакции и условий амплификации..... | 57 |
| 3.3. Подготовка калибраторов..... | 59 |
| 3.4. Оценка результатов..... | 63 |
| ГЛАВА 4. ОПИСАНИЕ АНАЛИТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК РАЗРАБОТАННОГО МЕТОДА..... | 69 |
| 4.1. Аналитическая специфичность..... | 69 |
| 4.2. Аналитическая чувствительность | 70 |
| 4.3. Линейность измерений | 70 |
| 4.4. Точность измерений..... | 72 |
| 4.5. Внутрисерийная и межсерийная воспроизводимость..... | 73 |
| ГЛАВА 5. ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАЗРАБОТАННОГО ПЦР-МЕТОДА..... | 77 |

| | |
|---|-----|
| 5.1. Определение референтных интервалов уровней ДНК-молекул TREC и KREC в периферической крови..... | 77 |
| 5.2. Особенности преаналитического этапа при количественном определении TREC/KREC в периферической крови..... | 79 |
| 5.2.1. Влияние ошибок пробоподготовки на количественный результат анализа TREC/KREC при работе с картами Гатри..... | 79 |
| 5.2.2. Влияние выбора метода экстракции ДНК из сухих капель крови на определяемые уровни TREC/KREC..... | 88 |
| 5.2.3. Оценка эквивалентности результатов при использовании в качестве исследуемого материала цельной крови и сухих капель крови..... | 92 |
| 5.3. Диагностическая значимость разработанного ПЦР-метода..... | 94 |
| 5.3.1. Оценка диагностической значимости метода при первичных иммунодефицитных состояниях..... | 94 |
| 5.3.2. Оценка диагностической значимости метода при инфекционных заболеваниях..... | 100 |
| 5.3.2.1. Уровни TREC и KREC у ВИЧ-инфицированных лиц..... | 100 |
| 5.3.2.2. Уровни TREC и KREC у пациентов с новой коронавирусной инфекцией COVID-19..... | 107 |
| ГЛАВА 6. ОБСУЖДЕНИЕ..... | 120 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ..... | 128 |
| ВЫВОДЫ..... | 129 |
| ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ..... | 130 |
| Перспективы дальнейшей разработки темы исследования..... | 131 |
| СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ..... | 132 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... | 134 |

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Изучение показателей иммунитета при иммунных нарушениях включает исследования количества и функциональной активности основных компонентов иммунной системы. Совокупность количественных и функциональных показателей, отражающих состояний иммунной системы человека в данный момент времени, определяют как иммунный статус. Иммунные нарушения классифицируют, исходя из проявлений различных заболеваний. Выделяют первичные и вторичные иммунодефициты, аутоиммунные, аллергические, лимфопролиферативные заболевания [7, 22, 78, 89, 92, 107].

Первичные иммунодефициты (ПИД) обусловлены генетическими дефектами, в то время как вторичные могут быть следствием развития заболевания, вызванного инфекцией вирусной или другой природы, а также могут быть связаны с иммуносупрессивной терапией или лечением глюкокортикоидными препаратами, например, у пациентов с онкологическими заболеваниями или после трансплантации паренхиматозных органов или стволовых клеток [57, 72, 78, 83, 96]. Вторичные иммунодефициты могут быть следствием операций, травм, экстремальных условий окружающей среды, недоедания, что в конечном итоге неблагоприятно влияет на иммунные реакции организма и повышает риск развития инфекций [96].

подавляющее большинство пациентов, страдающих иммунодефицитами, имеют нарушения в функционировании Т- и В-клеточного компартмента [13, 56, 105]. Наиболее тяжелые проявления иммунодефицитных состояний наблюдают при ранней остановке дифференцировки предшественников лимфоцитов [59]. Дефекты созревания Т-клеток в тимусе приводят к комбинированным нарушениям в реакциях

иммунитета, затрагивающим, как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ. Такие больные страдают частыми оппортунистическими инфекциями, без проведения трансплантации стволовых клеток наиболее тяжелые нарушения приводит к летальным исходам в первые месяцы жизни [78]. Низкие уровни или отсутствие Т-клеток часто фиксируют в сочетании со сниженным уровнем/отсутствием В-клеток в результате ранней остановки дифференцировки предшественников лимфоцитов. У таких пациентов наблюдают нарушения в формировании иммунологической памяти и плазматических клеток, продуцирующих антитела. Дефекты дифференцировки В-клеток в костном мозге и, как следствие, снижение/отсутствие зрелых В-клеток приводят к дефициту сывороточных иммуноглобулинов, повышенной восприимчивости больного к инкапсулированным бактериям, агаммаглобулинемии, общей вариабельной иммунной недостаточности и другим заболеваниям. Более 30% пациентов с ранними нарушениями в развитии Т- и В-клеток имеют необратимые поражение органов, в основном, легких. Раннее начало лечения способствует минимизации и предотвращению негативных последствий [7, 13, 78].

Т- и В-лимфоциты являются уникальными клетками по способности формировать антигенраспознающий рецептор путем реаранжировки генов, кодирующих их рецепторный аппарат. В течение этого процесса формируются стабильные эксцизионные кольца TREC и KREC, которые в дальнейшем существуют в эписомальной фракции того лимфоцита, где они были образованы, не дублируются при митозе во время клеточной пролиферации лимфоцитов и являются суррогатными маркерами функциональной активности тимуса и костного мозга, соответственно [59, 93].

Методы, применяемые для определения дефектов Т- и В-клеточного звена иммунитета, такие как проточная цитометрия, мультиплексный анализ цитокинов, анализ экспрессии генов, секвенирование, моделирование межклеточного взаимодействия *in silico*, имеют ограниченное применение в клинической практике во многих регионах ввиду сложности и большой

стоимости исполнения анализа, а также нехватки специалистов узкой специализации [13, 52, 89].

Одним из методов диагностики T- и B-клеточных иммунодефицитов является количественная оценка эксцизионных колец TREC и KREC в периферической крови, соответственно, с применением Real-time ПЦР [61, 80, 106]. Доступные на российском рынке наборы для количественного определения уровней молекул TREC и KREC в периферической крови имеют ряд ограничений. Все они направлены на диагностику иммунодефицитных состояний у новорожденных и детей, в то время как взрослая часть населения остается не охваченной. Кроме того, существующие тест-системы направлены на выявление нарушений, опосредованных врожденными ошибками иммунитета, и не валидированы для диагностики иммунодефицитов, вызванных инфекционными процессами [3]. Вышесказанное обуславливает актуальность количественной оценки уровней молекул TREC и KREC в периферической крови взрослых и детей с целью диагностики иммунодефицитных состояний, вызванных, в том числе, вирусными инфекциями, что отражено в теме исследования.

Степень разработанности темы

В настоящее время определение уровней TREC и KREC в периферической крови используют в разных странах мира как для скрининга первичных иммунодефицитов среди новорожденных, так и для диагностики нарушений, связанных с дефектами созревания T- и B-лимфоцитов, у детей подростков и взрослых пациентов [7, 13, 22, 52, 59, 61, 80, 106]. Кроме того, анализ уровней TREC и KREC применяют для оценки функционирования иммунной системы после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, для изучения и оценки эффективности антиретровирусной терапии при ВИЧ-инфекции, а также терапии лимфопролиферативных заболеваний [59, 83]. За последние несколько лет некоторые исследования были посвящены количественному анализу молекул TREC и KREC у COVID-инфицированных

больных, однако, главным ограничением этих работ, по мнению самих авторов, является небольшой объем выборки пациентов, не охватывающий все возрастные группы населения [58].

На сегодняшний день на российском рынке зарегистрированы две диагностические тест-системы для количественного определения эксцизионных колец TREC и KREC в периферической крови. Одной из них является набор реагентов для проведения ПЦР-анализа «НеоСкрин SMA/TREC/KREC» (РУ № РЗН 2022/17512 от 08.06.2022, «ДНК-технология», Москва), другой – ПЦР-система «ИММУНО-БИТ» (РУ № РЗН 2021/15873 от 29.11.2021, «АБВ-Тест», Москва). Также для количественной оценки TREC/KREC доступен набор реагентов «EnLite™ TREC-KREC kit» (PerkinElmer, Финляндия), который не зарегистрирован на территории России как медицинское изделие, но может применяться для научных исследований.

Как было сказано выше, перечисленные тест-системы имеют ряд ограничений. Все они направлены на диагностику первичных иммунодефицитных состояний у новорожденных и детей, при этом взрослая часть населения остается не охваченной. Наборы не валидированы для диагностики нарушений, вызванных инфекционными процессами [3]. Также стоит отметить, что все доступные на российском рынке ПЦР-наборы для анализа уровней TREC/KREC в периферической крови используют один ген внутреннего контроля для нормирования количественных результатов. Как известно, не существует идеального нормировочного гена, постоянного в независимости от ткани и состояния клеток в анализируемом образце, оптимальным можно считать подход с одновременным использованием двух и более нормировочных генов [61].

Стоит отметить, что нам не удалось найти ни одного исследования, посвященного описанию референтных интервалов уровней TREC и KREC в периферической крови для разных возрастных групп населения на территории России, в то время как количественное содержание этих молекул может определяться не только возрастом, но и этнической принадлежностью

индивидуума, как было показано на популяции жителей Гонконга в исследовании J.S.Y Kwok и соавторов в 2020 году [61].

Цель исследования: оценить состояние иммунной системы взрослых лиц при острых и хронических вирусных инфекциях для прогноза тяжести течения и исхода заболеваний на основе разработанной тест-системы для количественного определения ДНК-молекул TREC и KREC в периферической крови.

Задачи исследования:

1. Разработать тест-систему для определения уровней молекул TREC и KREC в периферической крови у взрослых и детей на основе технологии ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени;
2. Определить основные аналитические и диагностические характеристики разработанной тест-системы;
3. Определить референтные интервалы содержания молекул TREC и KREC в периферической крови у людей разных возрастных групп;
4. Оценить уровни молекул TREC и KREC в крови ВИЧ-инфицированных лиц с разным уровнем вирусной нагрузки и применяемой терапией;
5. Оценить уровни молекул TREC и KREC в крови больных с инфекцией COVID-19 при разной степени тяжести состояния и разным исходом заболевания.

Научная новизна

Разработана оригинальная тест-система для количественной оценки ДНК-молекул TREC и KREC в периферической крови у взрослых и детей с детекцией результатов в режиме реального времени.

Впервые в тест-системе для количественной оценки ДНК-молекул TREC и KREC методом ПЦР в режиме реального времени использованы два гена «домашнего хозяйства» в качестве внутреннего контроля.

Впервые определены референтные интервалы содержания эксцизионных колец TREC и KREC в периферической крови в шести возрастных группах взрослого населения Санкт-Петербурга.

Впервые валидирована и апробирована тест-система для количественной оценки ДНК-молекул TREC и KREC в периферической крови у лиц с острой и хронической вирусной инфекцией.

Впервые проведена валидация ПЦР-анализа уровней TREC и KREC для прогноза тяжести течения и исхода заболевания в острый период у больных COVID-19, а также для оценки наличия/выраженности иммунодефицитного состояния у пациентов с хронической инфекцией (ВИЧ-инфекцией) в зависимости от сроков с момента инфицирования, вирусной нагрузки, эффективности применяемой антиретровирусной терапии.

Впервые доказана прогностическая значимость оценки уровней TREC и KREC для определения тяжести течения и исхода инфекционных заболеваний.

Теоретическая и практическая значимость

Доказана отрицательная корреляция уровней молекул TREC в периферической крови с увеличением возраста человека, и отсутствие такой корреляции для уровней молекул KREC.

Определены референтные интервалы уровней молекул TREC и KREC в периферической крови у людей разных возрастных категорий.

Доказано достоверное снижение уровней молекул TREC и KREC у ВИЧ-инфицированных пациентов с длительным сроком с момента инфицирования, высокой вирусной нагрузкой, неэффективностью применяемой антиретровирусной терапии.

Доказано достоверное снижение уровней молекул TREC и KREC у тяжелых больных с новой коронавирусной инфекцией COVID-19;

Доказано достоверное снижение уровней молекул KREC у пациентов с новой коронавирусной инфекцией COVID-19 с летальным исходом по сравнению с выжившими больными.

Полученные результаты дают новые представления о механизмах инфекционного процесса при острых и хронических вирусных заболеваниях, а также свидетельствуют о прогностической значимости определения уровней TREC и KREC для определения тяжести течения и исхода инфекционных заболеваний.

Разработанная тест-система может быть использована для выявления нарушений в функционировании Т- и В-клеточного звеньев иммунитета с целью мониторинга эффективности применяемой антиретровирусной терапии у ВИЧ-инфицированных лиц; для прогноза тяжести течения и исхода заболевания в острый период у больных COVID-19.

Разработанная тест-система внедрена в качестве медицинского изделия «Набор реагентов для количественного определения эксцизионных колец TREC и KREC методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени (TREC/KREC-Amp PS)» с регистрационным удостоверением № МИ-RUBY-000031 на территории Российской Федерации и Республики Беларусь.

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработана тест-система для определения уровней молекул TREC и KREC в периферической крови у взрослых и детей на основе технологии ПЦР в режиме реального времени. Проведена широкомасштабная валидация разработанного ПЦР-метода: показано влияние ошибок преаналитического этапа на получение валидных результатов, определены референтные интервалы содержания молекул TREC и KREC в периферической крови для разных возрастных групп населения, показана диагностическая значимость метода для больных с установленным диагнозом первичный иммунодефицит;

2. Иммунодефицитные состояния у ВИЧ-инфицированных пациентов с высокой вирусной нагрузкой и вирусологической неэффективностью применяемой антиретровирусной терапии затрагивают Т-

и В-лимфоцитарные звенья, что проявляется достоверно сниженными уровнями показателей TREC и KREC;

3. При COVID-19 оценка Т- и В-лимфоцитарных звеньев иммунной системы имеет диагностическую и прогностическую значимость: показана диагностическая значимость сниженных уровней TREC и KREC при тяжелой форме заболевания у лиц старше 30 лет; показана прогностическая значимость сниженного уровня показателя KREC для оценки исхода заболевания.

Методология исследования

Исследовательская работа проводилась с соблюдением всех правил научных исследований и основывалась на принципах биоэтики. Теоретическая основа работы состояла в анализе фундаментальных и прикладных исследований. Для реализации цели и задач научной работы были применены стандартные молекулярно-биологические, иммунологические и вирусологические методы, а также разработан оригинальный метод на основе Real-time ПЦР для количественной оценки уровней TREC и KREC в периферической крови. Выполнен сбор и систематизация материалов исследования, проведен статистический анализ данных, позволяющий сделать обоснованные выводы.

Соответствие диссертации паспортам научных специальностей

Соответствие диссертации паспорту научной специальности 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика. Основные научные положения диссертации соответствуют п.1, п.2, п.3, п.9, п.11, п.12 паспорта специальности 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности 3.2.7. Иммунология. Основные научные положения диссертации соответствуют п.3, п.5, п.6, п.9. паспорта специальности 3.2.7. Иммунология.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность полученных результатов исследований, проведенных автором, обеспечена репрезентативным объемом выборок обследованных

пациентов (всего 7851 человек), достаточным количеством выполненных тестов с применением современных лабораторных методов и статистическим анализом полученных данных.

Материалы диссертации доложены и обсуждены на Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых с международным участием «Фундаментальные исследования в педиатрии» (Санкт-Петербург, 2021г.); Шестом российском конгрессе с международным участием "Молекулярные основы клинической медицины - возможное и реальное" (Санкт-Петербург, 2022г.); XII всероссийском ежегодном конгрессе «Инфекционные болезни у детей: диагностика, лечение и профилактика» (Санкт-Петербург, 2022г.); Конференции молодых ученых «Новости инфектологии, микробиологии и биотехнологии 2022», посвященной памяти и 90-летию со дня рождения Рахмановой Азы Гасановны (Санкт-Петербург, 2022); Российской научно-практической конференция «Управляемые и другие социально значимые инфекции: диагностика, лечение и профилактика» (Санкт-Петербург, 2023); XVII Всероссийском научном форуме с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2023).

Личный вклад автора

Планирование темы, определение целей и задач исследования выполнено автором совместно с научными руководителями. Разработка метода количественной оценки кольцевых ДНК-молекул TREC и KREC в периферической крови на основе технологии ПЦР в режиме реального времени, проведение валидации метода для оценки иммунного статуса при инфекционных заболеваниях вирусной этиологии, выполнение лабораторных исследований, статистической обработки и анализа полученных результатов выполнено автором лично совместно с к.б.н. Останковой Ю.В.; в работе по оценке влияния ошибок преаналитического этапа на количественный результат анализа TREC/KREC совместно с автором участвовала м.н.с.

лаборатории иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Седых Анна Васильевна. Работа по фенотипированию клеток периферической крови выполнена совместно с м.н.с. лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Коробовой Зоей Романовной. Автором написан текст диссертации и автореферата.

Реализация результатов работы

Получен патент на изобретение: Останкова Ю.В., Сайтгалина М.А., Любимова Н.Е., Тотолян А.А. «Способ лабораторной персонифицированной диагностики состояния иммунитета пациентов и набор олигодезоксирибонуклеотидных праймеров, и флуоресцентно меченых зондов, и стандартных образцов». Пат. 2786211 с1, 19.12.2022., заявка № 2022107106 от 17.03.2022. Патентообладатель Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера».

На основании представленного метода разработано медицинское изделие «Набор реагентов для количественного определения эксцизионных колец TREC и KREC методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени (TREC/KREC-Amp PS)», получено регистрационное удостоверение № МИ-RUBY-000031 от 11 января 2023 г.

Разработанный метод лабораторной оценки состояния иммунитета используется в практической и научно-исследовательской работе ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера».

Результаты настоящего исследования используются в учебном процессе кафедры иммунологии ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова».

В результате проведенного исследования подготовлен проект методических рекомендаций «Применение метода полимеразной цепной

реакции для выявления первичных иммунодефицитов в целях прогноза и профилактики инфекционных осложнений» МР 3.3. -24 (на стадии утверждения).

Публикации результатов исследования

По теме диссертации опубликованы 22 печатные работы, в том числе 7 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 146 страницах, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, 3 глав результатов собственных исследований, обсуждения результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включающего 107 источников, в том числе 18 отечественных и 89 зарубежных. Текст содержит 27 таблиц и 54 рисунка.

ГЛАВА 1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИММУННОГО СТАТУСА ПРИ ПЕРВИЧНЫХ И ВТОРИЧНЫХ ИММУНОДЕФИЦИТНЫХ СОСТОЯНИЯХ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Иммунный статус - это комплексный показатель состояния иммунной системы, который определяется многими факторами не только врожденными, но и внешними. Под иммунным статусом понимают количественную и качественную характеристику функциональной активности органов и клеток иммунной системы и некоторых неспецифических механизмов противомикробной защиты в определенный момент онтогенеза человека и при конкретных условиях окружающей среды.

Иммунодефицитные состояния представляют собой широкий спектр наследственных (первичных) и приобретенных (вторичных) состояний, характеризующихся специфическими аномалиями, затрагивающими множество гуморальных, клеточных и фагоцитарных иммунологических путей [96, 98].

1.1. Первичные иммунодефицитные состояния

Первичные иммунодефицитные состояния (ПИДС) – это генетически опосредованные заболевания, причиной которых являются молекулярные или органические дефекты, приводящие к нарушениям каскада иммунных реакций, пролиферации, дифференцировки и функции иммунокомпетентных клеток, характеризующиеся инфекционными процессами, аутоиммунными заболеваниями и повышенной предрасположенностью к развитию злокачественных новообразований [78, 92]. Врожденные нарушения механизмов иммунной защиты наиболее часто проявляются, как неспособность осуществлять адекватную противомикробную защиту, что приводит к частым рецидивирующим инфекционным заболеваниям [7, 11].

Изначально первичные иммунодефициты относили к орфанным, крайне редким патологиям, однако, накопление знаний и стремительное развитие

технологий в области клеточной иммунологии и молекулярной генетики во второй половине 20 века, привело к осознанию, что распространенность врожденных ошибок иммунитета не столь мала. На сегодняшний день частота встречаемости ПИДС в мире колеблется от 1,5 до 8 больных на 100 000 населения и зависит от региона (национальных и социальных особенностей проживающих), доступности современных методов диагностики, уровня подготовки медицинских работников [13]. В России усредненный по стране показатель распространенности врожденных иммунодефицитов составляет 1,35 случаев на 100 000 населения. Наибольшая встречаемость таких заболеваний по стране зафиксирована в Центральном Федеральном округе – 2,18 больных на 100 000 жителей, наименьшая – в регионах за Уралом – 0,7 случаев на 100 000 жителей [13].

Современная классификация ПИДС насчитывает более 480 нозологических форм, которые распределены в 10 групп в соответствии с затрагиваемым звеном иммунитета: комбинированные иммунодефициты; комбинированные иммунодефициты с синдромальными признаками; преимущественно дефициты антител; заболевания иммунной дисрегуляции; врожденные дефекты фагоцитов; дефекты внутреннего и врожденного иммунитета; аутовоспалительные заболевания; дефекты комплемента; недостаточность костного мозга и фенкопии врожденных нарушений иммунитета [92].

1.2. Первичные иммунодефициты, выявляемые у взрослых людей

Российский регистр пациентов с ПИДС насчитывает более 2300 больных и включает людей разных возрастных категорий от 0 до 87 лет. Пациенты старше 18 лет составляют 30% этих больных. Около 54% взрослых больных – это люди, диагноз которым был установлен в детском возрасте, но, на данный момент, достигшие 18 лет. Остальные 46% - это пациенты, диагноз которым был поставлен во взрослом возрасте. По данным реестра

Европейского общества иммунодефицитов взрослая группа составляет также около 30% больных [7, 13].

Как в нашей стране, так и за рубежом в последние годы прослеживается тенденция увеличения количества взрослых пациентов с ПИДС. Это может быть связано с совершенствованием диагностических алгоритмов и подходов к лечению, что продлевает пациентам жизнь, а также с ростом информированности врачей различных специализаций относительно возможных проявлений иммунодефицитных состояний [13, 17, 89, 92, 100].

В группе взрослых больных, перешедших из педиатрического звена, сохраняется многообразие нозологических форм, характерное для детей, однако снижается количество синдромальных форм ПИДС. У взрослых, для которых диагноз был определен после наступления совершеннолетия, преобладают гуморальные дефекты (до 48%) и дефекты комплемента (до 47%) за счет манифестации Наследственных ангиоотечков. Также среди пациентов старше 18 лет регистрируют случаи дефектов фагоцитоза, иммунной дисрегуляции, аутовоспалительные заболевания, нарушения клеточного иммунитета, первичные дефициты неуточненные. В редких случаях могут быть выявлены более тяжелые формы ПИДС, например, синдром Гуда или синдром Ди Джорджи [13, 89].

Наиболее распространенными врожденными иммунопатологиями среди взрослого населения являются селективный дефицит IgA и общая вариабельная иммунная недостаточность (ОВИН).

Частота встречаемости по разным источникам и в зависимости от региона варьирует от 1:400 до 1:20000. Для данной патологии характерен низкий уровень сывороточного IgA ($< 0,05$ г/л), при нормальном уровне других классов иммуноглобулинов. Часто заболевание протекает в бессимптомной форме, при этом у больных отмечают нормальную выработку антител в ответ на вакцинопрофилактику. Однако в литературе подробно описаны как возможные клинические проявления при селективной недостаточности IgA, так и частые сопутствующие заболевания. У пациентов

отмечают повторяющиеся инфекции дыхательных путей, пищеварительной и мочеполовой системы, атопические расстройства, пищевые аллергии, неврологические и аутоиммунные заболевания (ревматоидный артрит, системная красная волчанка и другие). У некоторых пациентов с диагнозом Селективный дефицит IgA впоследствии развивается клиническая картина общей переменчивой иммунной недостаточности (ОВИН) [13, 17, 63].

ОВИН является вторым по распространенности врожденным иммунодефицитом: от 0,05 до 1 случай на 10000 [39, 81, 85]. Большой проблемой при диагностике является чрезвычайно огромная переменчивость клинических проявлений патологии. Патогенез заболевания до сих пор является не до конца изученным, а молекулярная причина болезни часто остается не установленной. У большинства пациентов фиксируют сниженные уровни IgG при нормальных или слегка сниженных уровнях IgA, в некоторых случаях отмечают также сниженные уровни IgM. Характерной чертой является нарушение выработки антител в ответ на вакцинацию, а также нарушение продукции антител к полисахаридам [38]. Типичным проявлением, как и при других ПИДС, являются частые инфекционные процессы разной этиологии. Почти у всех пациентов наблюдаются рецидивирующие синуситы, отиты и бронхиты, примерно в двух третях случаев у пациентов развиваются пневмонии [27, 36]. Хроническое воспаление и рецидивирующие инфекции, связанные с ОВИН, могут приводить к тяжелым бронхоэктазам, легочному фиброзу [31, 65, 91], гранулематозной инфильтрации легких, интерстициальным пневмониям, спектру ревматологических патологий и другим осложнениям [27, 76].

Кроме того, для взрослых лиц характерны состояния, клиника которых сходна с фенотипическими проявлениями ОВИН: гипер-IgM синдром, X-сцепленный гипер-IgM синдром с эктодермальной дисплазией, X-сцепленный лимфопролиферативный синдром, X-сцепленная агаммаглобулинемия и другие [28, 38]. У многих таких пациентов временной промежуток между

проявлением симптомов и установлением диагноза составляет более десяти лет [37, 38].

1.3. Вторичные иммунодефицитные состояния

Вторичные иммунодефициты можно определить как временное или стойкое нарушение функций клеток или тканей иммунной системы, вызванное факторами, не присущими иммунной системе: влиянием окружающей среды, инфекционными процессами, лекарственными препаратами, недостаточностью питания и другими. Так, при инфекционных процессах различного генеза, клеточная смерть, чрезмерное высвобождение токсичных метаболитов, нарушение барьеров кожи и слизистых оболочек могут влиять на состояние иммунного статуса пациента [96].

За последние десятилетия наиболее изученным вторичным иммунодефицитом стал синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД), вызванный инфекцией вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). Главной мишенью для вируса являются Т-лимфоциты, несущие на своей поверхности рецептор CD4⁺, однако и другие клетки гемопоэтического ряда, могут быть инфицированы. Один из корецепторов CXCR4, необходимый для проникновения вируса в клетку, экспрессирован на поверхности наивных Т-лимфоцитов и первичных тимоцитов. Таким образом, потенциально, ВИЧ может поражать не дифференцированные и наивные только вышедшие на периферию Т-лимфоциты [41, 57]. В отсутствии терапии у пациентов развивается Т-клеточная лимфопения посредством нескольких механизмов: ВИЧ-индуцированного апоптоза, апоптоза, вызванного неспецифической иммунной активацией, вирусным цитопатическим эффектом, цитотоксичностью Т-клеток по отношению к ВИЧ-инфицированным клеткам и аутофагией, - что приводит к повышенной восприимчивости организма хозяина к условно-патогенными микроорганизмами. У ВИЧ-инфицированных лиц, получающих действенную антиретровирусную терапию, в большинстве случаев наблюдают сохранную иммунную функцию [57].

В связи с пандемией новой коронавирусной инфекции 2019 года большой интерес вызывает влияние вируса SARS-CoV-2 на функционирование клеток иммунной системы. Накопленные на сегодняшний день знания о патогенезе инфекции COVID-19 позволяют говорить о том, что тяжесть состояния пациентов определяется гиперактивацией иммунной системы, и, как следствие, выработкой чрезмерных количеств цитокинов, тромбозами, множественными мононуклеарными клеточными инфильтрациями органов, тяжелыми лимфопениями. Эти события сопровождаются истощением как циркулирующих, так и дифференцирующихся Т- и В-клеток, нарушением сигнального пути IFN- α и других цитокиновых молекул, деструкцией легочной ткани, гипоксией, что является предрасполагающими факторами к вторичным бактериальным инфекциям, иногда развивающимся в жизнеугрожающие формы и приводящими к летальным исходам [1, 9, 24, 54, 60, 72]. Восстановление количества лимфоцитов может играть важную роль для выздоровления пациента ввиду восстановления адаптивного противовирусного ответа при лимфопении, вызванной инфекцией COVID-19 [58].

Еще одним инфекционным заболеванием, действие на организм которого приводит к иммуносупрессии, сохраняющейся в течение месяцев или лет после заражения, является корь. Ингибирование пролиферации лимфоцитов в зараженном организме приводит к развитию Т- и В-клеточных лимфопений, сдвигу в сторону цитокинового ответа Т-хелперов 2 типа, снижению уровней клеток памяти, что способствует повышенному риску заражения другими патогенами [96].

Инфекционные заболевания как следствие поражения легких микобактериями туберкулеза являются причиной смерти миллионов людей во всем мире. У пациентов с микобактериальной инфекцией наблюдается снижение лимфопролиферативных реакций, повышенная продукция IFN- γ , подавление функций антигенпрезентирующих клеток и CD4⁺ Т-лимфоцитов,

что делает больного восприимчивым к другим инфекционным заболеваниям [19, 96].

Ятрогенные вторичные иммунодефициты могут развиваться на фоне применяемых лекарственных препаратов, направленных на лечение различных воспалительных процессов, аутоиммунных нарушений, аллергических заболеваний, злокачественных новообразований, отторжения трансплантата и других состояний [96].

Помимо описанных выше причин, на развитие вторичных иммунодефицитных состояний могут оказывать сильное влияние дефицит питания, метаболические нарушения (например, сахарный диабет), тяжелые, обширные травмы, ожоги и хирургические вмешательства, связанные с серьезными повреждениями гомеостаза, условия окружающей среды [21, 96].

1.4. Роль клеток адаптивного иммунитета в развитии иммунодефицитных состояний

Индивидуальная предрасположенность организма к инфекционным заболеваниям обусловлена нарушениями функционирования и регуляции как врожденной, так и адаптивной иммунной системы. На развитие адаптивных иммунных реакции влияет множество факторов, в том числе, дифференцировка и пролиферация Т- и В-лимфоцитов, функционирование механизмов Т-клеточного сигналинга для развития В-клеточного иммунитета, экспрессия иммуноглобулинов В-лимфоцитами. Низкие уровни клеток-предшественников лимфоцитов препятствуют адекватному развитию как клеточного, так и гуморального иммунитета [26].

Инициация развития иммунной системы человека происходит на ранних стадиях эмбриогенеза. Лимфоциты и полиморфноядерные клетки берут свое начало в фетальной печени, а на более поздних этапах развития организма в гемопоэтических стволовых клетках (ГСК) костного мозга. После седьмой недели беременности предшественники Т-клеток, экспрессирующие на своей поверхности молекулы CD34, мигрируют в тимус, где

дифференцируются в субпопуляции CD4⁺ или CD8⁺ Т-лимфоцитов, несущих на своей поверхности Т-клеточный рецептор αβ- типа [30]. αβ- Т-клетки покидают тимус в фенотипически и функционально незрелом состоянии, их называют недавними эмигрантами из тимуса (RTE - recent thymic emigrants). Недавние эмигранты из тимуса играют жизненно важную роль в активации адаптивных иммунных ответов, в том числе в распознавании антигенов [45].

Фолликулярные CD4⁺ Т-хелперные клетки продуцируют IL-21, костимулирующие молекулы ICOS, ряд других цитокиновых молекул высокие уровни хемокиновых рецепторов CXCL13 и CXCR5, что инициирует реакции лимфатических зародышевых центров, стимулирует В-клетки к пролиферации, регулирует переключение классов экспрессируемых иммуноглобулиновых молекул, обеспечивает созревание аффинности антител [35, 67]. Механизмы распознавания и элиминации инфицированных патогеном клеток опосредованы функционированием CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) - важных эффекторов противовирусного и противоопухолевого иммунитета [25]. Презентация патогенных, в том числе вирусных, пептидов в составе молекул МНС класса I является триггером для активации ЦТЛ, их последующей дегрануляции и гибели клеток-мишеней [95].

Мультипотентные лимфоидные предшественники CD34⁺CD7⁺ и CD34⁺CD10⁺CD19⁺ в костном мозге дифференцируются в В-лимфоциты [84]. Созревание и дифференцировка фетальных В-клеток включает ступенчатую активацию транскрипционных факторов и соматическую рекомбинацию экзонов V, D, J и H генов иммуноглобулинов, что приводит к накоплению молекул IgD и IgM на поверхности В-клеток [51]. Дифференцировка В-лимфоцитов в костном мозге приводит к образованию двух популяций - В-1 клеток и В-2 клеток, в зависимости от экспрессии поверхностной молекулы CD5 (присутствует на поверхности В1-лимфоцитов). Популяция клеток В1-является минорной и составляет не более 5% от общего количества В-лимфоцитов. В1-клетки являются основными продуцентами поливалентных

антител (преимущественно IgM и IgG3), вырабатываемых по Т-независимому пути в лимфоидной ткани слизистых оболочек и обеспечивают раннюю защиту от бактериальных и вирусных инфекций после рождения [12, 47, 48]. Т-зависимая активация рецепторов В-2 лимфоцитов индуцирует перекрестное связывание поверхностных молекул иммуноглобулинов, связывание с трансмембранным белком CD79 и запуск сигнальных процессов, включающих фосфорилирование родственных Src киназ (Lyn, Fyn, fgr, Blk и LCK), что приводит к активации В-2 клеток. Именно В-2-клетки формируют В-зону первичного лимфоидного фолликула, вовлекаются во взаимодействие с Т-лимфоцитами и образуют В-клетки зародышевых центров во вторичных фолликулах. В-2-лимфоциты способны к переключению изотипа иммуноглобулинов, а также к дифференцировке в В-клетки памяти и плазмциты с последующей секрецией специфических антител [12, 97]. В-2-клетки несут на поверхности молекулы МНС-I, МНС-II, костимулирующие молекулы CD40, CD86, а при активации – также CD80, что позволяет им выполнять функции «профессиональных» антигенпрезентирующих клеток (АПК) [16].

Нарушения в процессах дифференцировки лимфоцитов на ранних этапах приводят к снижению уровней или полному отсутствию клеток - недавних эмигрантов из тимуса и/или зрелых наивных В-клеток, что негативно влияет на развитие реакций иммунной системы, и может приводить к развитию иммунодефицитных состояний.

1.5. Методы, применяемые для оценки иммунного статуса

Поскольку компоненты иммунной системы задействованы в функционировании всех органов и систем человека и участвует не только в защите организма от внешних факторов, но также регулируют процессы поддержания гомостаза, нарушение их функций приводит к чрезвычайно гетерогенным клиническим проявлениям. Большое многообразие фенотипических признаков иммунодефицитных состояний, повышенная

восприимчивость пациентов к различным возбудителям, и, как следствие, частые инфекционные процессы различной этиологии, развитие аутоиммунных и онкологических процессов обуславливают проблему, которая остается актуальной и на сегодняшний день – сложность постановки правильного диагноза. Многие больные длительное время наблюдаются под диагнозами сопутствующих заболеваний - хронических бронхитов, синуситов, пневмоний и других [17, 22].

Ввиду сложной диагностики иммунодефицитов время между датой манифестации заболевания и датой постановки диагноза может составлять месяцы или годы, в некоторых случаях это время составляет больше десяти лет. Длительная отсрочка постановки диагноза не позволяет своевременно назначать действенную терапию, в то время как многие пациенты являются urgentными и требуют срочного вмешательства во избежание необратимых осложнений, инвалидизации и летальных исходов [7, 43, 46].

Стремительное развитие биомедицинских технологий во второй половине 20 века позволило применять для диагностики иммунных нарушений такие высокоинформативные методы как многоцветная проточная цитометрия, мультиплексный анализ цитокинов, анализ экспрессии генов, секвенирование, а также моделирование межклеточного взаимодействия *in silico*.

Поскольку иммунодефицитные состояния часто связаны с гематологическими проявлениями, такими как периферические цитопении, в частности, лимфоцитопении, лабораторная оценка состояния иммунной системы в обязательном порядке включает анализ основных субпопуляций лимфоцитов периферической крови пациентов [83, 88]. Одним из применяемых методов оценки субпопуляций Т- и В-клеток в лабораторной практике является метод проточной цитофлуориметрии - технология распределения клеток в зависимости от их происхождения и морфологических характеристик.

Исследование патогенеза иммунодефицитов на молекулярно-генетическом уровне позволило установить, что большинство из них ассоциировано с мутациями в генах, кодирующих различные сигнальные пути, управляющие развитием, функционированием, взаимодействием клеток и тканей иммунной системы. Применение в диагностических алгоритмах технологий секвенирования нового поколения (Next Generation Sequencing, NGS) до сих пор позволяет выявлять не описанные ранее генетические дефекты, ведущие к развитию иммунопатологий [7, 78]. Сложность выявления генов-кандидатов заболеваний связана с тем, что патогенные нуклеотидные замены в одном и том же генетическом локусе могут приводить к развитию разных форм и проявлений иммунной недостаточности. Описаны генетические дефекты, которые не относятся к иммунной системе и системе кроветворения, однако также ведут к развитию нарушений в иммунной защите [7, 107].

Значимыми недостатками перечисленных выше методов диагностики являются необходимость дорогостоящего оснащения лаборатории, узконаправленной квалификации специалистов, больших затрат времени и финансов на проведение трудоемкого анализа, зачастую такие подходы остаются недоступными в клинической практике во многих регионах.

В начале 21 века Т- и В-клеточные лимфопении было предложено выявлять с помощью количественного анализа молекул кольцевой эписомальной ДНК – эксцизионных колец TREC (T-cell receptor excision circle) и KREC (Kappa-deleting recombination excision circles) в периферической крови больных, соответственно. Такой подход позволяет выявлять раннюю остановку дифференцировки предшественников лимфоцитов, поскольку формирование молекул TREC и KREC происходит на ранних этапах развития Т- и В-клеток, соответственно [98].

1.6. Генетическая рекомбинация антигенраспознающих рецепторов

1.6.1. Формирование эксцизионных колец TREC и KREC

В основе формирования чрезвычайно большого разнообразия антигенраспознающих рецепторов лежат несколько механизмов, одним из которых является рекомбинация зародышевых сегментов рецепторных генов лимфоцитов. В зародышевом геноме нуклеотидные последовательности, кодирующие полипептидные цепи Т- и В-клеточных рецепторов, разобщены между собой, как следствие, в генах отсутствует функциональный первый экзон. Такая конфигурация рецепторных генов свойственна всем клеткам организма кроме зрелых лимфоцитов, и называется зародышевой конфигурацией рецепторных генов. В ходе антигеннезависимой дифференцировки В-лимфоцитов в костном мозге и Т-лимфоцитов в тимусе, генетические сегменты, кодирующие полипептидные цепи антигенраспознающих молекул, сближаются и формируют зрелый активный рецепторный ген [18, 94].

В геноме человека выделяют шесть генетических кластеров (скоплений генов), кодирующих указанные полипептиды: H-, λ , κ -цепи В-клеточных рецепторов и α -, β -, γ - цепи Т-клеточных рецепторов. Последовательности, кодирующие δ -цепь, расположены внутри гена α -цепи. Эти генетические кластеры расположены на четырех хромосомах: 2 (κ -цепь), 7 (β -, γ - цепи), 14 (H-, α -, β -цепи) и 22 (λ -цепь) (Таблица 1) [18, 94, 98].

Таблица 1. Генетическая структура антигенраспознающих рецепторов

| Молекула | Цепь | Ген | Хромосома | Структура транскрипта | Число сегментов | | | |
|--------------------|-----------|-----|-----------|-----------------------|-----------------|----|----|---|
| | | | | | V | D | J | C |
| Ig | H | IGH | 14q | VDJC | 45 | 12 | 14 | 9 |
| | κ | IGK | 2p | VJC | 18 | - | 4 | 1 |
| | λ | IGL | 22q | VJC | 30 | - | 4 | 4 |
| TCR $\alpha\beta$ | α | TRA | 14q | VJC | 45 | - | 61 | 1 |
| | β | TRB | 7q | VDJC | 41 | 2 | 14 | 2 |
| TCR $\gamma\delta$ | γ | TRG | 7p | VJC | 6 | - | 5 | 2 |
| | δ | TRD | 14q | VDJC | 3 | 3 | 4 | 4 |

Каждый генетический кластер несет в себе ряд генетических сегментов. Сегменты, кодирующие константные домены антигенраспознающих структур, называют С-генами. V-гены кодируют 95-96 аминокислотных остатков варибельного домена рецептора, они расположены в 5'-части кластера. В зародышевой конфигурации рецепторных генов V-сегменты и С-гены пространственно разобщены, между ними расположены небольшие последовательности в 35-50 пар оснований – соединительные J-сегменты (от Joining). В некоторых кластерах (H, B, D) присутствуют D-сегменты (от Diversity) (Рисунок 1). Совокупность сегментов V, D (при наличии) и J часто называют V-генами или V-областями [18].

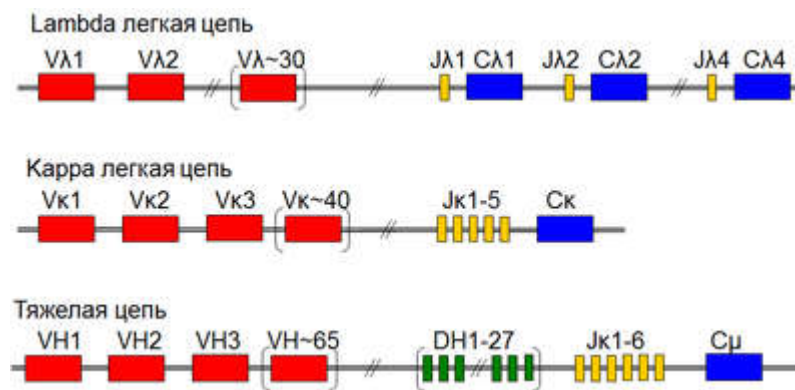


Рисунок 1. Зародышевая конфигурация генетических сегментов, кодирующих полипептидные цепи иммуноглобулинов

Между V-, D- и J-сегментами расположены рекомбинационные сигнальные последовательности (RSS — *Recombination signal sequences*), которые содержат определенные консервативные структуры. На самых ранних этапах дифференцировки лимфоцитов начинается сложный процесс генетических рекомбинаций или объединения участков ДНК, кодирующих V-, D-, J- и С-сегменты. В ходе дифференцировки лимфоцита в геномной ДНК сближаются по одному из V-, (D-) и J-сегментов, выбранных случайным образом, и формируется уникальная для данной клетки V(D)J-последовательность. Процесс таких генетических перестроек носит название V(D)J-рекомбинация или V(D)J-реаранжировка (Рисунок 2) [18, 90].

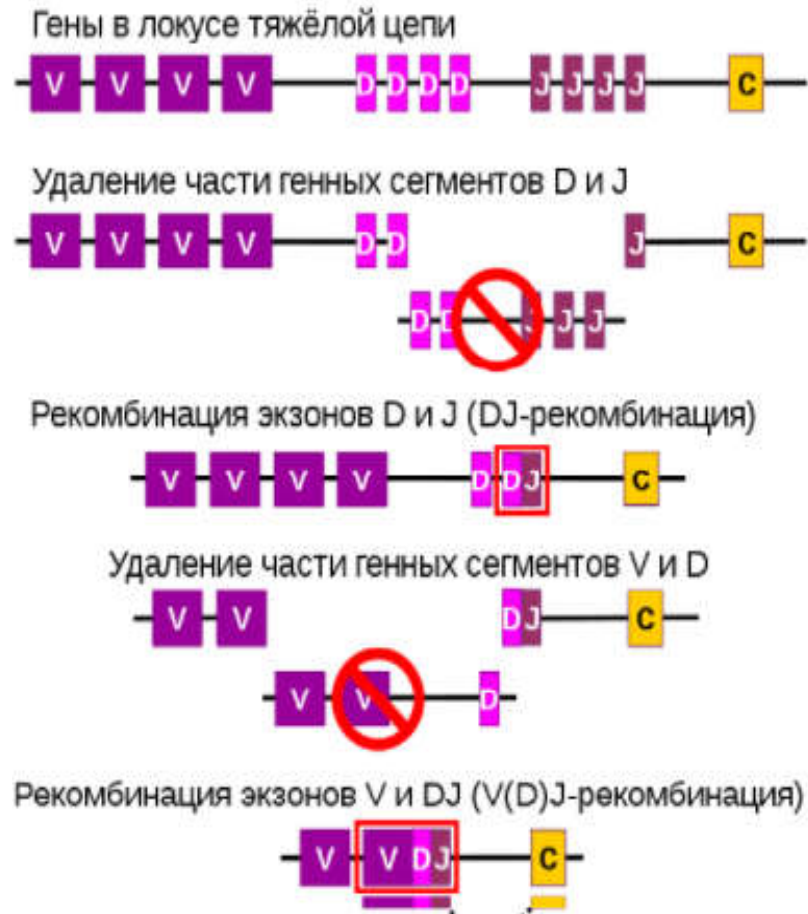


Рисунок 2. Процесс V(D)J-рекомбинации в ходе формирования зрелого гена антигенраспознающего лимфоцитарного рецептора

Сигналом к инициации генетической перестройке служит начало экспрессии генов рекомбинационного комплекса (Таблица 2).

Таблица 2. Состав рекомбинационного комплекса

| Белок комплекса | Функция |
|--|---|
| Рекомбиназы RAG1 и RAG2 | Внесение двунитивного разрыва в цепь ДНК |
| Гетеродимер белков Ku70 и Ku80/Ku86 | Сближение фрагментов ДНК в зоне перестройки гена |
| Гетеродимер HMG 1/2 | Образование шпильки |
| ДНК-зависимая протеинкиназа | «Разрешение» шпильки |
| Терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза | Нематричный синтез олигодезоксирибонуклеотидов (формирование N-вставок) |
| ДНК-лигаза IV | Сшивание разрыва нити ДНК |

Процесс реаранжировки начинается с экспрессии рекомбиназ RAG-1 и RAG-2 (*Recombinase Activation Gene*), которые в последствие соединяются с участками ДНК, прилегающим к сегментам, которым предстоит войти в состав зрелого V-гена. После чего субъединицы RAG димеризуются, связанных с ними участки ДНК сближаются, этому способствует комплементарное взаимодействие комплементарных пар гептамеров и нонамеров, расположенных по обе стороны от кодирующих сегментов (Рисунок 3). Последовательности между выбранными сегментами выпячиваются из геномной ДНК, образуя петлю, этот процесс происходит с участием гетеродимера HMG1/2. После этого рекомбиназа RAG вносит двунитевой разрыв ДНК между сайтом связывания фермента и соответствующим сегментом с возможными отклонениями в несколько нуклеотидных остатков. Разорванные нити ДНК замыкаются друг на друга с участием димера Ku70/Ku86 (Ku80 также называют Ku86) и сшиваются ферментом ДНК-лигазой IV. В результате этих процессов формируется шпилька, которая разрешается с участием ДНК-зависимой протеинкиназы DNA-PKcs. Вырезанная нуклеотидная последовательность, содержащая RSS, представляет собой генетический материал, не задействованный в формировании зрелого рецепторного гена в данной клетке. После удаления из генетического кода такая последовательность замыкается в кольцевую структуру – рекомбинационное эксцизионное сигнальное кольцо REC (Recombination excision circle) (Рисунок 3) [18, 90, 94].

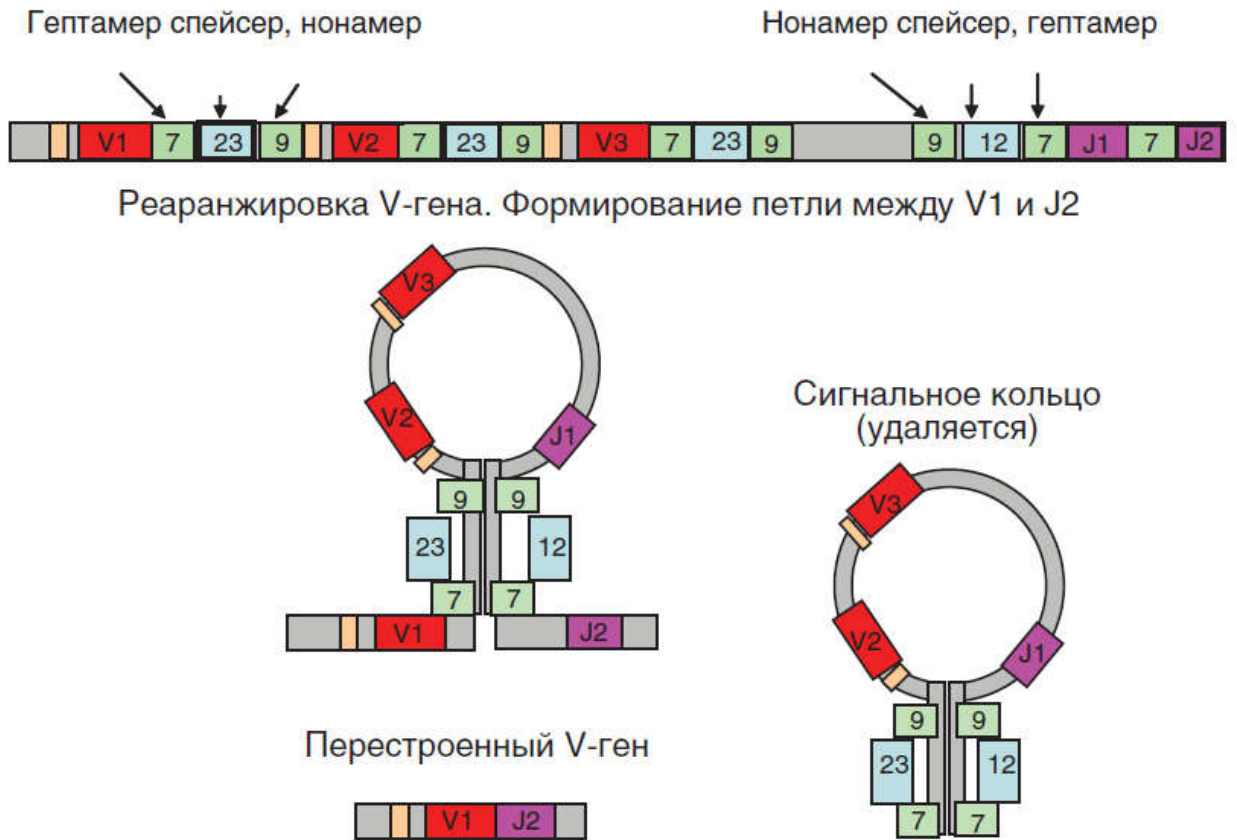


Рисунок 3. Сближение генетических сегментов V1 и J2 в ходе процесса V(D)J-рекомбинации и удаление из генома эксцизионного кольца.

Эксцизионные кольцевые молекулы ДНК называют TREC (T-cell receptor excision circle), если они были сформированы при созревании Т-клетки, и KREC (κ-deleting recombination excision circle) – при созревании В-клетки. Эксцизионные кольца TREC и KREC образуются в каждом дифференцирующемся Т- и В-лимфоците, они не имеют своей специфической функции и удаляются в процессе генетической рекомбинации из генома как побочный продукт. После формирования эксцизионные сигнальные кольца существуют в наивном лимфоците в виде эписомальной фракции ДНК, они являются стабильными и не реплицируются с последующей пролиферацией лимфоцитарной клетки при ее активации антигеном [66, 94, 99]. Количественное определение эксцизионных колец TREC и KREC в периферической крови может быть использовано как метод оценки обновления лимфоцитарных клеток в первичных лимфоидных органах [99].

1.6.2. Процессы генетической рекомбинации, характерные для большинства дифференцирующихся Т- и В-клеток

При количественной оценке молекул TREС и KREC важно учитывать, что инициация рекомбинации V-генов происходит не одновременно, генетические кластеры вступают в процессы реаранжировки сегментов ДНК последовательно. В предшественниках Т-клеток в тимусе процессам реаранжировки подвергаются сначала гены *TCRD* и *TCRG*, кодирующих δ и γ -цепи, соответственно. Перестройка генов переменных доменов γ - и δ -цепей происходит почти одновременно. Если процессы генетической рекомбинации завершаются формированием функционально активного рецептора, клетка выходит из тимуса как $TCR\gamma\delta^+$ Т-лимфоцит. Однако большинство клеток (более 95%) не образуют функционального $\gamma\delta^+$ Т-клеточного рецептора, в них запускаются процессы реаранжировки *TCRB* и *TCRA* генов, кодирующих β - и α -цепи, соответственно. В процессы генетической перестройки сначала вступают гены β -, а затем α -цепи. После успешного завершения рекомбинации эти Т-клетки покидают тимус и несут на своей поверхности $\alpha\beta^+$ Т-клеточный рецептор [90, 94, 98].

В случае генетических кластеров, содержащих сегменты D (тяжелые цепи иммуноглобулинов, β -, δ -цепи TCR), рекомбинация происходит в два этапа - сначала между сегментами D и J, затем между комплексом DJ и сегментами V [18].

В В-клетках в процессы рекомбинации сначала вступают гены тяжелых цепей *IGH*, затем легких цепей типа к *IGK*. Если генетическая рекомбинация в гене *IGK* не приводит к формированию к-цепи, процессам рекомбинации подвергается ген *IGL*, кодирующий λ -цепь. Зрелые В-клетки покидают костный мозг, экспрессируя в составе иммуноглобулинового рецептора легкие цепи либо к-типа, либо λ -типа. λ цепи образуют, примерно, 5% всех легких цепей иммуноглобулиновых молекул, они намного менее гетерогенны, чем к-цепи или тяжелые цепи иммуноглобулинов [94, 98].

Не смотря на огромное многообразие процессов генетической рекомбинации сегментов V-, D- и J-, некоторые из них свойственны большинству всех дифференцирующихся Т- и В-клеток. Так, реаранжировка последовательностей, в результате которой из генома удаляется весь локус *TCRD* из-за неудачной генерации $\gamma\delta^+$ Т-клеточного рецептора, характерна для большинства созревающих в тимусе Т-лимфоцитов. При этом в результате генетических рекомбинаций во всех таких клетках из генома вырезается сигнальная последовательность $\delta\text{REC}-\psi\text{J}\alpha$ (Рисунок 4). Неудачное формирование $\gamma\delta^+$ TCR происходит в более 80 % всех дифференцирующихся тимоцитов, что запускает процессы реаранжировок, приводящие к формированию $\alpha\beta$ -Т-клеточного рецептора. Почти все вновь образованные $\alpha\beta^+$ Т-клетки, покидающие тимус, содержат в эписомальной фракции эксцизионные кольца TREC с участком $\delta\text{REC}-\psi\text{J}\alpha$ [94, 98, 101].

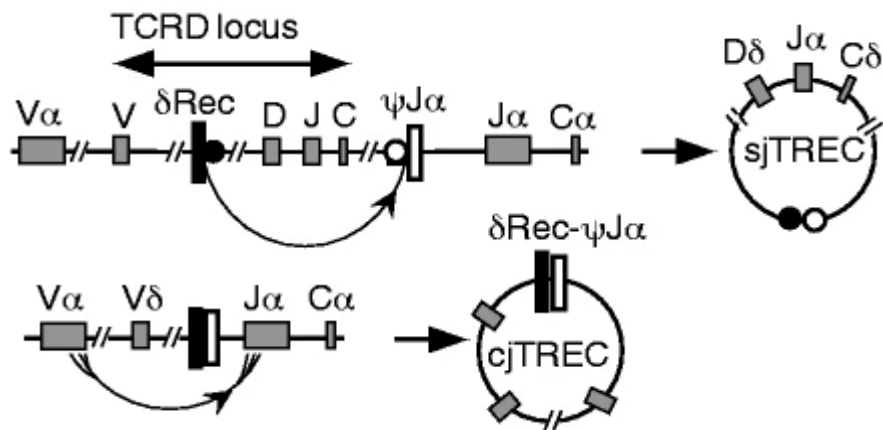


Рисунок 4. Удаление из генома эксцизионного кольца TREC, содержащего последовательность $\delta\text{REC}-\psi\text{J}\alpha$

Для большинства дифференцирующихся в костном мозге В-клеток свойственны процессы рекомбинации, затрагивающие участок *intronRSS-Kde*. Реаранжировка в этом локусе свойственна для, примерно, 30% Igk^+ и почти всех Igl^+ зрелых В-лимфоцитов человека, она происходит одной из последних перед миграцией наивных В-клеток на периферию, большинство В-клеток, покидающих костный мозг, несут эксцизионные кольца KREC,

содержащие сигнальную последовательность intronRSS-Kde (Рисунок 5) [69, 74, 77, 98].

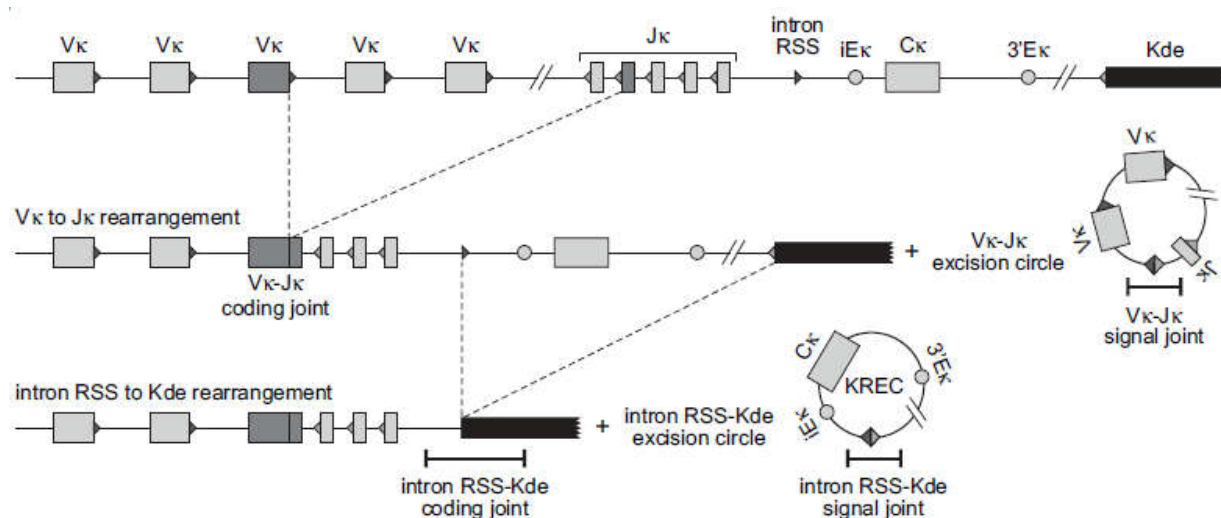


Рисунок 5. Удаление из генома эксцизионного кольца KREC, содержащего последовательность intronRSS-Kde

Формирование эксцизионных колец TREC, несущих в себе последовательность δ REC- ψ Ja, свойственных большинству Т-клеток, покидающих тимус, позволяет использовать такие молекулы TREC в качестве суррогатных маркеров функциональной активности тимуса и уровней продуцируемых наивных Т-лимфоцитов. Аналогично, формирование молекул кольцевой ДНК KREC, несущих последовательности intronRSS-Kde, в большей части дифференцирующихся В-лимфоцитов, позволяет оценивать продукцию новых наивных В-клеток костным мозгом путем количественной оценки уровней KREC в периферической крови.

1.7. Доступные методы количественной оценки TREC и KREC в периферической крови

В настоящее время на российском рынке зарегистрированы две диагностические тест-системы для количественного определения эксцизионных колец TREC и KREC в периферической крови с использованием технологии ПЦР в режиме реального времени. Одной из них является набор реагентов для ПЦР-анализа «НеоСкрин SMA/TREC/KREC»

производства «ДНК-технология» (Москва, Россия), другой – ПЦР-система «ИММУНО-БИТ» («АБВ-Тест», Москва). Кроме того, для количественной оценки TREC/KREC доступен набор реагентов «EnLite™ TREC-KREC kit» (PerkinElmer, Финляндия), который не зарегистрирован на территории России как медицинское изделие, но может применяться для научных исследований.

К ограничениям представленных на рынке диагностических наборов можно отнести ряд факторов. Во-первых, направленность наборов на диагностику иммунодефицитных состояний только у новорожденных и детей, в то время как взрослые пациенты остаются, не охваченными [3]. Во-вторых, во всех доступных наборах для определения уровней TREC и KREC нормировку количественных данных анализа проводят, используя один эталонный нормировочный ген. Однако, как известно, не существует идеального нормировочного гена, постоянного в независимости от ткани и состояния клеток в анализируемом образце. Оптимальным можно считать подход с одновременным использованием двух и более нормировочных генов [23]. В-третьих, существующие диагностические системы для количественной оценки TREC и KREC не валидированы для выявления нарушений, вызванных инфекционными процессами.

Стоит отметить, что точность диагностики во многом зависит не только от постановки ПЦР-анализа, но и от соблюдения правил и норм работы с клиническим материалом на преаналитическом этапе: от правильности взятия, условий транспортировки и хранения образцов крови, а также методов экстракции ДНК. Для выявления нарушений при дифференцировке Т- и В-лимфоцитов у новорожденных, определение уровней TREC и KREC методом ПЦР проводят, используя ДНК, выделенную из сухих капель крови (dried blood spots – DBS), нанесенных на фильтровальную бумагу - карты Гатри [50]. Использование DBS дает ряд преимуществ по сравнению с традиционным сбором образцов цельной крови. Сбор крови на карты Гатри предполагает малоинвазивное вмешательство (прокол пятки вместо венозной канюли) и требует меньший объем биообразца. Хранение и транспортировка герметично

упакованных сухих пятен крови на бумажных бланках может осуществляться при температуре +18 - +25°C, что снимает необходимость использования морозильных камер или сухого льда. Экстрагированная из сухой капли крови ДНК может быть использована для выявления генетических заболеваний методом ПЦР [70]. Такой подход поспособствовал развитию популяционного скрининга новорожденных во всем мире на ряд заболеваний, в том числе, на первичные иммунодефицитные состояния [102]. Однако, нарушения рекомендаций по нанесению капель крови на фильтровальную бумагу, правил ее высушивания и хранения, могут вносить существенный вклад в погрешность количественных результатов лабораторных тестов [64]. Кроме того, значимым для результата анализа является этап выделения нуклеиновых кислот: качество и количество препарата ДНК напрямую влияют на точность и достоверность проведенных исследований [44]. Различные наборы для выделения ДНК варьируют по составу реагентов, методам экстракции и очистки НК. Как было отмечено выше, особое внимание стоит уделять соблюдению всех рекомендаций пробоподготовки, когда речь идет о количественных анализах, как в случае определения уровней молекул TREC и KREC [33].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Настоящее исследование выполнено в 2019-2023 гг. в лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии имени Пастера». На проведение данного исследования было получено согласие Этического комитета ФБУН «Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера».

2.1. Характеристика биологического материала

Материалом исследования служили образцы биологического материала, полученные от 7851 человека в ходе выполнения плановых или рутинных работ в медучреждениях Санкт-Петербурга, переданные в лабораторию молекулярной иммунологии ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» без идентификационных данных пациентов. Все обследованные лица или их представители (родители новорожденных детей) дали письменное информированное согласие на участие в исследовании. Характеристика групп обследованных лиц представлена в таблице 3 и составлена согласно диагнозу лечащих врачей и/или сопроводительному описанию медучреждений, предоставивших биологический материал.

Таблица 3. Объем обследованного материала

| Характеристика групп | Кол-во человек |
|---|----------------|
| Образцы сухих капель крови на картах Гатри условно здоровых новорожденных | 5219 |
| Образцы пуповинной крови условно здоровых новорожденных | 157 |
| Образцы сухих капель крови на картах Гатри условно здоровых лиц старше 18 лет | 300 |
| Образцы цельной периферической крови условно здоровых лиц старше 18 лет | 1017 |
| Образцы сухих капель крови новорожденных с диагнозом Первичный иммунодефицит | 10 |

Продолжение таблицы 3

| Характеристика групп | Кол-во человек |
|---|----------------|
| Образцы сухих капель крови лиц старше 18 лет с диагнозом Первичный иммунодефицит (ОВИН) | 10 |
| Образцы цельной крови лиц старше 18 лет с диагнозом Первичный иммунодефицит (ОВИН) | 10 |
| Образцы цельной крови ВИЧ-инфицированных лиц со сроком инфицирования менее одного года | 50 |
| Образцы цельной крови ВИЧ-инфицированных лиц, болеющих длительное время (более 1 года), с большой вирусной нагрузкой и с неэффективностью применяемой антиретровирусной терапии (АРТ) | 50 |
| Образцы цельной крови пациентов с подтвержденным диагнозом Новая коронавирусная инфекция COVID-19 | 1028 |
| ВСЕГО | 7851 |

Критерием исключения для всех условно здоровых лиц и больных COVID-19 являлось наличие диагноза иммунодефицит любого генеза, ВИЧ-инфекция, вирусные гепатиты, туберкулез, диабет 1 и 2 типа, аутоиммунные заболевания, бронхиальная астма, хроническая обструктивная болезнь легких, онкологические заболевания. Для ВИЧ-инфицированных лиц применяли те же критерии исключения, кроме ВИЧ-инфекции.

В целях исключения влияния на результаты исследования острых инфекционных заболеваний для всех образцов, полученных от условно здоровых лиц и пациентов с COVID-19, проводили ряд анализов. Образцы плазмы крови тестировали методом ИФА на наличие антител класса IgM к следующим инфекциям: вирусам гепатитов E и A, простого герпеса 1 и 2 типов, герпеса 8 типа, Варицелла-Зостер, краснухи, кори, паротита, а также к *Treponema pallidum*; на наличие антител класса IgA к следующим инфекциям: *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*. Методом ПЦР в биообразцах выявляли НК вирусов гепатитов B и C, вируса иммунодефицита человека, вирусов Эпштейна-Барр, герпеса 6 типа, цитомегаловируса. Для

образцов крови, полученных от ВИЧ-инфицированных лиц, осуществляли те же исследования, за исключением ПЦР на РНК ВИЧ.

2.2. Отбор и транспортировка образцов

Образцы крови новорожденных отбирали на базе следующих учреждений:

1. ГБУЗ «Родильный дом № 17» (РД №17)
2. ГБУЗ «Родильный дом № 6 им. Снегирева» (РД №6)
3. Детская городская больница № 17 (ДГБ №17)
4. Детский городской многопрофильный центр высоких медицинских технологий (ДГМЦ)
5. Медицинский центр ФБУН «НИИ им. Пастера».

Образцы крови от пациентов с диагнозом Первичный иммунодефицит и ВИЧ-инфекция были получены из Медицинского центра и лаборатории иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера».

Образцы крови пациентов с диагнозом Новая коронавирусная инфекция COVID-19 были предоставлены инфекционными отделениями стационаров Клинической больницы №122 им. Л.Г. Соколова и Университетской клиники Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова.

Сухие пятна крови от новорожденных получали прокалыванием пятки младенца и нанесением капель крови (до полного пропитывания) на фильтровальную бумагу – карты Гатри. Для получения сухих пятен крови взрослых лиц взятие крови осуществляли в пробирку со стабилизатором этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА), после чего из пробирки с помощью дозатора отбирали 200 мкл образца и наносили небольшими

каплями на центр фильтровальной бумаги. Взятие цельной периферической крови у лиц старше 18 лет осуществляли из локтевой вены в вакутейнер с фиолетовой крышкой с консервантом ЭДТА. Забор пуповинной крови осуществляли после отделения пуповины от новорожденного также в вакутейнер с консервантом ЭДТА.

Маркировка биообразцов включала номер пробы, дату взятия материала и краткое наименование медучреждения. Сопроводительная записка содержала обезличенные данные о поле и возрасте пациента, а также о наличии/отсутствии сопутствующих заболеваний.

Пробы цельной крови транспортировали в лабораторию молекулярной иммунологии ФБУН «НИИ ЭМ им. Пастера» в день взятия образца в специальных контейнерах с поддержанием температурного режима $+4- +8^{\circ}\text{C}$. При невозможности проведения анализа в день взятия материала, кровь аликвотировали в пробирки типа Эппендорф объемом 1,5 мл и хранили при температуре -20°C .

При работе с картами Гатри транспортировку проб и анализ проводили после полного высыхания капель крови на фильтровальной бумаге, не ранее чем через 24 часа после нанесения образца на фильтр. Транспортировку и хранение карт Гатри осуществляли при температуре $+4- +8^{\circ}\text{C}$.

2.3. Экстракция нуклеиновых кислот

При работе с цельной кровью экстракцию геномной ДНК осуществляли из лейкоцитарных клеток. Для этого образец крови центрифугировали при 1500 g. в течение 10 минут, после чего отбирали лейкоцитарное кольцо в пробирку типа Эппендорф объемом 1,5 мл. К лейкоцитам крови вносили 200 мкл гемолитика («AmpliSens», ЦНИИ Эпидемиологии, Москва), вортиксовали и инкубировали при комнатной температуре 5 минут. Затем клетки центрифугировали при скорости 13000 об/мин (центрифуга «Mikro 120», «Hettich», Германия) в течение 2 минут. Отбирали надосадочную

жидкость с помощью вакуумного насоса, и выделяли ДНК из клеточного осадка с помощью комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (ЦНИИ Эпидемиологии, Москва) согласно инструкции производителя. Экстракцию тотальной ДНК из сухих капель крови проводили с использованием набора «Экстра-ДНК-Био» («Алкор-Био», Санкт-Петербург), согласно инструкции производителя.

Концентрацию и чистоту (соотношение A260/A280) выделенной ДНК измеряли на приборе «NanoDrop One» (Thermo Scientific, США).

2.4. Амплификация нуклеиновых кислот

С каждым образцом ДНК проводили ПЦР в режиме реального времени для количественной оценки содержания молекул TREC и KREC. Помимо разрабатываемого в ходе настоящей работы метода, использовали две тест-системы в качестве методов сравнения.

«EnLite™ TREC-KREC kit» («PerkinElmer», Финляндия) – набор реагентов для количественного определения ДНК TREC и KREC в образцах крови новорожденных, высушенной на картах Гатри. ПЦР в режиме реального времени проводили в специализированном термоциклере «VICTOR™ EnLite» (PerkinElmer, Финляндия) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. Абсолютное количество ДНК-фрагментов TREC и KREC нормировали на ген бета-актина (*BACT*). Результат рассчитывали в копиях молекул TREC/KREC на микролитр крови, согласно инструкции производителя. Указанный набор не зарегистрирован в Российской Федерации в качестве медицинского изделия, однако широко применяется в странах Европы и в США [62].

Набор реагентов «ИММУНО-БИТ» («АБВ-Тест», Москва) зарегистрирован в РФ в качестве медицинского изделия и предназначен для определения уровней TREC и KREC у новорожденных и детей в цельной крови и сухих каплях крови. Определение уровней TREC и KREC осуществляли методом ПЦР в режиме реального времени с последующим пересчетом абсолютных количеств целевых молекул на нормировочный ген

сывороточного альбумина (*ALB*). Результаты рассчитывали в копиях молекул TREC/KREC на 10^5 ядродержащих клеток, согласно инструкции производителя [3].

В ходе ПЦР с применением усовершенствованного нами метода количественной оценки уровней TREC и KREC в пробе ДНК одновременно амплифицировали четыре генетических фрагмента: два целевых фрагмента TREC, KREC и два фрагмента генов домашнего хозяйства для количественного нормирования данных - гена фермента гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы человека (HPRT) и гена белковой субъединицы р30 рибонуклеазы Р (RPP30). Результаты оценивали, исходя из кривых накопления флуоресценции от ДНК-мишеней.

Для проведения реакции были подобраны специфические олигонуклеотидные праймеры, фланкирующие целевые ДНК-последовательности, и специфические флуоресцентно-меченные олигонуклеотидные зонды. Последовательности праймеров и зондов представлены в таблице 4.

Последовательности праймеров и флуоресцентно меченых зондов подбирали с помощью программы NCBI/Primer-BLAST, согласно общепринятым рекомендациям [15]. Синтез олигонуклеотидов осуществляли в компании «Синтол», Россия.

ПЦР проводили на амплификаторах с функцией детекции флуоресценции в режиме реального времени по каналам HEX/Yellow, FAM/Green, ROX/Orange и Cy5/Red планшетного типа (например, «CFX96», Bio-Rad, США) или роторного типа (например, «Rotor-Gene Q/Rotor-Gene 3000», QIAGEN GmbH, Германия).

Для проведения ПЦР использовали следующий состав реакционной смеси: 100 мМ Трис-НСl, рН 8,5, 100 мМ КСl, 0,4 мМ каждого нуклеозидтрифосфата, 9 мМ MgCl₂, 0,1 ед. акт./мкл HS-Тaq ДНК-полимеразы, 0,025% Tween 20, стабилизаторы Тaq ДНК-полимеразы, от 4 до 11 пМ

каждого олигопраймера, от 1 до 4 пМ каждого флуоресцентного зонда, 1 мкг матрицы, вода без нуклеаз до конечного объема 25 мкл.

Таблица 4. Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов, использованные для амплификации ДНК-фрагментов TREC, KREC, HPRT и RPP30

| Праймер | Нуклеотидная последовательность |
|---------------|---|
| TRECF | 5'- CACATCCCTTTCAACCATGCT – 3' |
| TRECR | 5'- TGCAGGTGCSTATGCATCA – 3' |
| TRECzondFAM | 5'- FAM-CACCTCTGGTTTTTGTAAGGTGCCC-RTQ1/BHQ1 – 3' |
| KRECF | 5'- TCCCTTAGTGGCATTATTTGTATCACT – 3' |
| KRECR | 5'- AGGAGCCAGCTCTTACCCTAGAGT – 3' |
| KRECzondHEX | 5'- HEX-TCTGCACGGGCAGCAGGTTGG-BHQ1 – 3' |
| HPRTF | 5'- CTTGCTCGAGATGTGATGAAGG – 3' |
| HPRTR | 5'- CAGCAGGTCAGCAAAGAATTTATAG – 3' |
| HPRT-zondCy5 | 5'- Cy5-ATCACATTGTAGCCCTCTGTGTGCTCAAGG-RTQ2/BHQ2 – 3' |
| RPP30F | 5'- TTTGGACCTGCGAGCG – 3' |
| RPP30R | 5'- GAGCGGCTGTCTCCACAAGT – 3' |
| RPP30-zondROX | 5'- ROX-TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG-RTQ2/BHQ2 – 3' |

Протокол амплификации ДНК-мишеней включал в себя несколько этапов. После денатурации при 95°C в течение 15 минут, проводили 5 циклов преамплификации продукта при условиях: 95°C – 10 с., 61°C – 30 с., 72°C – 15 с. без считывания флуоресцентного сигнала, затем 40 циклов амплификации проводили при условиях: 95°C – 10 с., 60°C – 30 с., детекция флуоресценции по четырем каналам (FAM/Green, HEX/Yellow, Cy5/Red, ROX/Orange), 72°C – 15 с.

Для количественных расчетов в каждом запуске ПЦР амплифицировали пять калибраторов, представляющих собой серию десятикратных разведений плазмидной ДНК (известной концентрации), содержащей вставки нуклеотидных последовательностей двух целевых анализов TREC и KREC и

двух нормировочных генов HPRT и RPP30, разделенные спейсерными участками. Использованной плазмидой являлся pAL2-T вектор («Евроген», Россия). При подготовке калибраторов для определения их концентраций использовали абсолютный количественный метод оценки – цифровую капельную ПЦР.

2.5. Количественная оценка уровней TREC и KREC

Уровень ДНК TREC и KREC в исследуемых образцах рассчитывали в копиях на миллилитр и в копиях на 10^5 ядродержащих клеток с использованием следующих формул:

Эффективность ПЦР (E):

$$E = 10^{\frac{1}{a}}, \quad (1)$$

где a – коэффициент из уравнения $y = ax+b$, получаемого при аппроксимации зависимости порогового цикла от концентрации матрицы в образце.

Коэффициент пропорциональности α , рассчитываемый для каждого флуорофора:

$$\alpha = \frac{F_{Ct}}{C_0 \times E^{Ct}}, \quad (2)$$

C_t – пороговый цикл;

C_0 – исходная концентрация образца ДНК, определяемая ПО амплификатора относительно стандартных образцов (калибраторов) в копиях на миллилитр;

F_{Ct} – уровень пороговой линии (флуоресценция в пороговом цикле).

Средний коэффициент пропорциональности α_m , рассчитываемый для каждого флуорофора:

$$\alpha_m = \frac{\alpha_1 + \alpha_2 + \alpha_3 + \alpha_4 + \alpha_5}{5}, \quad (3)$$

α_{1-5} – коэффициент пропорциональности α , рассчитанный для каждого из пяти калибраторов.

Концентрация целевых молекул в копиях на мл (C):

$$C = \frac{F_{ct}}{\alpha_m \times E^{ct}}, \quad (4)$$

Концентрация целевых молекул TREC/KREC в копиях на 100 тысяч ядросодержащих клеток:

$$C_{10^5} = (4 * C / (C_{HPRT} + C_{RPP30})) * 10^5 - \text{для женского пола} \quad (5)$$

$$C_{10^5} = (4 * C / (2C_{HPRT} + C_{RPP30})) * 10^5 - \text{для мужского пола}, \quad (6)$$

где C_{HPRT} – концентрация молекул HPRT в миллилитре образца относительно калибраторов,

C_{RPP30} – концентрация RPP30 в миллилитре образца относительно калибраторов.

2.6. Фенотипирование клеток крови

Для фенотипирования клеток периферической крови больных, инфицированных SARS-CoV-2 и ВИЧ, использовали метод многоцветной проточной цитометрии. Для выявления популяции Т- и В-лимфоцитов 200 мкл образцов цельной крови окрашивали моноклональными антителами (МКА) мечеными флюорохромами CD45RA-FITC (Beckman Coulter, США), CD3-APC-AF750 (Beckman Coulter, США) и CD19-APC/Cy7 (BioLegend, США), соответственно, согласно инструкциям производителей. Образцы крови инкубировали с МКА при комнатной температуре в темноте в течение 10 мин, после чего лизировали эритроциты в течение 15 мин в присутствии 2 мл лизирующего раствора VersaLyse (Beckman Coulter, США) и 50 мкл фиксирующего раствора IOtest 3 (Beckman Coulter, США). Затем клетки дважды промывали (7 мин, 330 г) стерильным фосфатно-солевым буфером (PBS), содержащим 2% фетальную бычью сыворотку (Sigma-Aldrich, США), инактивированную нагреванием. После чего клетки ресуспендировали в 0,5 мл PBS, содержащем 2% нейтральный забуференный раствор формалина (Sigma-

Aldrich, США). Для проведения исследования использовался проточный цитометр Navios (Beckman Coulter, США), оснащенный лазерами с длиной волны 405, 488, 638 нм. Для определения Т-лимфоцитов собирали не менее 20 000 событий. Для В-клеточного звена из каждого образца было собрано не менее 5000 CD19+ В-клеток.

В выборке COVID-инфицированных лиц фенотипирование лимфоцитов было проведено для образцов крови, полученных от тяжелых и крайне тяжелых больных, наблюдавшихся в инфекционном отделении Университетской клиники Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова.

2.7. Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prizm 5, StatTech и Microsoft Excel 2010. Нормальность распределения полученных числовых данных проверяли с помощью двух критериев: Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка. Ни в одной из выборок распределение числовых данных не подчинялось закону нормального распределения, весь последующий анализ выполняли с применением инструментов непараметрической статистики. Корреляционный анализ проводили с расчетом коэффициентов Спирмена, значение которых оценивали по шкале Чеддока. Для оценки статистически значимых различий между отдельными выборками применяли критерии Манна-Уитни, Краскела-Уоллиса, тест Данна, а также ROC-анализ с вычислением значения площади под ROC-кривой (AUC – Area Under the Curve).

Референтные интервалы (РИ) содержания молекул TREC и KREC в периферической крови рассчитывали непараметрическим методом, согласно рекомендациям Международной федерации клинической химии (International Federation of Clinical Chemistry - IFCC) и Государственного стандарта (ГОСТ) Р 53022.3-2008 [5, 6, 53]. Для этого все полученные числовые значения исследуемых параметров были ранжированы от меньшего к большему и

определены выбросы – значения аналита, существенно отличающиеся от общего массива данных (в случае взрослых лиц для каждой возрастной группы при анализе значений TREC и для всего массива данных при анализе значений KREC). Для принятия решения об исключении значения из анализа применяли правило Dixon/Reed. Согласно этому правилу вычисляли отношение разницы значений между предположительно выпадающим значением и соседним к нему референтным значением (P3) к разнице между крайними значениями всего полученного диапазона. Если полученное число превышало или равнялось 0,3, значение аналита считали выбросом и исключали из референтной выборки. После исключения всех выбросов определяли 95% доверительный интервал.

2.8. Оценка аналитических характеристик разработанного метода

2.8.1. Оценка аналитической специфичности

Оценку аналитической специфичности проводили *in silico* с использованием алгоритма BLASTn, позволяющего оценить сходимость получаемого в ходе работы ПЦР-продукта (последовательностей фрагментов TREC, KREC, RPP30 и HPRT) с представленными в международной базе данных GenBank нуклеотидными последовательностями.

2.8.2. Оценка предела обнаружения и аналитического диапазона измерений

Предел обнаружения оценивали исходя из наименьших значений концентраций ДНК-фрагментов TREC/KREC, детектируемых с помощью разработанного метода. Для этого готовили серию десятикратных разведений Калибратора К1, с каждой пробой проводили ПЦР в 3-х повторах. Вычисляли средние значения концентрации образца в каждом разведении (копий/мл). Наименьшую детектируемую концентрацию принимали за предел обнаружения.

За нижнее значение аналитического диапазона измерений принимали предел обнаружения, за верхнее – концентрацию калибратора К1.

2.8.3. Оценка линейности измерений

Контроль линейности, как отклонения рассчитанного значения концентрации ДНК TREC/ KREC в анализируемой пробе от теоретического в диапазоне рабочих концентраций, осуществляли согласно ГОСТ Р 51352-2013 [4]. Для этого готовили серии последовательных пятикратных разведений Калибраторов К1, К3 и К5 в дистиллированной воде в пробирках, маркированных цифрами 1, 5, 25, 125, в конечных объемах по 0,05 мл. С каждой пробой проводили ПЦР в 7 повторах. Вычисляли средние значения концентрации TREC/KREC в каждом разведении (копий/мл).

Расчет линейности (Л, %) значений концентрации ДНК TREC/KREC в образцах осуществляли согласно формуле:

$$Л (\%) = (C_{\text{пр}} / C_{\text{т}}) \times 100, \quad (7)$$

где $C_{\text{пр}}$ (копий/мл) – практически определенное значение концентрации ДНК TREC/KREC в исследуемой пробе согласно разработанному методу, умноженное на показатель разведения (среднее значение при семи повторах ПЦР);

$C_{\text{т}}$ (копий/мл) – теоретическое значение концентрации ДНК TREC/KREC в исследуемой пробе, рассчитанное из известных концентраций ДНК Калибраторов К1, К3 и К5.

2.8.4. Оценка точности измерений

Проверку точности (правильности) измерений проводили согласно ГОСТ Р 51352-2013, используя метод добавок (тест на «открытие») [4]. Для этого к пробе Калибратора К4 добавляли равный объем пробы Калибратора К5, после проведения ПЦР с суммарной пробой (К4+К5) в 8-и повторах анализировали отклонение практически рассчитанного среднего значения концентрации ДНК TREC и KREC от теоретического.

Точность измерений (ТИ) рассчитывали по формуле:

$$\text{ТИ (\%)} = (C_{\text{пр}} / C_{\text{т}}) \times 100, \quad (8)$$

где $C_{\text{пр}}$ (копий/мл) – практически определенное значение концентрации ДНК TREC/KREC в исследуемой суммарной пробе (K4 + K5) пробе согласно разработанному методу с использованием формул (1) - (6) (среднее значение при 8 повторах ПЦР);

$C_{\text{т}}$ (копий/мл) – теоретическое значение концентрации ДНК TREC и KREC в исследуемой суммарной пробе (K4+K5), рассчитанное по формуле:

$$C_{\text{т}} (\text{копий/мл}) = (C_{\text{K4}} + C_{\text{K5}}) / 2, \quad (9)$$

где C_{K4} и C_{K5} (копий/мл) – теоретические (заведомо известные) значения концентраций ДНК TREC и KREC в Калибраторах K4 и K5

2.8.5. Оценка воспроизводимости результатов

Внутрисерийную и межсерийную воспроизводимость результатов ПЦР определяли с использованием двух экземпляров набора разработанных реагентов для проведения ПЦР-анализа из трех опытных серий (001, 002, 003). Для двух наборов из каждой серии проводили 8 повторных измерений концентраций ДНК TREC/KREC в пробе Калибратора K2 с помощью разработанного метода. Результаты анализа использовали для расчета коэффициента вариации (CV) значений концентрации ДНК TREC/KREC согласно формуле:

$$\text{CV (\%)} = (S / M) \times 100, \quad (10)$$

где S — стандартное отклонение;

M — среднее арифметическое значение определяемых концентраций молекул TREC/KREC.

Дополнительно проводили оценку воспроизводимости при работе на разных приборах. В качестве приборов сравнения использовали амплификаторы с функцией детекции в режиме реального времени планшетного типа «CFX96» (Bio-Rad, США) и роторного типа «Rotor-Gene

Q»/«Rotor-Gene 3000» (QIAGEN GmbH, Германия). По результатам анализа рассчитывали CV по формуле (10).

2.9. Оценка вклада ошибок преаналитического этапа в количественный результат анализа

Для оценки влияния наиболее распространенных ошибок пробоподготовки при работе с сухими каплями крови на количественный результат ПЦР-анализа TREC/KREC осуществляли визуальный мониторинг карт Гатри, поступавших в лабораторию из родильных домов. Были отобраны 100 карт Гатри с образцами крови, полученными от здоровых доношенных новорожденных, где одно пятно крови было нанесено корректно, в то время как другое пятно того же образца крови имело недостаточную пропитку, признаки неправильного высушивания или иные ошибки взятия материала.

Кроме того, были подготовлены парные сухие пятна крови, полученной от взрослых условно здоровых лиц. Одно из пятен наносили правильно, соблюдая рекомендации по пробоподготовке, а другое - с намеренными ошибками.

Анализ одних и тех же образцов был проведен с использованием трех наборов реагентов, предназначенных для количественного ПЦР-анализа уровней TREC/KREC: модифицированным в ходе работы методом и соответствующим набором реагентов, тест-системой «ИММУНОБИТ», АБВ-тест, Москва и тест-системой «EnLite™ TREC-KREC kit», PerkinElmer, Финляндия.

Для оценки влияния объема крови на результат ПЦР-анализа TREC/KREC были подготовлены сухие пятна крови из цельной крови взрослых лиц с различным объемом наносимого материала (50 мкл, 100 мкл, 150 мкл, 200 мкл, 250 мкл, 300 мкл). Схема нанесения разных объемов крови на карты Гатри представлена на рисунке 6.

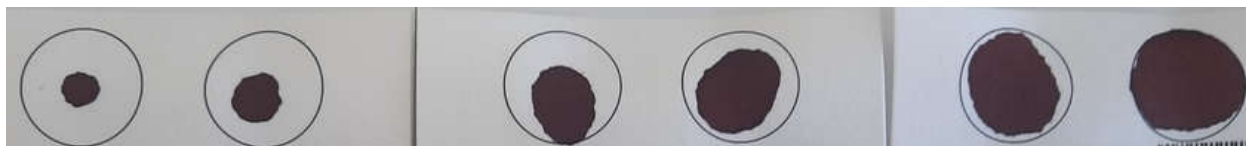


Рисунок 6. Схема для изучения влияния объема цельной крови при подготовке сухого пятна на определяемые уровни TREC и KREC. Слева направо кровь наносили в следующих объемах: 50 мкл, 100 мкл, 150 мкл, 200 мкл, 250 мкл, 300 мкл

2.10. Сравнение методов экстракции нуклеиновых кислот

Для оценки влияния выбора метода экстракции ДНК на количественный результат анализа уровней TREC/KREC использовали ряд коммерческих наборов реагентов для выделения нуклеиновых кислот: «Экстра-ДНК-Био» (Алкор-био, Россия), «МагноПрайм ЮНИ» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия), «ЭКСТРА-преп PS» (ФБУН НИИ им. Пастера, Россия). В каждом случае экстракцию ДНК осуществляли согласно инструкциям производителя. Процесс экстракции ДНК с использованием набора «МагноПрайм ЮНИ» (ООО «НекстБио», Россия) был разделен на автоматическое и ручное выделение. При машинном выделении использовали прибор KingFisher Flex 24 (Thermo Scientific, США).

В качестве эталонного набора/набора сравнения использовали коммерческий набор реагентов «Экстра-ДНК-Био» (Алкор-био, Россия), получивший медицинское РУ в России, предназначенный для экстракции ДНК из сложных образцов, включая сухие пятна крови, и обеспечивающий эффективный выход ДНК.

Для 30 образцов крови здоровых доношенных новорожденных, высушенной на картах Гатри, выбивали по 6 бумажных дисков диаметром 3 мм, используя панчер «DBS Puncher» (PerkinElmer, Финляндия). Такой пул дисков готовили в четырех повторах, исходя из числа анализируемых наборов/способов экстракции ДНК.

Концентрацию и чистоту (соотношение A260/A280) выделенной ДНК измеряли на приборе NanoDrop One (Thermo Scientific, США) в трех повторах

при комнатной температуре. В качестве контроля использовали буфер для элюции ДНК, соответствующий каждому набору.

Контроль эффективности экстракции нуклеиновых кислот разными наборами реагентов осуществляли по результатам ПЦР в режиме реального времени, проведенной с каждой полученной ДНК-пробой, с применением разработанного в ходе работы ПЦР-метода оценки уровней TREC/KREC. Для одного образца крови получали четыре значения уровня молекул TREC и четыре значения уровня молекул KREC в крови (исходя из количества способов выделения ДНК). Количественный результат определялся только системой выделения, поскольку все остальные этапы анализа для всех образцов были идентичными.

2.11. Оценка эквивалентности результатов анализа при работе с цельной кровью и сухими каплями крови

Для сравнения результатов анализа уровней TREC/KREC при работе с цельной кровью с гемостабилизатором (ЭДТА) и сухими каплями крови, экстракцию ДНК осуществляли с использованием набора «Экстра-ДНК-Био», Алкор-Био. В образцах ДНК определяли концентрации TREC и KREC в копиях/ 10^5 клеток по формуле (5) для женщин и по формуле (6) для мужчин. Полученные данные сравнивали, оценивая, попадает ли рассчитанный результат в диапазон нормы концентраций TREC и KREC в различных возрастных группах. В случае совпадения результатов в различных типах клинического материала делали вывод об эквивалентности использования образцов цельной крови и сухих капель крови.

2.12. Оценка показателей диагностической значимости разработанного метода

Для оценки показателей чувствительности и специфичности анализа составляли четырехпольные таблицы с указанием количества всех положительных результатов - истинно положительных (true positive - TP) и ложноположительных (false positive - FP), и количества всех отрицательных

результатов - истинно отрицательных (true negative - TN) и ложноотрицательных (false negative - FN) (Таблица 5).

Таблица 5. Таблица классификации результатов диагностического теста

| Результат теста | Диагноз | |
|-----------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | Положительный | Отрицательный |
| Положительный | истинно положительный TP | ложноположительный FP |
| Отрицательный | ложноотрицательный FN | истинно отрицательный TN |

На основании данных четырехпольных таблицы показатели чувствительности и специфичности вычисляли по формулам:

$$Se = \frac{TP}{TP + FN} \quad (11)$$

$$Sp = \frac{TN}{TN + FP} \quad (12)$$

Для показателей точности не информативными считали значения $< 0,5$ [2, 8, 10, 75]. Практическую полезность показателей Se и Sp оценивали по шкале, представленной в таблице 6.

Таблица 6. Шкала интерпретации показателей Se и Sp

| | |
|-----------|--|
| Se | Чувствительность ПДТ к наличию болезни |
| 0,0 – 0,5 | практически бесполезная |
| 0,5 – 0,7 | низкая |
| 0,7 – 0,9 | умеренная |
| 0,9 – 1,0 | высокая |
| Sp | Специфичность ПДТ в отношении отсутствия болезни |

Показатели позитивной прогностической ценности (PPV) и негативной прогностической ценности (NPV) теста вычисляли по формулам:

$$PPV = \frac{TP}{TP + FP} \quad (13)$$

$$NPV = \frac{TN}{FN + TN} \quad (14)$$

Распространенность заболевания ($Prev$) среди обследуемой популяции рассчитывали по формуле:

$$Prev = \frac{TP + FN}{n}, \quad (15)$$

где n – количество обследованных лиц.

Величину контр-распространенности (вероятность отсутствия болезни в исследуемой выборке) определяли как

$$coPrev = 1 - Prev \quad (16)$$

В случаях, когда прогностичность положительных результатов PPV не превышала распространенность заболевания $Prev$, положительные результаты теста признавали не информативными. Аналогично, если величина прогностичности отрицательных результатов NPV не превышала вероятность отсутствия болезни $coPrev$, такие отрицательные результаты считали не информативными [2, 8, 10, 75, 82].

Отношения правдоподобий для положительных результатов (LR+) и для отрицательных результатов (LR-) рассчитывали по формулам:

$$(LR+) = \frac{TP * (FP + TN)}{(TP + FN) * FP} \quad (17)$$

$$(LR-) = \frac{TN * (TP + FN)}{(FP + TN) * FN} \quad (18)$$

Для отношения правдоподобий не информативными считали значения близкие к 1 (вероятности положительного результата у больных и здоровых субъектов равны/вероятности отрицательного результата у здоровых и больных субъектов равны). Значения $(LR+) > 1$ свидетельствовали о связи результата анализа с наличием заболевания [2, 8].

По шкале, представленной в таблице 7, оценивали практическую значимость полученных значений $(LR+)$ и $(LR-)$.

Таблица 7. Интерпретации показателей $(LR+)$ и $(LR-)$ ПДТ

| | |
|----------|--|
| LR (+) | Повышение апостериорных шансов наличия болезни у обследуемого по сравнению с априорными шансами после получения положительного результата ПДТ |
| 1-3 | Практически ничтожное |
| 3-10 | Посредственное |
| 10-33 | Умеренное |
| 33-100 | Высокое |
| 100-1000 | Очень высокое |
| >1000 | Практически идеальное |
| LR(-) | Повышение апостериорных шансов отсутствия болезни у обследуемого по сравнению с априорными шансами после получения отрицательного результата ПДТ |

Диагностическую точность теста или общую вероятность того, что пациент будет классифицирован верно (*Acc.*) рассчитывали по формуле:

$$Acc. = \frac{TP + TN}{TP + TN + FP + FN} \quad (19)$$

Также для определения характеристик диагностической точности анализа применяли метод построения ROC-кривых с вычислением параметра площадь под кривой (AUC - Area Under the Curve). Для оценки качества модели значения AUC оценивали по шкале, представленной в таблице 8 [2].

Таблица 8. Качество прогностической модели в зависимости от AUC

| Интервал значений AUC | Качество модели |
|-----------------------|----------------------|
| 0,9-1 | Отличное |
| 0,8-0,9 | Очень хорошее |
| 0,7-0,8 | Хорошее |
| 0,6-0,7 | Среднее |
| 0,5-0,6 | Неудовлетворительное |

Все результаты, полученные с применением разработанного ПЦР-метода, сравнивали с результатами количественного анализа молекул TREC и KREC с использованием тест-систем «EnLite™ TREC-KREC kit» («PerkinElmer», Финляндия) и «ИММУНО-БИТ» («АБВ-Тест», Москва).

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДА КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА ДНК-ФРАГМЕНТОВ ТREC И КREC В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ НА ОСНОВЕ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

3.1. Выбор нормировочных генов

Для нормирования количественных данных при мультиплексном ПЦР-анализе традиционно используют амплификацию ряда генов домашнего хозяйства, то есть тех, представленность и экспрессия которых во всех клетках являются практически постоянными, поскольку их работа необходима для жизнеобеспечения клетки. К таким генам, например, относят ген β -актина (*ACTB*), альбумина (*ALB*), ген белковой субъединицы р30 рибонуклеазы Р (*RPP30*), гены некоторых ферментов (гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы *HPRT*, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы *GAPDH*) и другие. Однако, не существует идеального нормировочного гена, поскольку активность любого гена в разных клетках может варьировать при некоторых патологических состояниях ввиду их мультифункциональности. В связи с этим, оптимальным для снижения вариабельности результатов и повышения точности расчетов, считается одновременное использование двух или более эталонных нормировочных генов [15]. В рамках настоящей работы для нормирования количественных данных мы использовали амплификацию двух генов домашнего хозяйства: *HPRT* и *RPP30*. Было продемонстрировано, что эти гены в клетках цельной крови и в сухой капле крови имеют постоянный уровень, определяемый во всех образцах только количеством клеток, вне зависимости от группы пациентов.

Выбор гена *RPP30* был обоснован анализом литературных данных, свидетельствующих о применимости данного гена в качестве контрольного для определения эффективности экстракции геномной ДНК человека, в качестве эндогенного контроля для диагностики и количественной оценки бактериальной и вирусной нагрузки, для нормализации количества копий инфекционных агентов с количеством клеток, основанной на наличии двух

копий *RPP30* в каждой клетке, а также в качестве эталонного гена для определения вариаций числа копий таргетных генов в геноме человека [42]. Выбор гена *HPRT*, локализованного на X-хромосоме, обусловлен тем, что половая принадлежность потенциально может влиять на иммунитет и развитие связанных с иммунным статусом заболеваний.

3.2. Подбор компонентов реакции и условий амплификации

Для амплификации целевых ДНК-молекул *TREC*, *KREC* и фрагментов двух нормировочных генов *HPRT*, *RPP30* были подобраны четыре пары специфичных олигонуклеотидных праймеров, фланкирующие исследуемые области ДНК, а также четыре олигонуклеотидных зонда, несущие разные флуоресцентные метки.

При подборе праймеров и зондов руководствовались стандартными требованиями, обеспечивающими отжиг и амплификацию специфической целевой ДНК-последовательности, высокую эффективность реакции, отсутствие образования димеров олигонуклеотидов и не специфических продуктов реакции [15].

Пары олигонуклеотидных праймеров к структурам *TREC* и *KREC* выбирали таким образом, чтобы исключить их отжиг на не зрелом рецепторном гене лимфоцитов, то есть на тех последовательностях геномной ДНК, где процессы V(D)J-рекомбинации не произошли.

Для детекции результатов ПЦР в реальном времени использовали зонды TaqMan (гидролизные зонды) – олигонуклеотиды, подобранные для каждой ДНК-мишени, несущие на себе молекулу флуорофора и молекулу гасителя, подавляющую флуоресцентный сигнал до начала реакции.

Нуклеотидные последовательности всех праймеров и зондов, используемых в ходе настоящей работы, перечислены в таблице 4. Из таблицы видно, что по каналу детекции продуктов амплификации FAM регистрировали накопление ДНК-фрагмента *TREC*, по каналу детекции HEX регистрировали

накопление ДНК-фрагмента KREC, по каналу Cy5 - накопление фрагмента HPRT, по каналу ROX – фрагмента RPP30 (Рисунок 7).

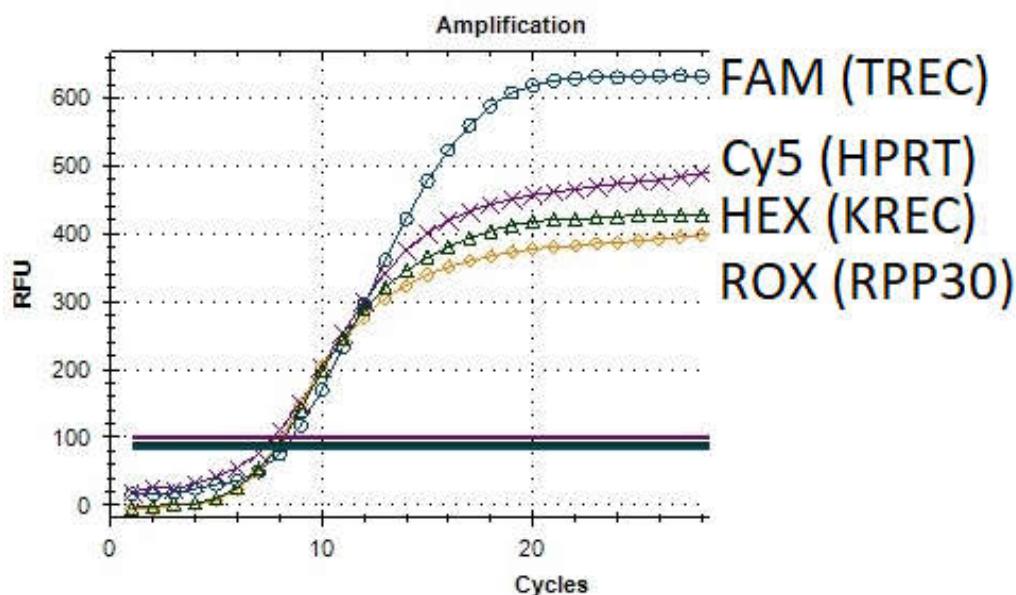


Рисунок 7. Кривые флуоресценции, отражающие динамику образования продуктов реакции в ходе амплификации. Кружками и треугольниками обозначены сигналы флуорофоров FAM и HEX, свидетельствующие о накоплении ДНК-фрагментов целевых молекул TREC и KREC, соответственно. Ромбами и крестами обозначены сигналы флуорофоров ROX и Cy5, свидетельствующие о накоплении фрагментов нормировочных генов RPP30 и HPRT, соответственно

Оптимальный состав реакционной смеси, подобранный для проведения ПЦР, указан в главе 2 «Материалы и методы».

Поскольку молекулы TREC и KREC могут быть мало представлены в периферической крови взрослых людей, в протокол амплификации был включен этап преамплификации, когда в течение первых пяти циклов реакции не происходит считывание флуоресцентного сигнала. После этого этапа температуру отжига праймеров и зондов понижали с 61°C до 60°C, поскольку первые пять циклов обеспечивали наработку только специфического ПЦР-продукта (Таблица 9).

Таблица 9. Протокол амплификации ДНК-мишеней, подобранный для количественной оценки молекул TREC и KREC методом Real-time ПЦР

| Цикл | Температура, °С | Время | Измерение флюоресценции | Кол-во циклов |
|------|-----------------|--------|---|---------------|
| 1 | 95 | 15 мин | | 1 |
| 2 | 95 | 10 сек | | 5 |
| | 61 | 30 сек | | |
| | 72 | 15 сек | | |
| 3 | 95 | 10 сек | | 40 |
| | 60 | 30 сек | HEX/Yellow, FAM/Green, Cy5/Red, ROX/Orange | |
| | 72 | 15 сек | | |

3.3. Подготовка калибраторов

Метод ПЦР в режиме реального времени является относительным количественным методом, то есть позволяет произвести количественную оценку ДНК-мишеней относительно стандартных образцов с заведомо известной концентрацией целевых нуклеотидных фрагментов.

Для оценки уровней ДНК-молекул TREC и KREC в пробе ДНК методом Real-time ПЦР мы использовали пять стандартных образцов – пять калибраторов. Калибраторы представляли собой плазмидную ДНК,

содержащую вставки синтетических нуклеотидных последовательностей TREC и KREC и нормировочных генов *HPRT* и *RPP30*, разделенных спейсерными участками. Протяженность плазмиды с перечисленными синтетическими вставками составляла 3370 нуклеотидов.

В таблице 10 приведены последовательности выявляемых ДНК-фрагментов (как в анализируемых образцах, так и в плазмиде).

Таблица 10. Нуклеотидные последовательности выявляемых ДНК-фрагментов TREC, KREC, HPRT и RPP30

| Название исследуемого ДНК-фрагмента/гена | Нуклеотидная последовательность |
|--|---|
| TREC | GCCACATCCCTTTCAACCATGCTGACGCCTCTGGT TTTTGTAAAGGTGCTCACTCCTGTGCACGGTGATG CATAGGCACCTGCAGCTGGC |
| KREC | GTTCTCTTCCCTTAGTGGCATTATTTGTATCACTG TGCGCTGTCTGCACGGGCAGCAGGTTGGAАСТСТА GGGTAAGAGCTGGCTCCTGGT |
| HPRT | GGTGTTTATTCCTCATGGACTAATTATGGACAGGA CTGAACGTCTTGCTCGAGATGTGATGAAGGAGAT GGGAGGCCATCACATTGTAGCCCTCTGTGTGCTCA AGGGGGGCTATAAATTCTTTGCTGACCTGCTGGAT TACATCAAAGCACTGAATAG |
| RPP30: | GTGTTTGCAGATTTGGACCTGCGAGCGGGTTCTGA CCTGAAGGCTCTGCGCGGACTTGTGGAGACAGCC GCTCACCTTGGCTATTCAGTTG |

Лиофилизат плазмидной ДНК растворяли в ТЕ-буфере, исходя из рекомендаций производителя, получая препарат плазмиды с приблизительной концентрацией 10^{10} копий/мл. Готовили последовательные десятикратные разведения препарата плазмиды с расчетными концентрациями 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 копий/мл. Для практической оценки получаемых концентраций использовали абсолютный количественный метод цифровой

капельной ПЦР. Определяли точную концентрацию (копий/мл) в препаратах плазмиды с предположительными концентрациями 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , затем относительно данных образцов проводили калибровку всей серии разведений плазмиды с помощью стандартной Real-time ПЦР. Из серии разведений плазмидной ДНК отбирали препараты плазмид с концентрациями $1-9 \cdot 10^8$, $1-9 \cdot 10^7$, $1-9 \cdot 10^6$, $1-9 \cdot 10^5$, $1-9 \cdot 10^4$ копий/мл, которые использовали в качестве калибраторов К1-К5 в последующем анализе (Таблица 11).

Таблица 11. Калибраторы, разработанные для количественной оценки уровней молекул TREC и KREC методом Real-time ПЦР

| Наименование калибратора | Концентрация (копий плазмиды/мл) |
|--------------------------|----------------------------------|
| Калибратор 1 (К1) | $1-9 \cdot 10^8$ |
| Калибратор 2 (К2) | $1-9 \cdot 10^7$ |
| Калибратор 3 (К3) | $1-9 \cdot 10^6$ |
| Калибратор 4 (К4) | $1-9 \cdot 10^5$ |
| Калибратор 5 (К5) | $1-9 \cdot 10^4$ |

Серию из пяти калибраторов амплифицировали в каждой постановке ПЦР с анализируемыми пробами ДНК. На основании графиков нарастающей флуоресценции в ходе ПЦР от проб калибраторов выстраивали стандартные калибровочные кривые (зависимость порогового цикла C_q от логарифма начальной концентрации плазмиды в пробирке) с помощью ПО амплификатора (Рисунок 8).

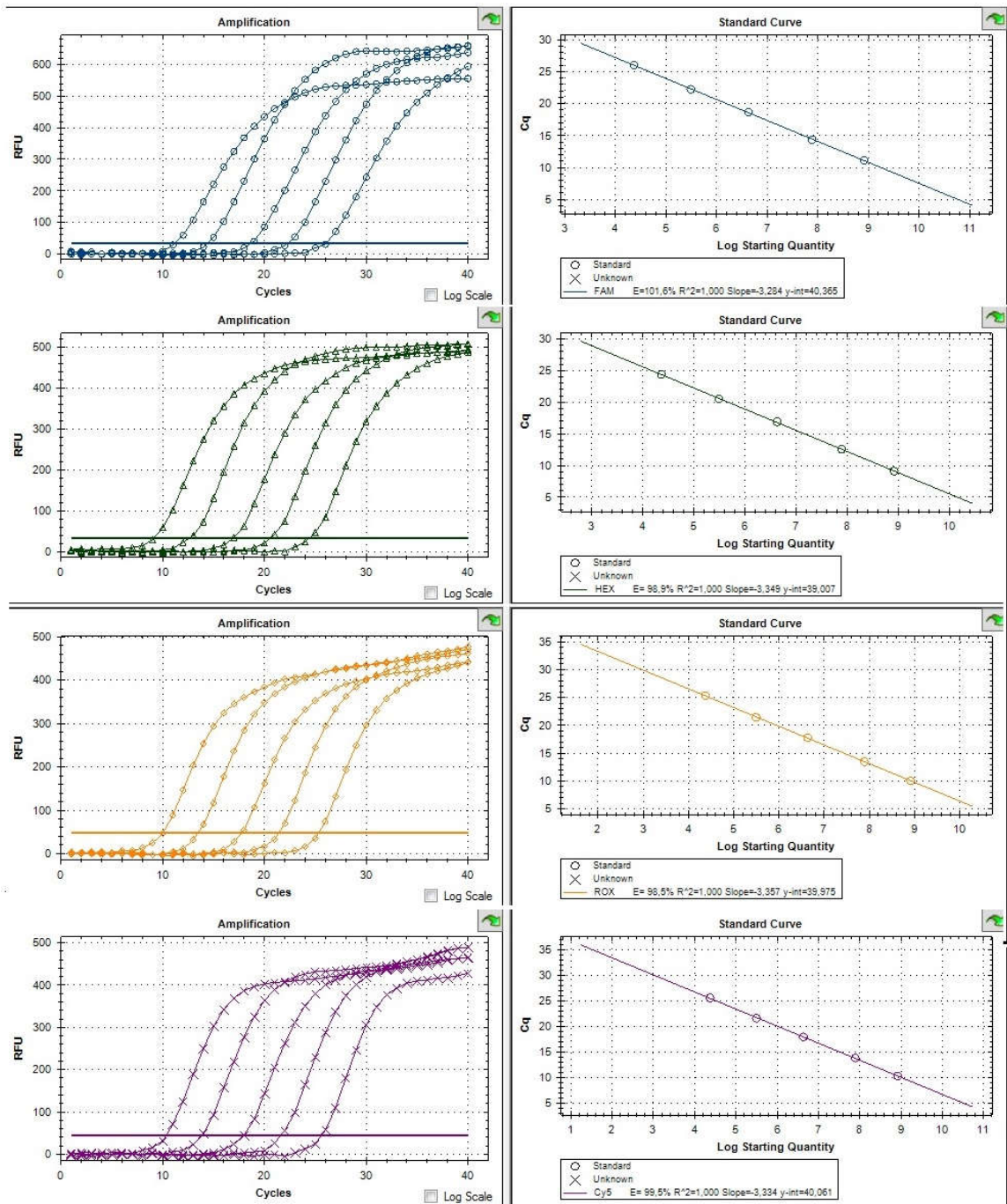


Рисунок 8. Графики накопления флуоресценции (слева) и стандартные кривые (справа), построенные в результате амплификации пяти калибраторов K1-K5

На основании выстроенных стандартных кривых определяли эффективность реакции. Расчет уровней TREC и KREC проводили только в том случае, если эффективность ПЦР составляла 90-110%, поскольку большие отклонения этого параметра от 100% вносят существенную погрешность в конечный количественный результат (Рисунок 9).

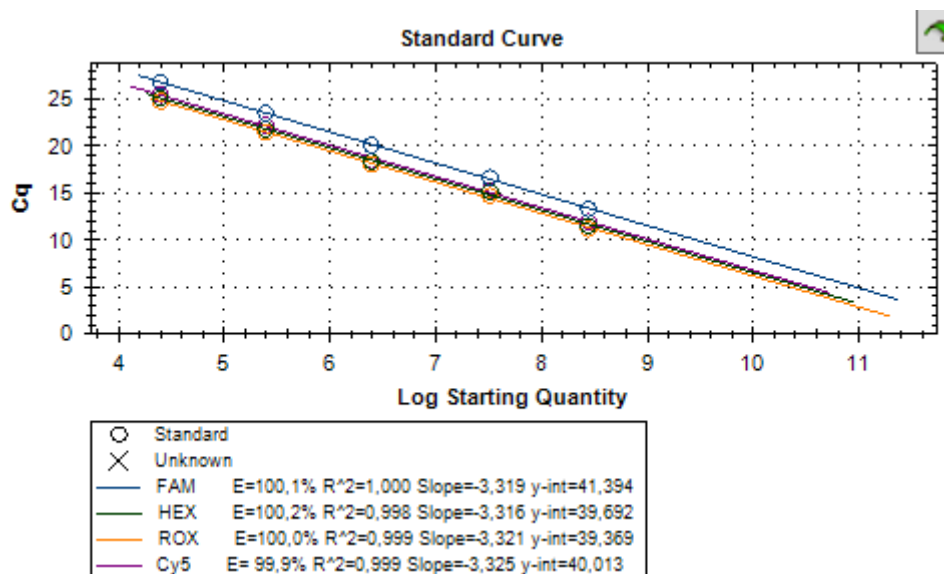


Рисунок 9. Эффективность ПЦР, рассчитанная по результатам амплификации пяти калибраторов К1-К5

3.4. Оценка результатов

Основой для возникновения экспоненциально нарастающего флуоресцентного сигнала в ходе Real-time ПЦР является усиление флуоресценции от увеличивающегося в каждом цикле реакции числа ДНК-фрагментов, несущих на себе флуоресцентную метку. В каждом цикле ПЦР в режиме реального времени происходит комплементарная гибридизация не только специфических олигонуклеотидов (прямого и обратного праймеров), определяющих границы амплифицируемого фрагмента ДНК, но и олигонуклеотидных зондов с флуоресцирующими красителями, комплементарных участку ДНК-мишени, расположенному между прямым и обратным праймерами. Олигонуклеотидные зонды несут на себе флуоресцентные метки с разными спектрами поглощения и испускания электромагнитных волн, что позволяет проводить одновременную регистрацию флуоресценции по четырем каналам детекции сигнала.

В данной работе, как было сказано выше, анализировали кривые накопления флуоресцентного сигнала по четырем каналам: FAM/Green,

HEX/Yellow, ROX/Orange и Cy5/Red. Результаты интерпретировали на основании наличия (или отсутствия) на растущего по экспоненциальной зависимости флуоресцентного сигнала от ДНК-мишени и пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией, отсекающей флуоресцентный фон, что определяло наличие (или отсутствие) для данной пробы значения порогового цикла Cq в соответствующей графе в таблице результатов, формируемой амплификатором (Рисунок 10).

| Well | Fluor | Target | Content | Sample | Cq |
|------|-------|--------|---------|--------|-------|
| A01 | Cy5 | | Unkn | | 21,41 |
| A01 | FAM | | Unkn | | 26,75 |
| A01 | HEX | | Unkn | | 27,50 |
| A01 | ROX | | Unkn | | 19,44 |

Рисунок 10. Пороговые циклы Cq для четырех каналов флуоресценции, необходимые для количественных расчетов уровней TREC и KREC в ДНК-пробе

Результаты анализа подлежали учету, если:

1. отсутствовали флуоресцентные сигналы по всем каналам детекции в пробирке с отрицательным контролем реакции (куда вместо матрицы ДНК вносили стерильную воду), что свидетельствовало об отсутствии контаминации образцов и реагентов на всех этапах анализа;
2. регистрировали экспоненциальный рост уровня флуоресценции по всем четырем каналам FAM/Green, HEX JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red в пробирках с Калибраторами К1 – К5;
3. регистрировали экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналам ROX/Orange, Cy5/Red в анализируемом образце, что свидетельствовало об отсутствии ошибок при экстракции ДНК и отсутствии ингибирования ПЦР;
4. показатель эффективности реакции находился в диапазоне 90-110%.

На рисунке 11 приведен пример, когда результат ПЦР не может быть интерпретирован, поскольку отсутствует флуоресцентный сигнал от нормировочного гена *HPRT* по каналу Cy5. В таком случае необходимо повторное проведение анализа образца.

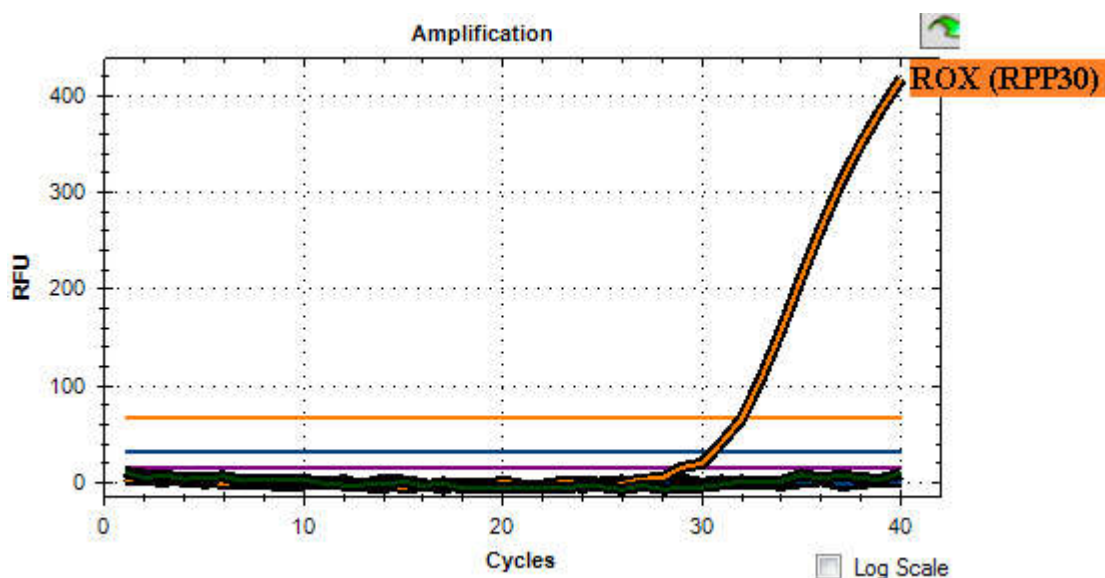


Рисунок 11. График флуоресценции, отражающий динамику образования продуктов реакции в ходе амплификации. Отсутствует флуоресцентный сигнал от нормировочного гена *HPRT* по каналу Cy5

На рисунке 12 приведен пример результата ПЦР образца ДНК, уровни молекул TREC и KREC в котором могут быть интерпретированы как нулевые. Такой вывод можно сделать на основании того, что накопление флуоресценции от двух нормировочных генов *RPP30* (канал ROX) и *HPRT* (канал Cy5) происходит, но отсутствуют флуоресцентные сигналы по каналам FAM и HEX, свидетельствующие о накоплении ДНК-продуктов TREC и KREC, соответственно.

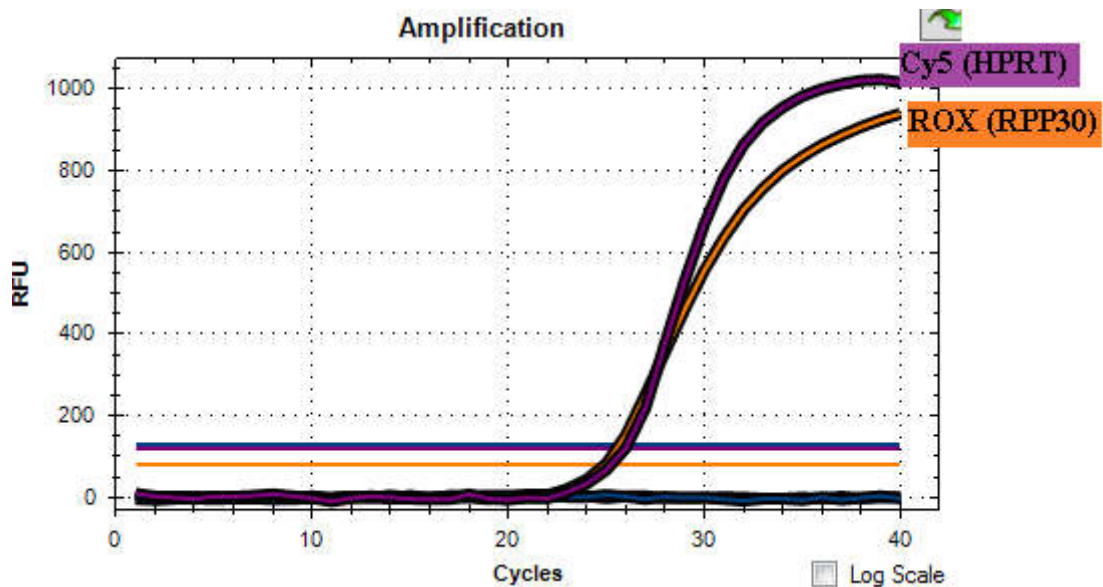


Рисунок 12. График флуоресценции, отражающий динамику образования продуктов реакции в ходе амплификации образца с нулевыми уровнями TREC и KREC. Отсутствуют флуоресцентные сигналы по каналам FAM и HEX (соответствуют целевым ДНК-мишеням TREC и KREC, соответственно)

На рисунке 13 изображен результат ПЦР-анализа, когда нулевым является только уровень молекул TREC в образце (отсутствует только флуоресцентный сигнал по каналу FAM).

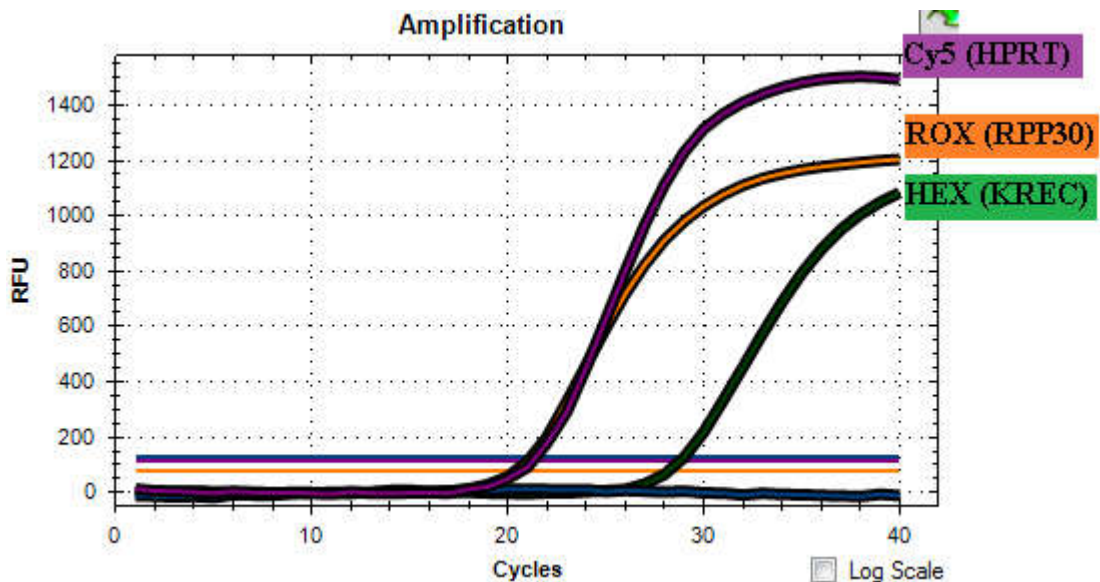


Рисунок 13. График флуоресценции, отражающий динамику образования продуктов реакции в ходе амплификации образца с нулевым уровнем TREC. Отсутствует флуоресцентный сигнал по каналу FAM (соответствует целевой ДНК-мишени TREC)

На рисунке 14 приведен пример результата ПЦР с ДНК-пробой, где уровни двух целевых аналитов и TREC, и KREC не являются нулевыми. Для таких проб фиксировали флуоресцентные сигналы по четырем описанным выше каналам детекции.

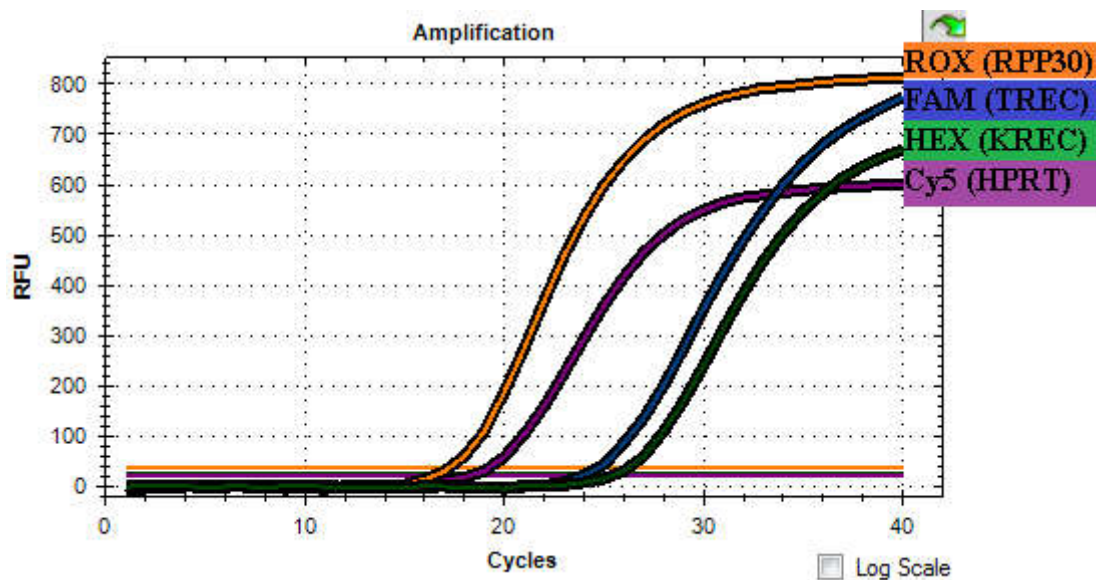


Рисунок 14. График флуоресценции, отражающий динамику образования продуктов реакции в ходе амплификации образца с нормальными уровнями TREC и KREC. Зарегистрировано накопление флуоресцентного сигнала по четырем каналам детекции (FAM, HEX, ROX, Cy5)

Уровни целевых ДНК-фрагментов TREC и KREC в пробе ДНК рассчитывали по формулам (5) и (6), указанным в главе 2. На рисунке 15 крестами отмечены концентрации ДНК-мишеней TREC, KREC, HPRT и RPP30 анализируемой пробы относительно стандартных (калибровочных) графиков.

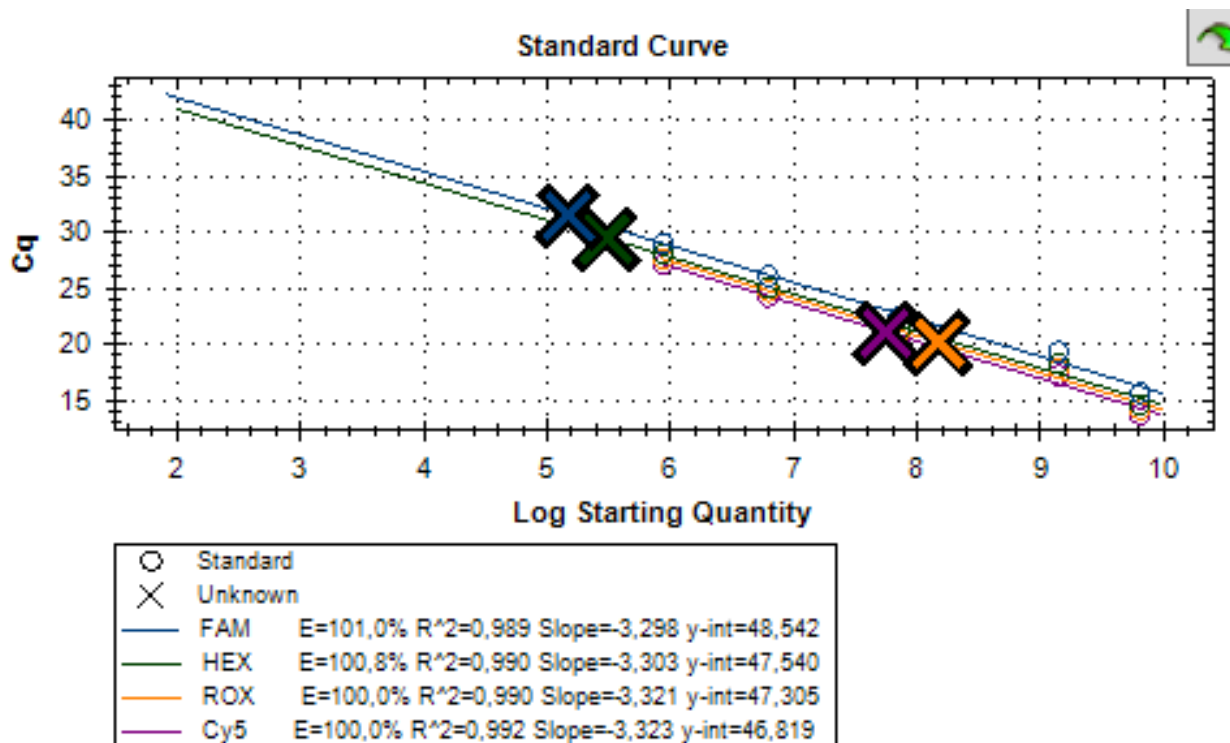


Рисунок 15. Расположение концентраций ДНК-фрагментов TREC, KREC, HPRT и RPP30 в анализируемой пробе (обозначено крестами) относительно стандартных кривых. Синий крест соответствует фрагменту TREC, зеленый крест соответствует фрагменту KREC, оранжевый – фрагменту RPP30, фиолетовый – фрагменту HPRT

ГЛАВА 4. ОПИСАНИЕ АНАЛИТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК РАЗРАБОТАННОГО МЕТОДА

4.1. Аналитическая специфичность

Установлено, что амплифицируемые ДНК-фрагменты имеют сходство только с нуклеотидными последовательностями генов TREC, KREC, RPP30 и HPRT в геноме человека (Рисунок 16).

А

| Description | Scientific Name | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Acc. Len | Accession |
|---|-----------------|-----------|-------------|-------------|---------|------------|-----------|-------------|
| Genomic sequences | | | | | | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens chromosome 14, GRCh38.p13 Primary Assembly | Homo sapiens | 100 | 145 | 93% | 1e-19 | 96.67% | 107043718 | NC_000014.9 |

Б

| Description | Scientific Name | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Acc. Len | Accession |
|--|-----------------|-----------|-------------|-------------|---------|------------|-----------|--------------|
| Genomic sequences | | | | | | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens chromosome 2, GRCh38.p13 Primary Assembly | Homo sapiens | 73.1 | 73.1 | 42% | 2e-11 | 100.00% | 242193529 | NC_000002.12 |

В

| Description | Scientific Name | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Acc. Len | Accession |
|---|-----------------|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------|-------------|
| Transcripts | | | | | | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1), mRNA | Homo sapiens | 294 | 294 | 100% | 1e-77 | 100.00% | 1395 | NM_000194.3 |

Г

| Description | Scientific Name | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Acc. Len | Accession |
|---|-----------------|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------|----------------|
| Transcripts | | | | | | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens ribonuclease P/MRP subunit p30 (RPP30), transcript variant 2, mRNA | Homo sapiens | 169 | 169 | 100% | 3e-40 | 100.00% | 2332 | NM_006413.5 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens ribonuclease P/MRP subunit p30 (RPP30), transcript variant 1, mRNA | Homo sapiens | 169 | 169 | 100% | 3e-40 | 100.00% | 4251 | NM_001104546.2 |

Рисунок 16. Анализ *in silico* анализируемых фрагментов нуклеотидных последовательностей генов человека: А - фрагмента целевой молекулы ДНК TREC, Б - фрагмента целевой молекулы ДНК KREC, В - фрагмента ДНК эталонного нормировочного гена HPRT, Г - фрагмента ДНК эталонного нормировочного гена RPP30

4.2. Аналитическая чувствительность

Аналитическую чувствительность разработанного метода оценивали исходя из предела обнаружения и аналитического диапазона измерений концентраций ДНК TREC/KREC. Результаты оценки представлены в таблице 12.

Таблица 12. Оценка предела обнаружения концентраций молекул TREC/KREC с применением разработанного метода на основе Real-time ПЦР

| Пов- торы | Разведение Калибратора К1 | | | | | | | |
|--------------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------|
| | 1 | 10^{-1} | 10^{-2} | 10^{-3} | 10^{-4} | 10^{-5} | 10^{-6} | 10^{-7} |
| Концентрация ДНК TREC/KREC, копий/мл | | | | | | | | |
| 1 | 816986120 | 86022060 | 8437204 | 892078 | 85538 | 9699 | 944 | - |
| 2 | 848540232 | 82454507 | 8486106 | 889312 | 89312 | 9578 | 839 | - |
| M±S | 832763200 | 84238280 | 8461655 | 890695 | 87425 | 9638 | 891 | - |
| | ±22312130 | ±2522641 | ±34578 | ±1955 | ±2668 | ±85 | ±74 | |
| | (8,3±0,2) $\times 10^8$ | (8,4±0,2) $\times 10^7$ | (8,5±0,0) $\times 10^6$ | (8,9±0,0) $\times 10^5$ | (8,7±0,3) $\times 10^4$ | (9,6±0,1) $\times 10^3$ | (0,9±0,1) $\times 10^3$ | - |

Примечание: M - среднее арифметическое значение определяемых концентраций молекул TREC/KREC, S – стандартное отклонение.

Из данных, приведенных в таблице 12, следует, что предел обнаружения составил 10^3 копий ДНК TREC/KREC на 1 мл анализируемого образца. Аналитический диапазон измерений ДНК TREC/KREC - от 10^3 до 10^8 копий/мл.

Аналитическая чувствительность разработанного ПЦР-метода составила 10^3 копий ДНК TREC/KREC на 1 мл анализируемого образца.

4.3. Линейность измерений

Результат оценки линейности измерений концентраций молекул TREC и KREC в ДНК-пробе представлен в таблице 13.

Таблица 13. Оценка линейности измерений с помощью разработанного ПЦР-метода

| Раз- веде- ние | Калибратор К1 | | | Калибратор К3 | | | Калибратор К5 | | |
|----------------------|-----------------|-------------|---------|-----------------|-------------|-------|-----------------|-------------|-------|
| | Спр, коп./мл | Ст, коп./мл | Л, % | Спр, коп./мл | Ст, коп./мл | Л, % | Спр, коп./мл | Ст, коп./мл | Л, % |
| 1 | 866020401 | 848705300 | 100,4 | 7898948 | 8625894 | 103,2 | 32007 | 35657 | 106,8 |
| | 818574452 | | | 8202392 | | | 37324 | | |
| | 896990206 | | | 8423507 | | | 34793 | | |
| | 821402969 | | | 9278132 | | | 40029 | | |
| | 834561086 | | | 9156191 | | | 36816 | | |
| | 843586118 | | | 8157523 | | | 32975 | | |
| | 859802196 | | | 9264562 | | | 32007 | | |
| M ₁ | 848705300 | | 8625894 | | 35657 | | | | |
| 5 | 165525046 | 789537445 | 93,4 | 1829809 | 9037305 | 108,1 | 6981 | 32915 | 98,5 |
| | 152172271 | | | 1887288 | | | 6105 | | |
| | 162243209 | | | 1847538 | | | 6272 | | |
| | 155081463 | | | 1703036 | | | 7006 | | |
| | 152805141 | | | 1740694 | | | 6129 | | |
| | 164393529 | | | 1879781 | | | 7487 | | |
| | 153131768 | | | 1764081 | | | 6105 | | |
| M ₅ | 157907489 | | 1807461 | | 6583 | | | | |
| 25 | 35500439 | 798369150 | 94,5 | 287621 | 8827100 | 105,6 | 1615 | 32250 | 96,5 |
| | 27994205 | | | 337875 | | | 1078 | | |
| | 35060072 | | | 315055 | | | 1165 | | |
| | 32305877 | | | 361695 | | | 1347 | | |
| | 30006273 | | | 345202 | | | 1504 | | |
| | 32873456 | | | 419010 | | | 1104 | | |
| | 29803037 | | | 405130 | | | 1222 | | |
| M ₂₅ | 31934766 | | 353084 | | 1290 | | | | |

Продолжение Таблицы 13

| Раз- веде- ние | Калибратор К1 | | | Калибратор К3 | | | Калибратор К5 | | |
|----------------------|-----------------|-------------|-------|-----------------|-------------|------|-----------------|-------------|--------------|
| | Спр, коп./мл | Ст, коп./мл | Л, % | Спр, коп./мл | Ст, коп./мл | Л, % | Спр, коп./мл | Ст, коп./мл | Л, % |
| 125 | 6616332 | 776644625 | 91,9 | 63518 | 8193875 | 98,0 | 120 | 43265 | 129,5 |
| | 6719501 | | | 69341 | | | 263 | | |
| | 6359649 | | | 65301 | | | 102 | | |
| | 6152376 | | | 59924 | | | 396 | | |
| | 6041215 | | | 68142 | | | 252 | | |
| | 5824748 | | | 67201 | | | 703 | | |
| | 5778282 | | | 65428 | | | 587 | | |
| M ₁₂₅ | 6213157 | | 65551 | | 346 | | | | |

Примечание: Спр – практически рассчитанная концентрация образца, М - среднее арифметическое концентраций образца, рассчитанных в семи повторях ПЦР, Ст – теоретическая концентрация образца.

Из данных, приведенных в таблице 13, следует, что линейность измерений, рассчитанную по формуле (7), наблюдали в интервале концентраций: от $1,29 \times 10^3$ до $8,49 \times 10^8$ копий/мл (показатель линейности находится в диапазоне 90-110 %). Для концентраций ниже 10^3 копий/мл ($0,35 \times 10^3$ копий/мл) линейность не показана (129,5 %). Следовательно, интервал линейности измерений составил $10^3 - 10^8$ копий/мл.

4.4. Точность измерений

Результаты расчетов практически определяемых концентраций $S_{пр}$ для образца, состоящего из смеси проб калибраторов К4 и К5 с заданными концентрациями ДНК $3,13 \times 10^5$ и $3,34 \times 10^4$ копий/мл, соответственно, с применением разработанного ПЦР-метода, представлены в таблице 14.

Таблица 14. Оценка точности (правильности) измерений концентрации ДНК с применением разработанного ПЦР-метода

| Номер повтора | Образец | Практическая концентрация ДНК ($C_{пр}$), копий/мл |
|---------------|---------|--|
| 1 | K4+K5 | 157821 |
| 2 | K4+K5 | 159034 |
| 3 | K4+K5 | 165649 |
| 4 | K4+K5 | 171550 |
| 5 | K4+K5 | 172565 |
| 6 | K4+K5 | 163528 |
| 7 | K4+K5 | 178641 |
| 8 | K4+K5 | 157697 |
| M±S | | 165810±7782 |
| | | $(1,66±0,08) \times 10^5$ |

Примечание: M – среднее арифметическое значение, S - стандартное отклонение

Согласно формуле (9) теоретическое значение этих концентраций $C_t = (3,13 \times 10^5 + 3,34 \times 10^4) / 2 = 1,73 \times 10^5$ копий /мл. Согласно формуле (8) точность измерений метода $TI = (1,66 \times 10^5 / 1,73 \times 10^5) \times 100 = 95,95 \%$, что соответствует нормативному показателю (90 – 110 %).

При оценке точности (правильности) измерений в 8 повторах с использованием разных амплификаторов, точность измерений на приборе планшетного типа («CFX96») составила 97,73 %, а на приборе роторного типа («Rotor-Gene 3000») - 96,22 %, что соответствует нормативным требованиям (90 – 110 %).

4.5. Внутрисерийная и межсерийная воспроизводимость

Результат оценки внутрисерийной воспроизводимости и воспроизводимости при использовании разных амплификаторов представлен в таблице 15.

Таблица 15. Оценка внутрисерийной воспроизводимости результатов анализа с применением разработанного ПЦР-метода

| Повторы | Концентрация ДНК, копий/мл | | | |
|--------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| | Комплект реагентов №1 серии 001 | | Комплект реагентов №2 серии 001 | |
| | Амплификатор «CFX96» | Амплификатор «Rotor-Gene 3000» | Амплификатор «CFX96» | Амплификатор «Rotor-Gene 3000» |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 88295778 | 87637381 | 83938045 | 84829243 |
| 2 | 80971409 | 94067490 | 94065122 | 85943992 |
| 3 | 82762115 | 88424492 | 84694444 | 84989851 |
| 4 | 83958871 | 83092861 | 84380319 | 87355311 |
| 5 | 87347796 | 81224566 | 83272496 | 84221254 |
| 6 | 80387853 | 91252767 | 94851763 | 81309588 |
| 7 | 84653433 | 85123834 | 88399076 | 88624201 |
| 8 | 93195107 | 89119165 | 94839876 | 93825988 |
| P₂₋₄ | 0,1814 | | | |
| P₃₋₅ | 0,5872 | | | |
| P₂₋₃ | 0,2974 | | | |
| P₄₋₅ | 0,3566 | | | |
| CV_{в/с}, % | 5,48 | | | |
| CV_{м/п}, % | 4,94 | | | |

Примечание: P в столбце №1 обозначает значения P-value при сравнении результатов анализа с использованием разных комплектов реагентов и разных амплификаторов. P-value всегда принимало значение $>0,05$, что свидетельствует об отсутствии статистически значимой разницы в измерениях. CV_{в/с} – коэффициент внутрисерийной вариации измерений, CV_{м/п} – коэффициент вариации измерений при использовании разных приборов

Результат оценки межсерийной воспроизводимости представлен в таблице 16.

Таблица 16. Оценка межсерийной воспроизводимости результатов анализа с применением разработанного ПЦР-метода

| Повторы | Концентрация ДНК TREC/KREC | |
|------------------------|----------------------------|--------------------------|
| | Комплект №1 серии 001 | Комплект №1 серии 002 |
| 1 | 2 | 3 |
| 1 | 37439189 | 35879179 |
| 2 | 30796431 | 37924525 |
| 3 | 31732362 | 30672677 |
| 4 | 34362734 | 30916339 |
| 5 | 35374776 | 33004638 |
| 6 | 33033978 | 31920523 |
| 7 | 35849873 | 33212947 |
| 8 | 36148350 | 32836360 |
| P₂₋₃ | 0,3965 | |
| CV м/с, % | 6,80 | |

Примечание: P₂₋₃ – P-value при сравнении столбцов №2 и №3. Принимает значение >0,05, что свидетельствует об отсутствии статистически значимой разницы в измерениях. См/с – коэффициент межсерийной вариации измерений

Как следует из данных, приведенных в таблицах 15 и 16, результаты измерений концентрации ДНК в пробе Калибратора К2 достоверно не различаются между комплектами №1 и №2 внутри серии и между комплектами реагентов различных серий (P>>0,05%). Также нет статистически значимых различий между результатами измерений, полученными при использовании различных приборов (амплификатор

«CFX96» и амплификатор «Rotor-Gene 3000»). Коэффициенты вариации измерений CV, рассчитанные по формуле (10) при испытаниях внутрисерийной, межсерийной воспроизводимости и воспроизводимость при использовании разных амплификаторов не превышают 8 %.

ГЛАВА 5. ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАЗРАБОТАННОГО ПЦР-МЕТОДА

5.1. Определение референтных интервалов уровней ДНК-молекул TREC и KREC в периферической крови

При определении референтных интервалов целевых анализов TREC и KREC для взрослых людей добровольцы были разделены на шесть возрастных групп: 18-29 лет (n=120), 30-39 лет (n=118), 40-49 лет (n=132), 50-59 лет (n=135), 60-69 лет (n=111), и лица старше 70 лет (n=101), где n – количество человек в группе.

Корреляционный анализ по Спирмену позволил установить отрицательную зависимость концентрации молекул TREC в образцах крови с возрастом участников исследования (Рисунок 17.А.). При этом коэффициент корреляции Спирмена $r = -0,80$ (P-value < 0,0001), что говорит о высокой значимой отрицательной корреляции значений TREC с возрастом (согласно шкале Чеддока). Кроме того, попарное сравнение возрастных групп с применением критерия Манна-Уитни позволило выявить достоверные различия в количественном содержании молекул TREC в образцах между разными возрастными группами (Рисунок 17.Б).

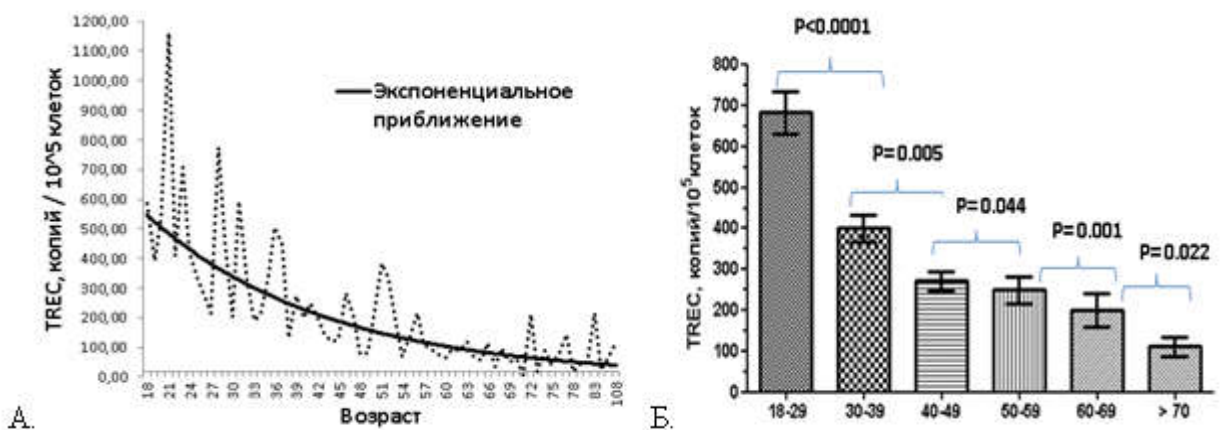


Рисунок 17. А. Обратная зависимость концентрации молекул TREC в образцах крови от возраста представителей популяции. Б. Диаграмма количественного содержания молекул TREC в образцах разных возрастных групп

На рисунке 17.Б. для каждого попарного сравнения групп указаны P-value, которые всегда принимали значения $< 0,05$, что свидетельствует о статистически значимых различиях значений анализа между исследуемыми выборками.

При этом корреляционная зависимость содержания молекул KREC в образцах крови от возраста не установлена (Рисунок 18.А.). Коэффициент корреляции Спирмена $r = -0,007$ (P-value = 0,9530). Статистически значимые различия между возрастными группами по критерию KREC также не выявлены (Рисунок 18.Б.). При попарном сравнении возрастных групп по критерию KREC P-value всегда принимали значения, превышающие 0,05 (на рисунке не отображено).

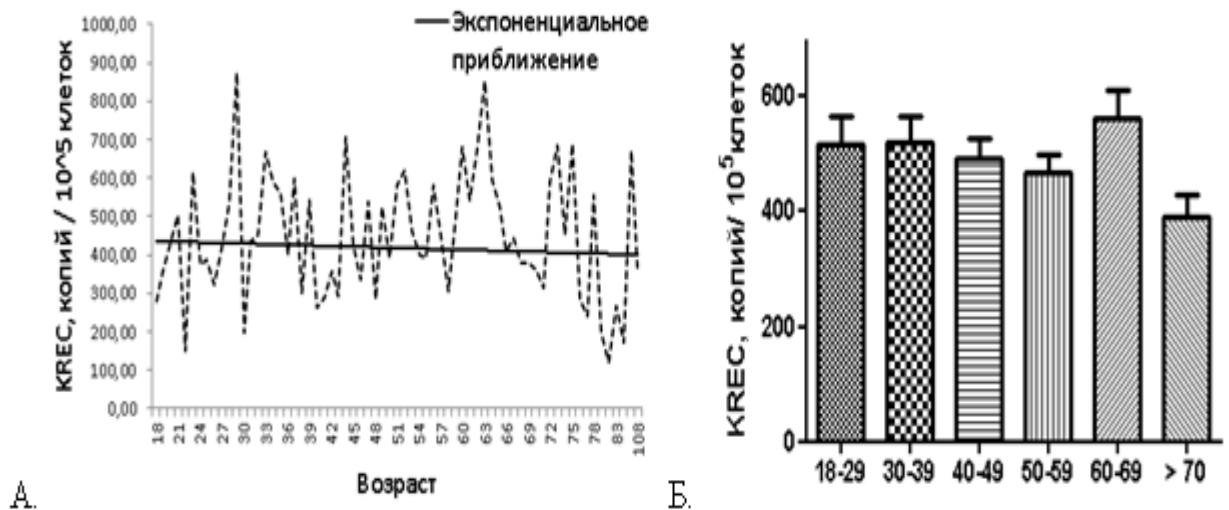


Рисунок 18. А. Зависимость концентрации молекул KREC в образцах крови от возраста представителей популяции. Б. Диаграмма количественного содержания молекул KREC в образцах разных возрастных групп

Референтные интервалы анализа TREC были установлены для каждой возрастной группы (таблица 17).

Таблица 17. Референтные интервалы уровней молекул TREC в периферической крови для исследованных возрастных групп (значения указаны в копиях TREC на 10^5 клеток)

| | 18-29 лет | 30-39 лет | 40-49 лет | 50-59 лет | 60-69 лет | >70 лет |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------|
| Медиана | 553,30 | 252,70 | 191,30 | 131,10 | 74,87 | 44,71 |
| Нижняя граница | 44,91 | 23,60 | 18,27 | 13,98 | 12,54 | 11,43 |
| Верхняя граница | 2135,00 | 1597,00 | 1098,00 | 1543,00 | 1715,00 | 683,10 |

Поскольку статистически значимых различий в числовых значениях анализа KREC между возрастными группами не выявлено, для этого параметра рассчитан единый РИ: 49,90 – 1478,00 копий/ 10^5 клеток (медиана 385,7 копий/ 10^5 клеток).

В ходе работы были также определены нижние границы норм целевых анализов TREC и KREC у здоровых доношенных новорожденных. Нижняя граница неонатальной нормы уровней TREC составила 892,6 копий/ 10^5 клеток, уровней KREC – 400,4 копий/ 10^5 клеток.

Различий уровней TREC и KREC в зависимости от пола как среди новорожденных, так и среди взрослых лиц в рамках возрастных групп не выявлено.

5.2. Особенности преаналитического этапа при количественном определении TREC/KREC в периферической крови

5.2.1. Влияние ошибок пробоподготовки на количественный результат анализа TREC/KREC при работе с картами Гатри

При визуальном осмотре карт Гатри, пропитанных каплями крови новорожденных, полученных из родильных домов и других медицинских учреждений в рамках настоящего исследования, было выявлено значительное количество некорректно подготовленных образцов. Среди ошибок подготовки сухих капель крови встречалось не полное заполнение кровью обозначенной

окружности, неоднородная или недостаточная пропитка фильтра, многослойное нанесение крови на бланк, а также точечное нанесение капель дозатором, царапины и иные повреждения бумажного фильтра. Кроме того, некоторые карты содержали признаки неполного высушивания образца перед хранением и транспортировкой. В некоторых случаях карта Гатри содержала только одну из двух окружностей, заполненных образцом крови корректным образом. На рисунке 19 приведено изображение правильно подготовленного образца крови (А), и примеры ошибок при пробоподготовке сухого пятна крови (Б).

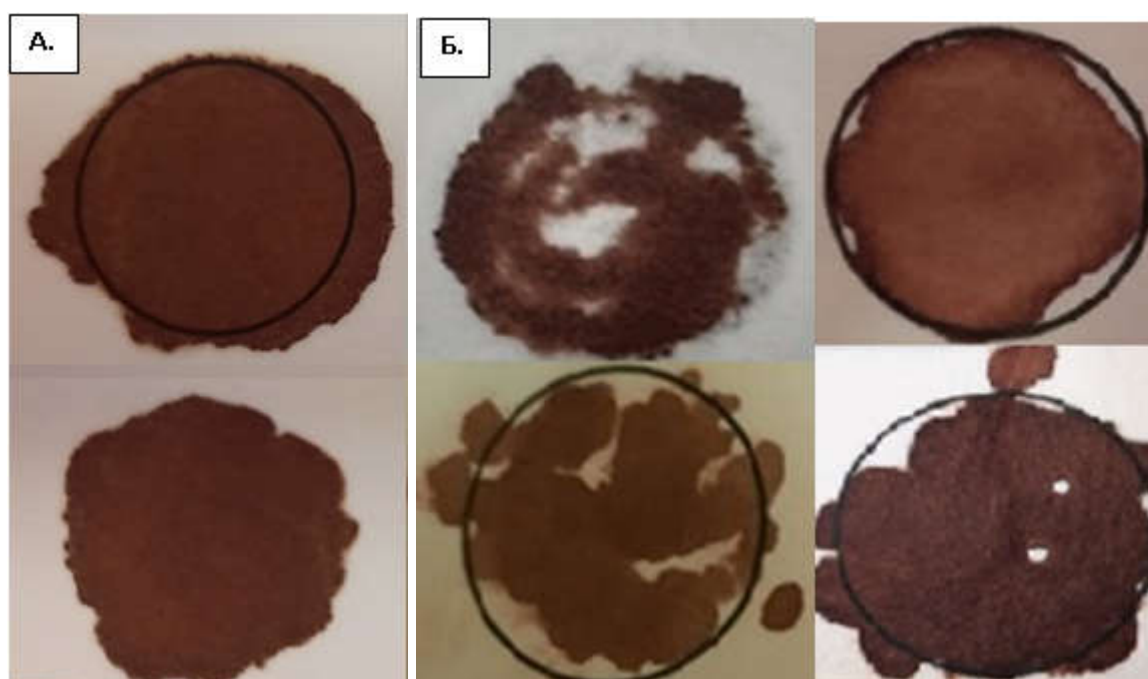


Рисунок 19 Изображение сухих капель крови на картах Гатри: А) подготовленных с соблюдением рекомендаций (вверху – лицевая сторона, внизу - оборотная), Б) с допущением ошибок при пробоподготовке: не полное и не равномерное пропитывание фильтра, точечное и послойное нанесение капель дозатором, не полное заполнение кровью обозначенной окружности

Количество некорректно взятых образцов в первые месяцы настоящей работы превышало треть всех получаемых ДНК-карт. В связи с чем, для медицинского персонала было проведено обучение грамотному взятию, высушиванию и хранению материала, а затем на протяжении пяти месяцев еженедельно осуществлялся контроль подготовки сухих капель крови и, при необходимости, повторно демонстрировалась последовательность верных

манипуляций. В результате обучения количество некорректно взятого материала снизилось до уровня, не превышающего 1% от всех получаемых образцов (Рисунок 20).

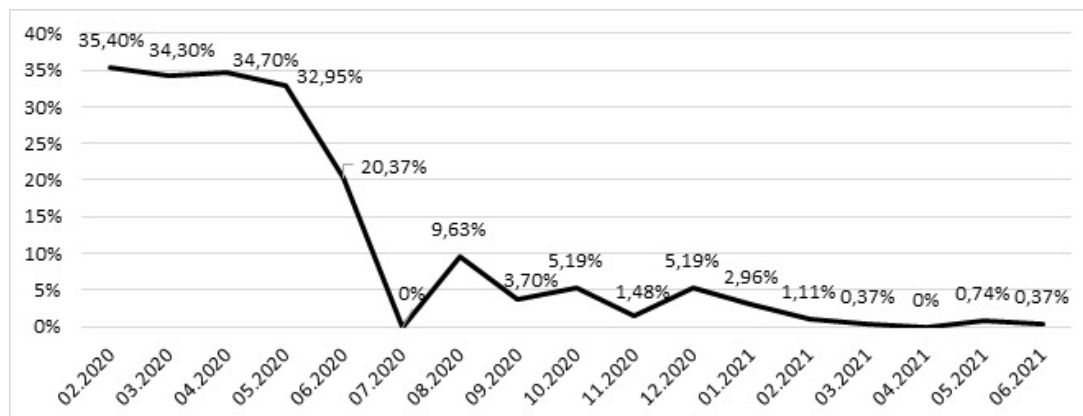
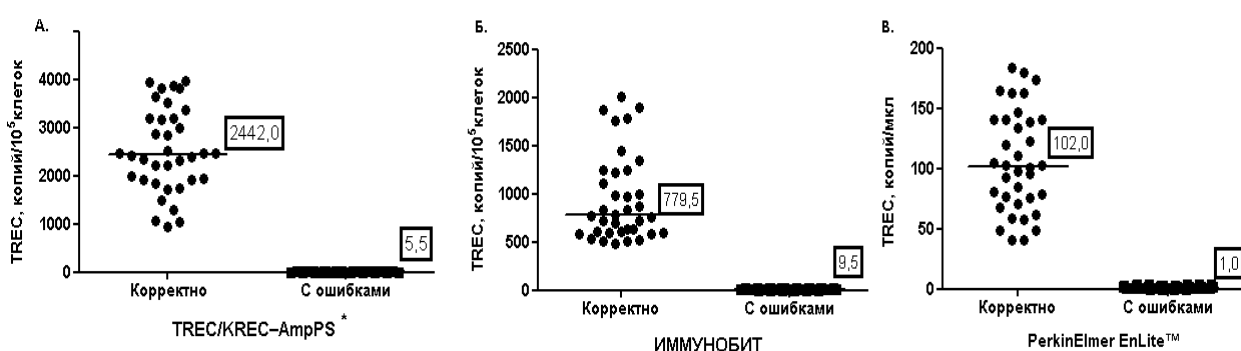


Рисунок 20. Динамика количества некорректно подготовленных сухих капель крови на картах Гатри, получаемых из медицинских учреждений в рамках исследования, по месяцам

При параллельном анализе образцов, представленных двумя пятнами крови, одно из которых нанесено некорректно, было показано очевидное различие получаемых результатов. При использовании корректно взятого пятна крови здоровых младенцев уровни TREC и KREC превышали нижние пороговые уровни и соответствовали нормам содержания эксцизионных колец у новорожденных, указанных для каждой используемой тест-системы. У здоровых взрослых, обследованных при использовании ДНК, экстрагированной из корректно собранных образцов сухих капель крови, уровни TREC и KREC превышали 44,9 копий/10⁵ клеток и 49,9 копий/10⁵ клеток, соответственно, что согласуется с установленными граничными нормами для лиц 18-29 лет.

При использовании ДНК, выделенной из сухих пятен крови с ошибками нанесения материала на карту Гатри, для большей части образцов (для новорожденных в 64 %, для взрослых в 78 % случаев) не удавалось провести анализ, так как выход продуктов амплификации отсутствовал: флуоресцентные сигналы нормировочных генов не нарастали в ходе реакции. Это может свидетельствовать о деградации ДНК в таких образцах и,

соответственно, ее недостаточном количестве для анализа. В остальных случаях для ДНК, полученной из таких образцов, наблюдали нарастание флуоресценции в ходе ПЦР для всех мишеней. Для таких образцов рассчитанные уровни TREC/KREC были значительно ниже определенной нормы содержания соответствующих эксцизионных колец в периферической крови. На рисунке 21 представлена сравнительная оценка уровней TREC, рассчитанных для одних и тех же образцов крови новорожденных, нанесенных на карты Гатри с соблюдением протокола взятия биоматериала (корректно) и с допущением ошибок.



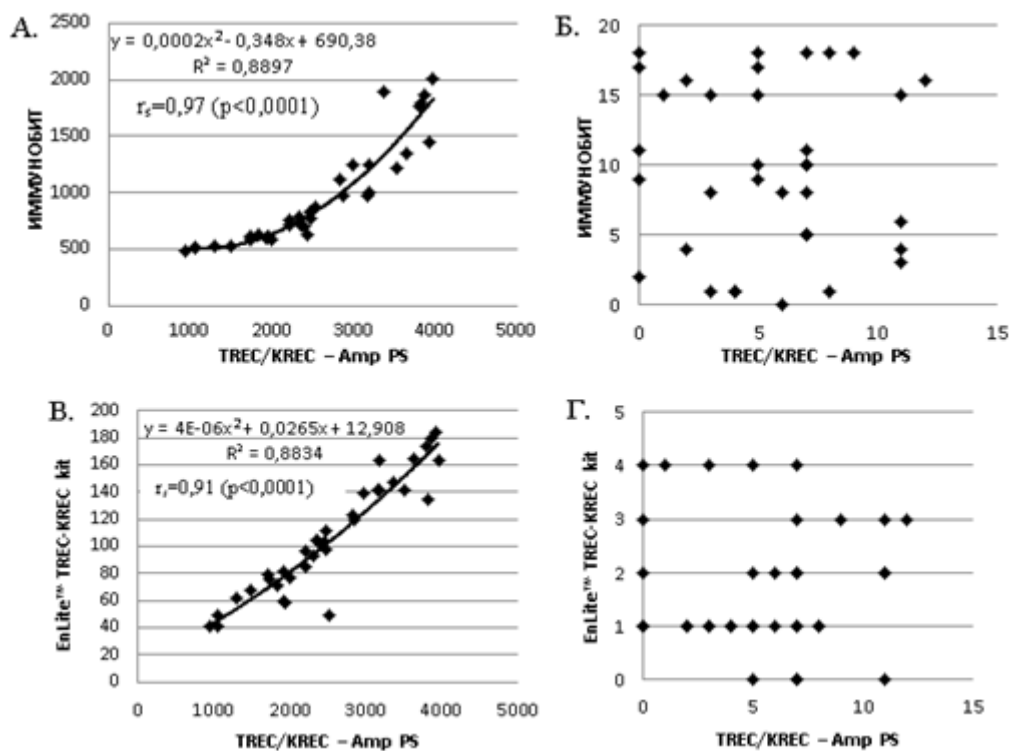
* разработанный метод ПЦР-анализа TREC/KREC и соответствующий набор реагентов обозначен как «TREC/KREC-Amp PS»

Рисунок 21. Сравнение уровней TREC, определенных с использованием разных наборов реагентов, в образцах крови новорожденных, нанесенных на карты Гатри с соблюдением рекомендаций (корректно) и с допущением ошибок: А) «TREC/KREC-Amp PS» (копий/10⁵ клеток), НИИ им. Пастера; Б) «ИММУНОБИТ» (копий/10⁵ клеток), АБВ-Тест; В) «EnLite™ TREC-KREC kit» (копий/мкл), PerkinElmer. Числами на диаграммах обозначены медианные значения анализа

Во всех случаях уровень молекул TREC, определенный в образцах крови, взятых с нарушениями рекомендаций, значительно отличался от рассчитанного в корректно взятых образцах (во всех случаях $p < 0,0001$), и был близок к нулевому значению.

Уровни молекул TREC, определенные с использованием разных наборов реагентов для одного и того же образца крови, отличались по значению, поскольку разные тест-системы используют разные протоколы анализа, способы нормировки данных, единицы измерений. Однако была показана корреляция между значениями TREC, рассчитанными с использованием

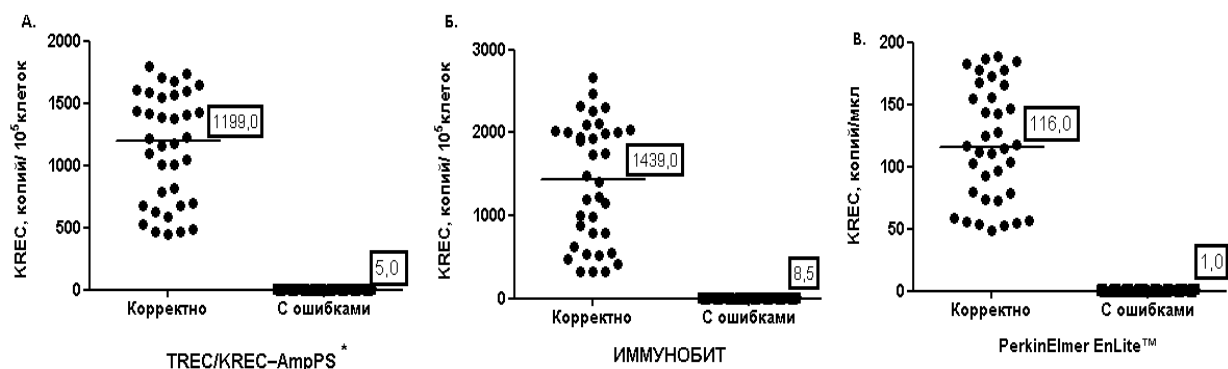
разных протоколов, для одного и того же набора образцов крови в том случае, если соблюдались условия нанесения капель крови на карту Гатри и их хранения. Корреляционная зависимость между данными отсутствовала, если при пробоподготовке были допущены грубые ошибки (Рисунок 22). При сравнении значений, полученных с использованием разработанного нами метода (обозначен как «TREC/KREC-Amp PS») с тест-системами «ИММУНОБИТ» и «EnLite™», значения коэффициентов корреляции Спирмена (r_s) в обоих случаях превышали значение 0,9, что говорит об очень высокой силе связи между сравниваемыми выборками (Рисунок 22, А и В). В случае нарушений в процессе пробоподготовки корреляция между полученными значениями TREC отсутствовала (Рисунок 22, Б и Г).



* разработанный метод ПЦР-анализа TREC/KREC и соответствующий набор реагентов обозначен как «TREC/KREC-Amp PS»

Рисунок 22. Корреляция уровней TREC, определенных с использованием разных наборов реагентов и разных условий подготовки проб: А) «TREC/KREC-Amp PS» и «ИММУНОБИТ», соблюдение рекомендаций пробоподготовки; Б) «TREC/KREC-Amp PS» и «ИММУНОБИТ», некорректная пробоподготовка; В) «TREC/KREC-Amp PS» и «EnLite™ TREC-KREC kit» PerkinElmer, соблюдение рекомендаций пробоподготовки; Г) «TREC/KREC-Amp PS» и «EnLite™ TREC-KREC kit» PerkinElmer, некорректная пробоподготовка

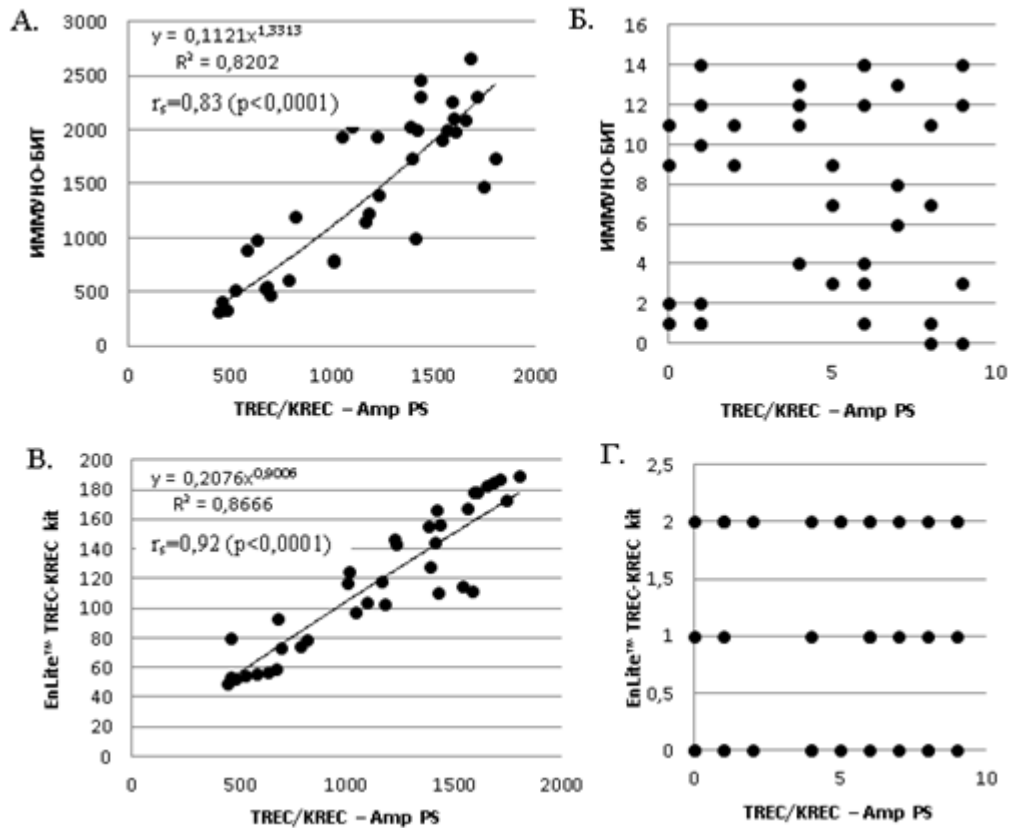
Аналогичные данные получены при оценке уровней KREC в описанных выше образцах крови новорожденных: при нарушении рекомендаций по сбору и хранению крови на картах Гатри уровни KREC оказывались значительно ниже ($p < 0,0001$) при сравнении с теми же образцами в условиях соблюдения всех рекомендаций пробоподготовки (Рисунок 23).



* разработанный метод ПЦР-анализа TREC/KREC и соответствующий набор реагентов обозначен как «TREC/KREC-Amp PS»

Рисунок 23. Сравнение уровней KREC, определенных с использованием разных наборов реагентов, в образцах крови новорожденных, нанесенных на карты Гатри с соблюдением рекомендаций (корректно) и с допущением ошибок: А) «TREC/KREC-Amp PS» (копий/ 10^5 клеток), НИИ им. Пастера; Б) «ИММУНОБИТ» (копий/ 10^5 клеток), АБВ-Тест; В) «EnLite™ TREC-KREC kit» (копий/мкл), PerkinElmer. Числами на диаграммах обозначены медианные значения анализа

На рисунке 24 отображена корреляция уровней KREC, рассчитанных с использованием разных тест-систем, для одного и того же набора образцов крови в случаях, когда соблюдались условия нанесения капель крови на карту Гатри (А и В) и когда образцы были взяты некорректно (Б и Г).



* разработанный метод ПЦР-анализа TREC/KREC и соответствующий набор реагентов обозначен как «TREC/KREC-Amp PS»

Рисунок 24 Корреляция уровней KREC, определенных с использованием разных наборов реагентов и разных условий подготовки проб: А) «TREC/KREC-Amp PS» и «ИММУНОБИТ», соблюдение рекомендаций пробоподготовки; Б) «TREC/KREC-Amp PS» и «ИММУНОБИТ», некорректная пробоподготовка; В) «TREC/KREC-Amp PS» и «EnLite™ TREC-KREC kit» PerkinElmer, соблюдение рекомендаций пробоподготовки; Г) «TREC/KREC-Amp PS» и «EnLite™ TREC-KREC kit» PerkinElmer, некорректная пробоподготовка

При работе с образцами крови, полученными от лиц 18 – 29 лет, также наблюдали значительное снижение уровней и TREC ($p < 0,0001$), и KREC ($p < 0,0001$) в тех случаях, когда были допущены ошибки при нанесении крови на бумажный фильтр или при его высушивании (Рисунок 25).

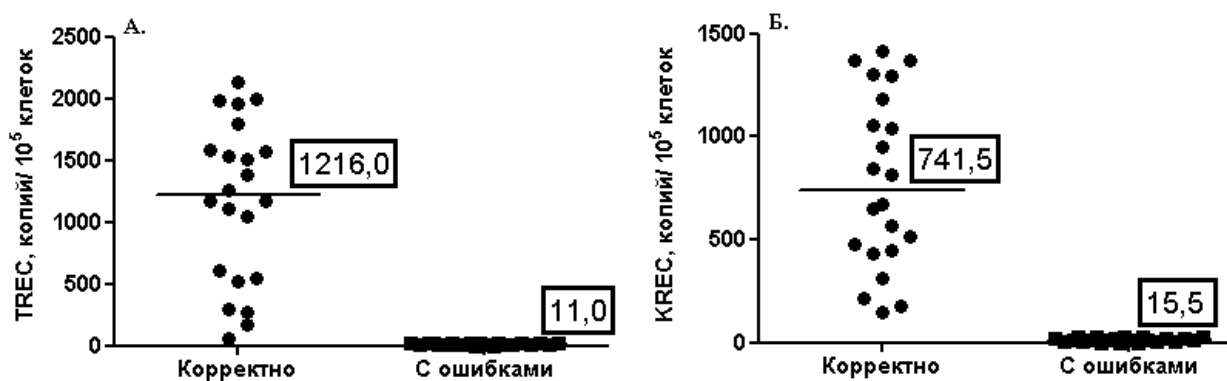


Рисунок 25. Сравнение уровней TREC (А) и KREC (Б), определяемых в образцах крови людей старше 18 лет, собранных на карты Гатри с соблюдением всех рекомендаций и с ошибками при пробоподготовке. Анализ проведен с применением разработанного в ходе работы ПЦР-метода. Числами на диаграммах обозначены медианные значения аналитов

Несмотря на то, что сухие пятна крови дают некоторые преимущества перед венепункцией, необходимо учитывать, что бумажные бланки карт Гатри при нанесении на них крови из пяток младенцев будут пропитаны разными объемами биообразца от случая к случаю. В ходе работы было установлено, что объем крови, попадающий на бумажный бланк, не влияет на определяемый разработанным ПЦР-методом уровень TREC и KREC. Вне зависимости от объема крови (одного и того же образца), наносимого на бумажный фильтр, получали сопоставимые концентрации молекул и TREC, и KREC. При сравнении медиан, рассчитанных для каждой группы образцов, значимых различий не выявлено ($p > 0,05$) (Рисунок 26).

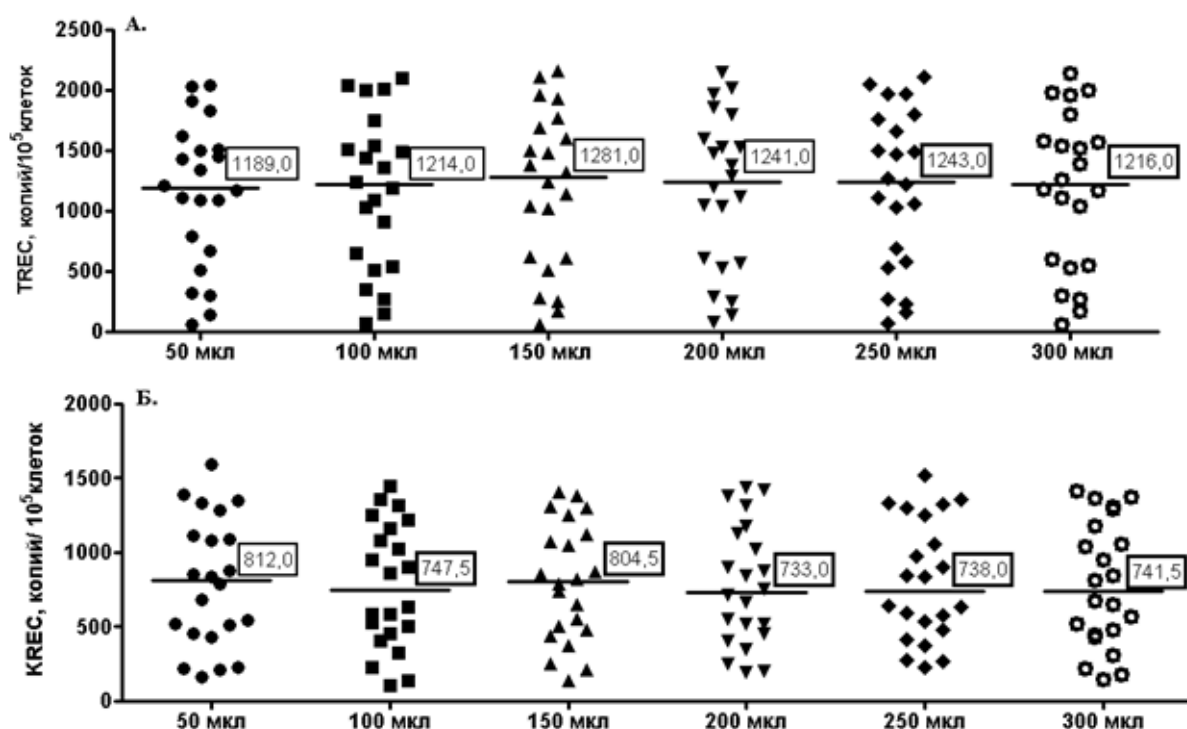


Рисунок 26. Сравнение уровней TREC(A) и KREC (Б) в пробах крови, полученной от людей старше 18 лет, при ее корректном нанесении на карты Гатри в разных объемах и последующей экстракции суммарной ДНК из сухих капель крови. Числами обозначены медианные значения для каждой группы образцов

Показана достоверная корреляция между значениями и TREC (A), и KREC (Б), определенными в пробах ДНК, полученной из карт Гатри, пропитанных разными объемами крови, полученной от одного и того же индивидуума. Множественный коэффициент детерминации $R^2 > 0,98$ (и для анализа TREC, и для анализа KREC) свидетельствует об очень высокой тесноте связи между полученными параметрами (Рисунок 27).

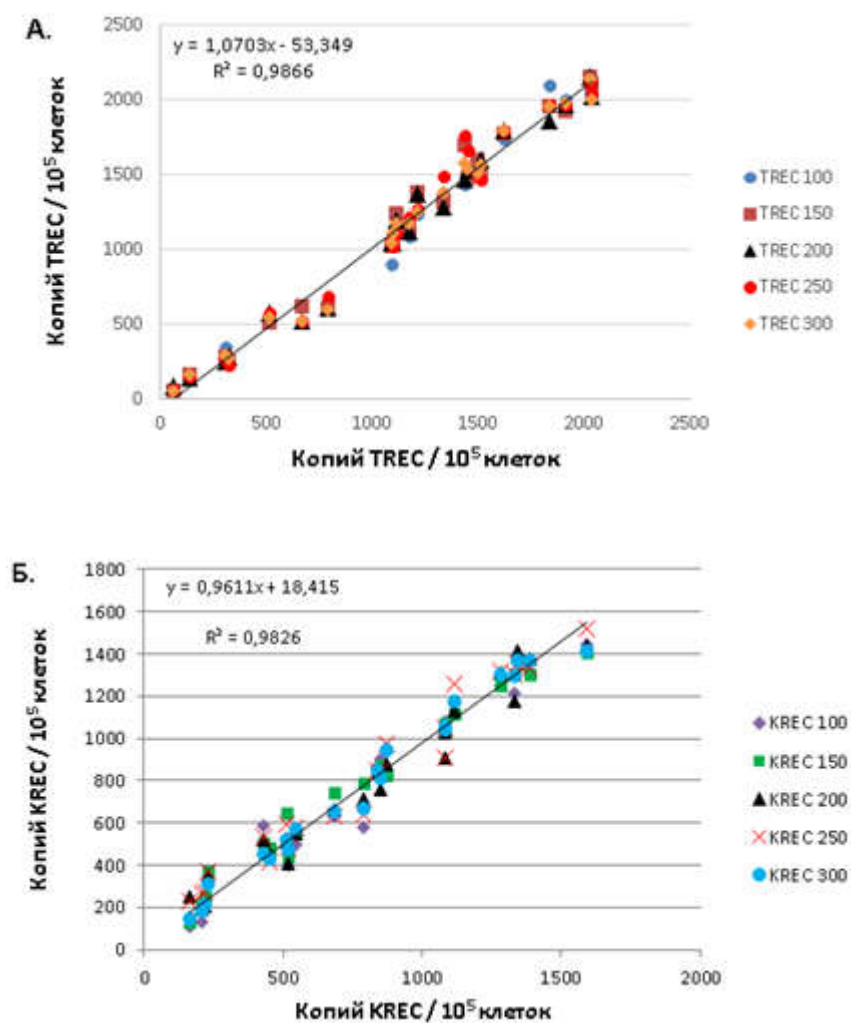


Рисунок 27. Корреляция уровней TREC (А) и KREC (Б), рассчитанных в пробах ДНК, экстрагированных из карт Гатри, пропитанных разными объемами крови, полученной от одного и того же индивидуума. Множественный коэффициент детерминации $R^2 > 0,98$ свидетельствует об очень высокой тесноте связи между полученными параметрами

Таким образом, при корректном взятии и высушивании образца крови объем использованного материала не оказывает влияния на результаты анализа уровней TREC и KREC в периферической крови. По всей видимости, это связано с тем, что нормировка данных осуществляется с учетом количества клеток крови в исследуемом образце.

5.2.2. Влияние выбора метода экстракции ДНК из сухих капель крови на определяемые уровни TREC/KREC

При сравнительном анализе наборов для выделения нуклеиновых кислот учитывали несколько критериев: концентрацию и чистоту получаемого

препарата ДНК, простоту методики, продолжительность выделения, а также возможность автоматизации процесса.

Результаты сравнения перечисленных параметров представлены в таблице 18.

Таблица 18. Сравнение наборов для экстракции ДНК из сухих пятен крови

| Параметры сравнения | Экстра-ДНК-Био, (Алкор-био, Россия) | ЭКСТРА-преп PS, (ФБУН НИИ им. Пастера, Россия) | МагноПрайм ЮНИ (ручное выделение), (ФБУН ЦНИИЭ, Россия) | МагноПрайм ЮНИ (автомат), (ФБУН ЦНИИЭ, Россия) |
|---|-------------------------------------|--|---|--|
| Чистота ДНК (A260/A280)* | 2,20±0,23 | 1,89±0,23 | 2,31±0,21 | 2,85±0,09 |
| Концентрация ДНК* | 15,28 мкг/мл | 16,26 мкг/мл | 62,5 мкг/мл | 102,28 мкг/мл |
| Количество этапов | 4 | 4 | 5 | 5 |
| Продолжительность выделения из расчета на 30 образцов | 65 минут | 65 минут | 75 минут | 40 минут + пробоподготовка 31 минут |
| Автоматизация | - | - | | + |

* - средние значения для 30 образцов

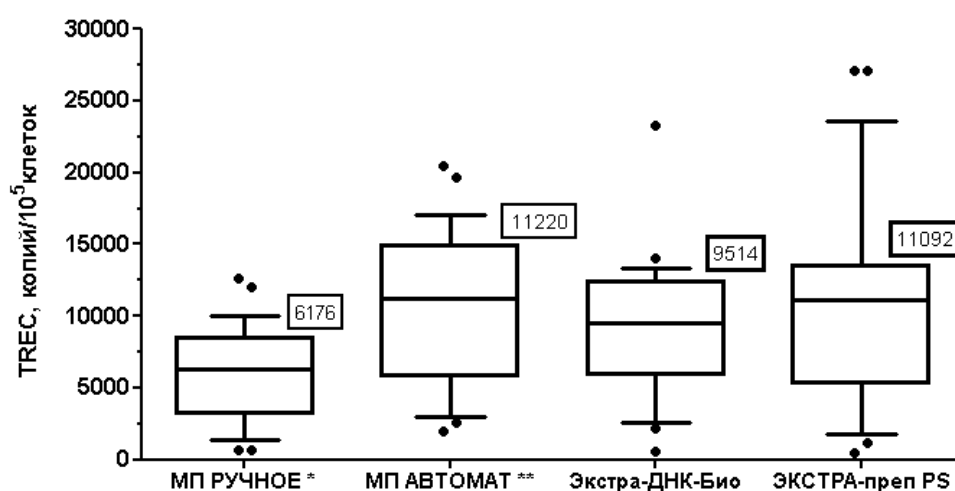
Из таблицы видно, что в препаратах ДНК, выделенных набором «МагноПрайм ЮНИ» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия) ручным и автоматическими способами и набором «Экстра-ДНК-Био» (Алкор-Био, Россия) значения чистоты (соотношение A260/A280) находились в интервале от 2,20 - 2,85, что указывает на наличие примесей РНК в пробах.

При использовании всех сравниваемых наборов для экстракции НК, концентрации всех проб ДНК были достаточными для проведения ПЦР-анализа. Максимальная концентрация ДНК была получена при автоматическом выделении набором «МагноПрайм ЮНИ» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия) и в среднем составляла 102,28 нг/мкл.

Для оценки влияния этапа экстракции НК на результат анализа, для одного и того же биологического материала ПЦР проводили четыре раза с использованием ДНК-проб, выделенных четырьмя разными

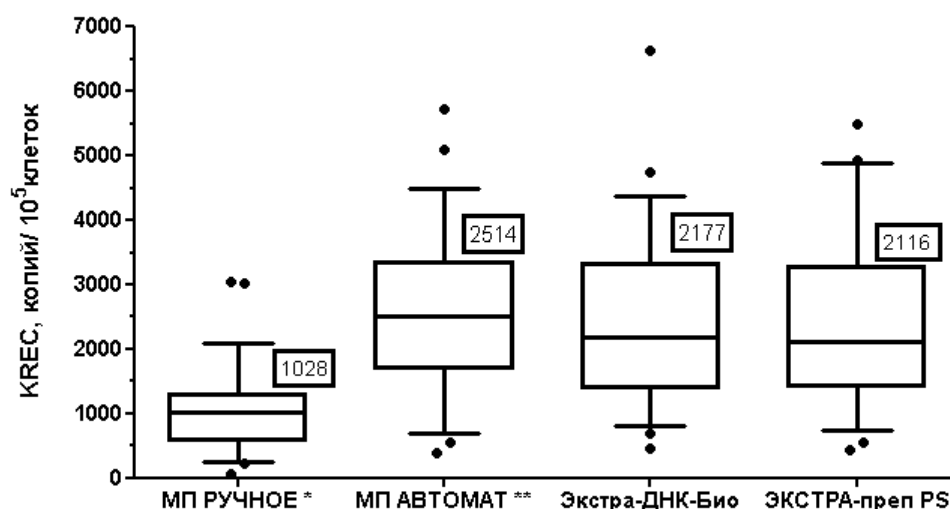
способами/наборами. Таким образом, для одного новорожденного получали четыре значения уровней молекул TREC и KREC в крови. Количественный результат определялся только системой выделения, поскольку все остальные этапы анализа для всех образцов были идентичными.

В реакциях со всеми образцами, независимо от протокола выделения, наблюдали нарастание флуоресцентных сигналов от двух генов внутреннего контроля, что говорит об эффективности очистки препарата от ингибиторов всеми четырьмя использованными наборами/способами. На рисунках 28 и 29 изображены диаграммы сравнения уровней TREC и KREC, соответственно, в группах образцов ДНК, экстрагированных разными способами, с указанием медианного значения в группе.



* - «МагноПрайм ЮНИ» Ручное выделение, ** - «МагноПрайм ЮНИ» Автоматическое выделение

Рисунок 28. Диаграмма сравнения уровней молекул TREC в группах ДНК-образцов, выделенных разными наборами/способами. Числами обозначены медианные значения TREC в группе



* - «МагноПрайм ЮНИ» Ручное выделение, ** - «МагноПрайм ЮНИ» Автоматическое выделение

Рисунок 29. Диаграмма сравнения уровней молекул KREC в группах ДНК-образцов, выделенных разными наборами/способами. Числами обозначены медианные значения KREC в группе

В таблицах 19 и 20 указаны минимальные, медианные и максимальные уровни TREC и KREC, соответственно, в разных группах ДНК-образцов, а также значения P-value при обнаружении статистически значимых различий в уровнях аналитов между группами.

Таблица 19. Уровни молекул TREC в крови новорожденных при выделении ДНК разными наборами реагентов

| | Уровень молекул TREC, копий/10 ⁵ копий | | | |
|-----------------------|---|--|------------------|------------------|
| | «МагноПрайм ЮНИ» Ручное выделение | «МагноПрайм ЮНИ» Автоматическое выделение | «Экстра-ДНК-Био» | «ЭКСТРА-преп PS» |
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Minimum | 643,7 | 1954 | 557,4 | 436,5 |
| 25% Percentile | 2990 | 5811 | 5944 | 5278 |
| Median | 6176 | 11220 | 9514 | 11092 |
| 75% Percentile | 8489 | 14967 | 12405 | 13542 |
| Maximum | 12598 | 20456 | 23272 | 27074 |

Примечание. Значения P-value при наличии значимых различий: P₁₋₂ =0,0010, P₁₋₃ =0,0061, P₁₋₄ =0,0058.

Таблица 20. Уровни молекул KREC в крови новорожденных при выделении ДНК разными наборами реагентов

| | Уровень молекул KREC, копий/10 ⁵ копий | | | |
|-----------------------|---|--|------------------|------------------|
| | «МагноПрайм ЮНИ» Ручное выделение | «МагноПрайм ЮНИ» Автоматическое выделение | «Экстра-ДНК-Био» | «ЭКСТРА-преп PS» |
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Minimum | 72,90 | 379,7 | 459,8 | 443,1 |
| 25% Percentile | 580,6 | 1698 | 1393 | 1409 |
| Median | 1028 | 2514 | 2177 | 2116 |
| 75% Percentile | 1288 | 3342 | 3316 | 3273 |
| Maximum | 3047 | 5716 | 6637 | 5497 |

Примечание. Значения P-value при наличии значимых различий: P₁₋₂ <0,0001, P₁₋₃ <0,0001, P₁₋₄ <0,0001.

Согласно примененному критерию Краскела-Уоллиса и тесту Данна, значимые различия и по параметру TREC, и по параметру KREC присутствуют между группой образцов ДНК, экстрагированных с использованием набора реагентов «МагноПрайм ЮНИ» при ручном выделении, с группами образцов, экстрагированных другими способами («МагноПрайм ЮНИ» при автоматическом выделении) или наборами («Экстра-ДНК-Био», «ЭКСТРА-преп PS»).

5.2.3. Оценка эквивалентности результатов при использовании в качестве исследуемого материала цельной крови и сухих капель крови

Во всех проанализированных случаях при параллельных тестированиях условно здоровых лиц и в цельной крови, и в сухой капле крови не выявлено снижения уровней TREC и KREC. При анализе образцов, полученных от больных с ПИД, показано параллельное снижение уровней TREC и/или KREC в цельной крови и в сухой капле крови (Таблица 21).

Таблица 21. Результат оценки эквивалентности цельной крови и сухих капель крови у больных с ПИД

| № пробы | Возраст пациента, лет | Концентрация ДНК, копий/10 ⁵ кл. | | | | | |
|---------|-----------------------|---|---------------|-------------------|----------------------|---------------|-------------------|
| | | TREC | | | KREC | | |
| | | Нижняя граница нормы | Цельная кровь | Сухая капля крови | Нижняя граница нормы | Цельная кровь | Сухая капля крови |
| 1 | 20 | 45 | 86 | 88 | 43 | 0 | 0 |
| 2 | 47 | 18 | 185 | 125 | | 35 | 23 |
| 3 | 37 | 32 | 26 | 28 | | 13 | 7 |
| 4 | 50 | 14 | 39 | 36 | | 18 | 23 |
| 5 | 22 | 45 | 22 | 29 | | 72 | 114 |
| 6 | 38 | 32 | 54 | 59 | | 22 | 13 |
| 7 | 26 | 45 | 0 | 0 | | 0 | 0 |
| 8 | 60 | 12 | 0 | 0 | | 0 | 0 |
| 9 | 36 | 32 | 0 | 0 | | 0 | 0 |
| 10 | 25 | 45 | 0 | 0 | | 37 | 19 |

Примечание: выделены образцы, для которых показано снижение уровней TREC и/или KREC

При оценке корреляции результатов уровней TREC, полученных при анализе образцов ДНК, экстрагированных из цельной крови и сухих пятен крови, коэффициент Спирмена $r_s = 0,7265$, $p < 0,0001$ (95 % ДИ: 0,6674-0,7765), теснота связи по шкале Чеддока - высокая. При анализе уровней KREC $r_s = 0,7349$, $p < 0,0001$ (95 % ДИ: 0,6773-0,7836), теснота связи по шкале Чеддока – высокая.

Таким образом, в ходе работы показана эквивалентность результатов ПЦР-анализа уровней молекул TREC и KREC, выполненного при использовании образца цельной крови с гемостабилизатором ЭДТА и сухой капли крови, полученных от одного и того же человека. Разработанный нами

метод позволяет использовать в качестве клинического материала, как цельную кровь, так и сухую каплю крови на карте Гатри.

5.3. Диагностическая значимость разработанного ПЦР-метода

5.3.1. Оценка диагностической значимости метода при первичных иммунодефицитных состояниях

По результатам ROC-анализа при сравнении выборок взрослых условно здоровых лиц и больных с диагностированными первичными иммунодефицитами по критериям TREC и KREC, определенных с использованием разработанного ПЦР-метода, площадь под ROC-кривой для уровней TREC составила $0,98 \pm 0,015$ при 95 % ДИ: 0,9489-1,009, $p < 0,0001$; для уровней KREC составила $0,99 \pm 0,003$ при 95 % ДИ: 0,9918-1,003, $p < 0,0001$ (Рисунок 30).

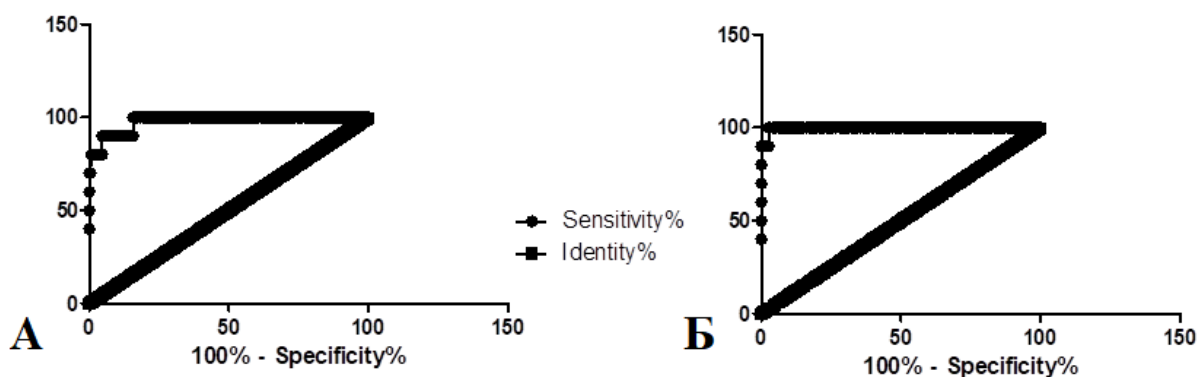


Рисунок 30. Изображение ROC-кривых, построенных при сравнении результатов анализа выборок взрослых условно здоровых лиц и больных с диагностированными первичными иммунодефицитами, по параметрам TREC (А) и KREC (Б)

При проведении сравнительного ROC-анализа по параметрам TREC и KREC для выборок условно здоровых и больных с диагностированным ПИД новорожденных площадь под ROC-кривой достигла единицы при 95 % ДИ: 1,000-1,000, $p < 0,0001$ (Рисунок 31).

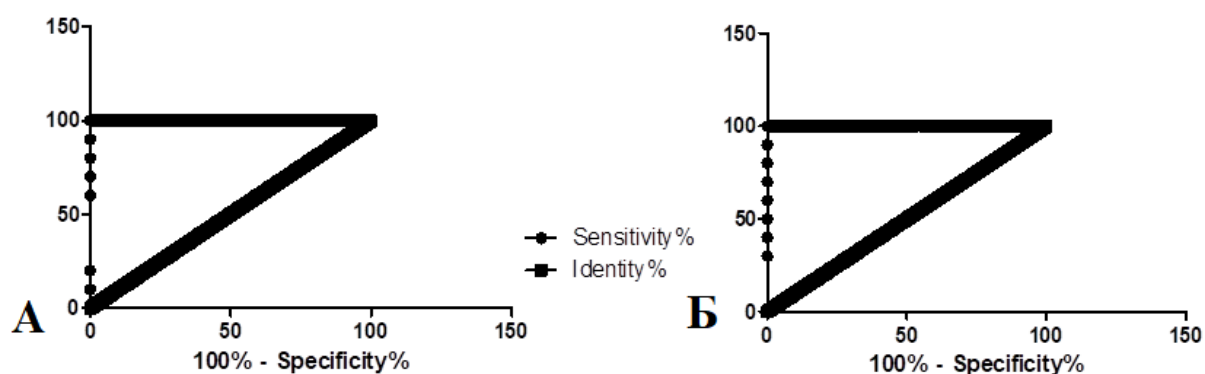


Рисунок 31. Изображение ROC-кривых, построенных при сравнении уровней TREC (А) и KREC (Б) у условно здоровых новорожденных и детей с диагностированными ПИД, определенных с использованием разработанного ПЦР-метода

Были проанализированы пробы ДНК, выделенные из образцов сухих пятен крови, полученных от десяти новорожденных с диагнозом ПИД различного генеза. Для всех этих образцов были зафиксированы сниженные уровни молекул TREC и KREC в крови по сравнению с референтным нижним значением (Таблица 22).

Таблица 22. Уровни молекул TREC и KREC в крови новорожденных с диагнозом ПИД

| № п/п | Диагноз | Клинические проявления | Уровень TREC, копий/ 10^5 клеток | Уровень KREC, копий/ 10^5 клеток |
|-------|----------------|---|------------------------------------|------------------------------------|
| 1 | Синдром CHARGE | - порок сердца - укорочение длины верхних и нижних конечностей - гипоплазия тимуса - недоразвитие костей мозгового черепа - недоразвитие пальцев стоп - задержка роста и развития - неонатальный сепсис | 2* | 198 |
| 2 | ТКИД | - синдром дыхательных расстройств - парез ЖКТ - пневмония | 1 | 213 |

Продолжение таблицы 22

| № п/п | Диагноз | Клинические проявления | Уровень ТREC, копий/10 ⁵ клеток | Уровень КREC, копий/10 ⁵ клеток |
|-------|--|---|--|--|
| 3 | ПИД недифференцированный | неонатальный сепсис | 2 | 255 |
| 4 | Транзиторная гипогаммаглобулинемия детского возраста | - неонатальный сепсис - синдром дыхательных расстройств - бронхолегочная дисплазия - малые аномалии развития сердца (открытое овальное отверстие) | 2 | 173 |
| 5 | Транзиторная гипогаммаглобулинемия детского возраста | неонатальный сепсис | 8 | 0 |
| 6 | ТКИД, транзиторная гипогаммаглобулинемия детского возраста | - неонатальный сепсис - бронхолегочная дисплазия - интерстициальная легочная эмфизема (тяжелое течение) | 0 | 18 |
| 7 | Транзиторная гипогаммаглобулинемия детского возраста, синдром CHARGE | - врожденный порок сердца (дефект межжелудочковой перегородки, открытый артериальный проток) - малые аномалии развития сердца (открытое овальное отверстие) - атрезия пищевода - микрогении - деформация и укорочение ребер | 2 | 36 |
| 8 | ПИД недифференцированный, агаммаглобулинемия | малые аномалии развития сердца (открытое овальное отверстие) | 5 | 42 |
| 9 | Транзиторная гипогаммаглобулинемия детского возраста, ОВИН | - пневмония - неонатальный сепсис - синдром дыхательных расстройств | 21 | 0 |

Продолжение таблицы 22

| № п/п | Диагноз | Клинические проявления | Уровень TREC, копий/10 ⁵ клеток | Уровень KREC, копий/10 ⁵ клеток |
|-------|--|---|--|--|
| 10 | Транзиторная гипогаммаглобулинемия детского возраста | - анемия тяжелой степени - синдром дыхательных расстройств | 38 | 0 |

*Примечание: установленная для новорожденных нижняя граница нормы молекул TREC - 892,6 копий/10⁵ клеток, молекул KREC - 400,4 копий/10⁵ клеток

Данные, представленные в таблицах 21 и 22, свидетельствуют о том, что при анализе образцов крови, полученных от пациентов с диагнозом Первичный иммунодефицит, отсутствовали как ложноотрицательные, так и ложноположительные результаты при определении уровней TREC и KREC. Среди условно здоровых лиц ложноположительные результаты регистрировали в 2 % случаев. Ложноположительными случаями считали выявление сниженных уровней TREC и/или KREC у здоровых лиц. Сравнение результатов определения уровней TREC и KREC с использованием разработанного метода и коммерческих наборов реагентов среди условно здоровых лиц и у лиц с диагностированными первичными иммунодефицитами, представлено в таблице 23.

Таблица 23. Соответствие определения уровней TREC, KREC у здоровых лиц и пациентов с первичными иммунодефицитами

| Пациенты | Данные по TREC и KREC | Разработанный метод | ИММУНО-БИТ | EnLite™ TREC-KREC kit |
|-----------------------|----------------------------------|---------------------|------------|-----------------------|
| Условно здоровые лица | Нормальные уровни TREC и KREC | 98% | 98% | 97% |
| Пациенты с ПИД | Сниженные уровни TREC и/или KREC | 100% | 100% | 100% |

При оценке ранговой корреляции уровней TREC, определенных в крови условно здоровых новорожденных и детей с диагностированными ПИД, с помощью разработанного нами метода и коммерческим набором «ИММУНО-БИТ» (АБВ-Тест, Москва), коэффициент корреляции Спирмена $r_s = 0,7932$, $p < 0,0001$ (95 % ДИ: 0,5714-0,9070), теснота связи по шкале Чеддока - высокая. При анализе уровней KREC $r_s = 0,8511$, $p < 0,0001$ (95 % ДИ: 0,6805-0,9342), теснота связи по шкале Чеддока – высокая (Рисунок 32).

При сравнении полученных результатов с использованием разработанного нами метода и набора «EnLite™ TREC-KREC kit» (PerkinElmer, Финляндия) коэффициент корреляции для уровней TREC $r_s = 0,8130$, $p < 0,0001$ (95 % ДИ: 0,6078-0,9164), для KREC $r_s = 0,7495$, $p < 0,0001$ (95 % ДИ: 0,4941-0,8858). Теснота связи в обоих случаях высокая, согласно шкале Чеддока.

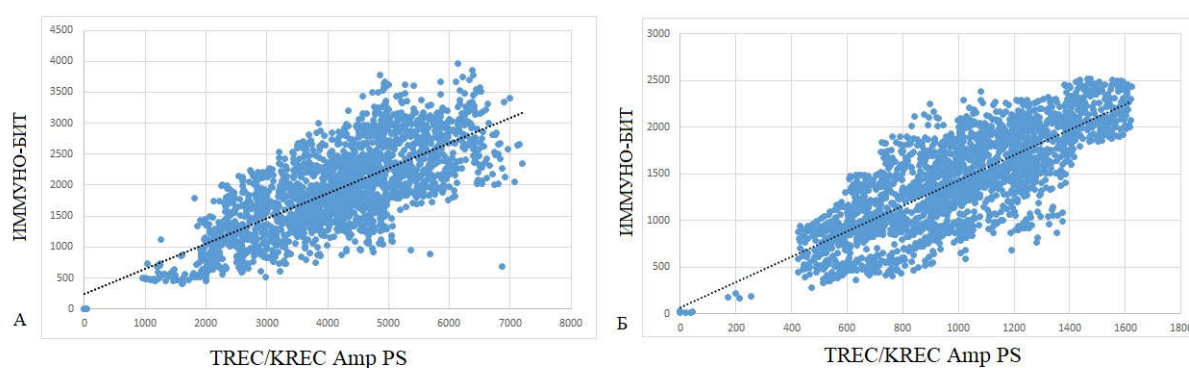


Рисунок 32. Корреляция результатов, полученных с использованием разработанного в ходе работы ПЦР-метода и коммерческой тест-системы «ИММУНО-БИТ». А – TREC, Б – KREC

В таблице 24 приведены показатели диагностической информативности определения уровней TREC и KREC при обследовании лиц на наличие ПИД.

Таблица 24. Показатели диагностической информативности разработанного метода количественной оценки TREC и KREC при диагностике ПИД

| Определяемый аналит | Se | Sp | PPV | NPV | LR+ | LR- | Prev | coPrev | Acc |
|---------------------|------|------|------|------|-------|------|--------|--------|------|
| TREC | 0,80 | 0,99 | 0,44 | 0,99 | 249,3 | 4,9 | 0,0032 | 0,9968 | 0,99 |
| KREC | 0,95 | 0,99 | 0,49 | 0,99 | 296,2 | 19,9 | 0,0032 | 0,9968 | 0,99 |
| TREC+KREC | 0,75 | 0,99 | 0,43 | 0,99 | 233,9 | 4,0 | 0,0032 | 0,9968 | 0,99 |

Исходя из данных таблицы 6 и таблицы 24, можно заключить, что определение уровня TREC с целью диагностики ПИД обладает умеренной чувствительностью ($Se=0,80$) и высокой специфичностью ($Sp=0,99$). Из ста больных у 80 человек результат анализа будет положительным (сниженный уровень TREC) и из 100 человек с отсутствием диагноза у 99 из них результат анализа будет отрицательным (TREC не снижен). Определение уровня KREC обладает высокой чувствительностью ($Se=0,95$) и высокой специфичностью ($Sp=0,99$). Из 100 пациентов с диагнозом ПИД у 95 из них результат анализа будет положительным (сниженный уровень KREC), и из 100 здоровых человек у 99 результат анализа будет отрицательным (уровень KREC не снижен).

Очевидна информативность положительных результатов количественного анализа (уровень аналита ниже референтного интервала) TREC ($PPV\ 0,44 \gg Prev.\ 0,0032$), и KREC ($PPV\ 0,49 \gg Prev\ 0,0032$). У обследуемых со сниженным уровнем TREC вероятность наличия иммунодефицита выше в 137,5 раз ($PPV/Prev$) по сравнению с распространенностью заболевания, при сниженном уровне KREC вероятность наличия иммунодефицита выше в 153,1 раз. Отрицательный результат анализа (уровень аналита превышает нижнюю границу референтного интервала) не гарантирует отсутствие заболевания у обследуемого ($NPV \rightarrow coPrev$) и при оценке уровня TREC, и при оценке уровня KREC.

Согласно данным таблиц 24 и 7, отношение правдоподобия для положительных результатов $LR+$ при анализе TREC (TREC снижен), равное 249,3, можно интерпретировать как очень высокое повышение шансов наличия иммунодефицита у субъекта после получения положительного результата теста. Отношение правдоподобия для отрицательных результатов (TREC не снижен) $LR-$ составило 4,9, что свидетельствует о посредственном уменьшении шансов отсутствия иммунодефицита при отрицательном результате анализа. При анализе уровня KREC, величина $LR+$ равная 296,2 свидетельствует о очень высоком повышении шансов наличия иммунодефицита у пациента при получении положительного результата теста

(KREC снижен). Величина LR- равная 19,9 свидетельствует об умеренном уменьшении шансов отсутствия иммунодефицита в случае отрицательного анализа (KREC не снижен).

Диагностическая точность (или эффективность) анализа TREC и KREC при выявлении ПИД стремиться к 1 (0,99) и для аналита TREC, и для аналита KREC (Таблица 24).

Поскольку разработанный метод позволяет в ходе одной ПЦР определять уровни TREC и KREC одновременно для каждой пробы ДНК, при диагностике можно учитывать концентрации сразу двух аналитов (Таблица 24). Однако, стоит отметить, что так как этиология и патогенез различных ПИД сильно варьируют, вероятность того, что у пациента с диагнозом будут одновременно снижены уровни TREC и KREC меньше вероятности того, что у больного будет снижен уровень хотя бы одного из исследуемых аналитов. Этим объясняется снижение чувствительности метода при таком подходе. А также уменьшение параметра отношения правдоподобия для положительных результатов и для отрицательных результатов (особенно относительно параметра KREC).

5.3.2. Оценка диагностической значимости метода при инфекционных заболеваниях

5.3.2.1. Уровни TREC и KREC у ВИЧ-инфицированных лиц

Анализ содержания TREC и KREC в образцах цельной крови, полученной от ВИЧ-инфицированных больных, показал достоверное снижение уровней целевых аналитов у длительное время инфицированных пациентов с вирусологической неэффективностью АРТ по сравнению с контрольной группой.

Площадь под ROC-кривой для параметра TREC составила $0,9997 \pm 0,0003$, при 95 % ДИ: 0,9989 - 1,000, $p < 0,0001$. Для параметра KREC площадь под ROC-кривой составила $0,9948 \pm 0,0024$, при 95 % ДИ: 0,9900 - 0,9996, $p < 0,0001$. При этом показатели чувствительности и специфичности метода

стремятся к 1 при анализе TREC ($Se = 0,99$, $Sp = 0,99$) и при анализе KREC ($Se = 0,99$, $Sp = 0,99$). Статистически значимой разницы между уровнями ДНК TREC и KREC у здоровых людей и у лиц с впервые выявленным ВИЧ со сроком инфицирования менее одного года не выявлено (Рисунок 33).

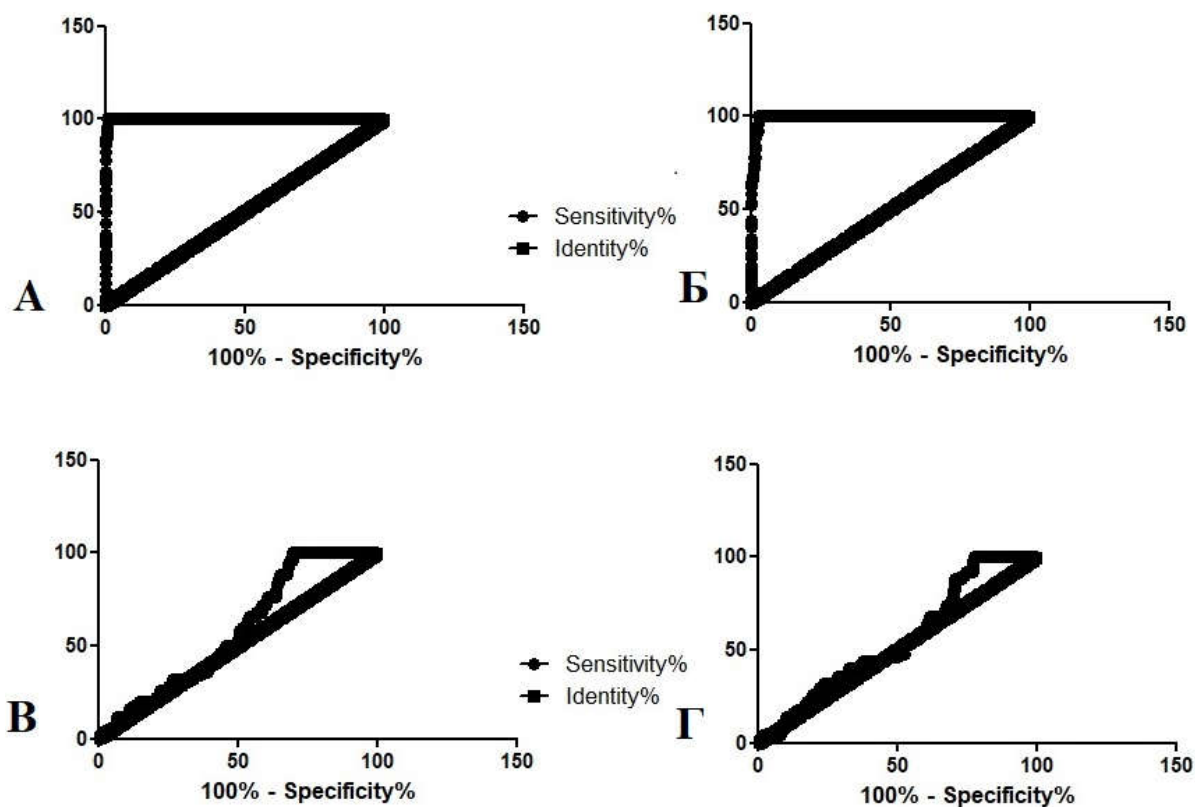


Рисунок 33. Изображение ROC-кривых, построенных при сравнении результатов анализа выборок взрослых условно здоровых лиц и ВИЧ-инфицированных больных: с вирусологической неэффективностью АРТ по параметрам TREC (А) и KREC (Б); с недавно выявленной инфекцией ВИЧ по параметрам TREC (В) и KREC (Г)

На рисунках 34 и 35 приведен корреляционный анализ уровней молекул TREC и KREC в крови ВИЧ-инфицированных лиц с уровнями CD45+CD3+CD19- и CD45+CD3-CD19+ лимфоцитов, соответственно.

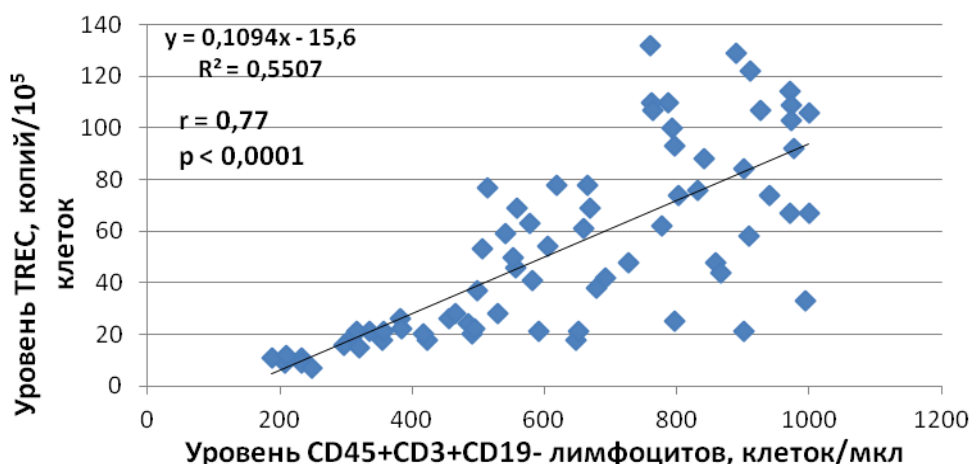


Рисунок 34. Корреляция уровней молекул TREC с уровнем CD45+CD3+CD19- лимфоцитов в крови ВИЧ-инфицированных пациентов. На рисунке представлено уравнение аппроксимирующей функции, коэффициент достоверности аппроксимации (R^2), корреляционный коэффициент Спирмена (r) и критерий уровня значимости p -value

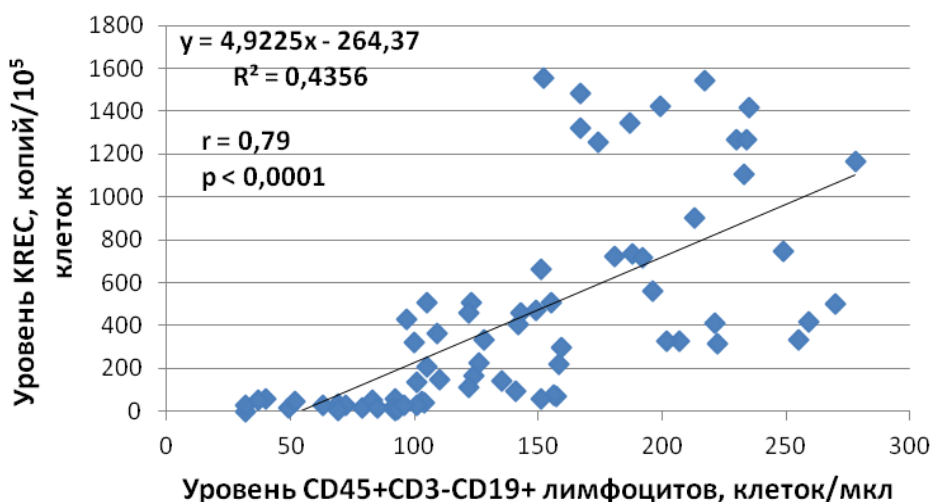


Рисунок 35. Корреляция уровней молекул KREC с уровнем CD45+CD3-CD19+ лимфоцитов в крови ВИЧ-инфицированных пациентов. На рисунке представлено уравнение аппроксимирующей функции, коэффициент достоверности аппроксимации (R^2), корреляционный коэффициент Спирмена (r) и критерий уровня значимости p -value

Корреляционные коэффициенты r , указанные на рисунках 34 и 35, превышающие значение 0,7, свидетельствуют о высокой положительной связи между сравниваемыми параметрами.

В правой области точечной диаграммы сосредоточены точки, соответствующие группе пациентов, инфицированных менее одного года

назад, не получавших терапию. Для них характерен преимущественно нормальный уровень Т- и В- лимфоцитов в крови и нормальный уровень молекул TREС и KREC (отображено на рисунках 36 и 37). Пациенты, инфицированные более одного года назад, для которых применяемые схемы АРТ были не эффективны, были разделены на две подгруппы. Для больных, длительность инфекции которых не превышала трех лет, определяли сниженные уровни Т-клеток, при этом уровни В-клеток преимущественно оставались в пределах нормы, уровни TREС и KREC также в норме. У ВИЧ-инфицированных более четырех лет фиксировали значительно сниженные уровни Т- и В-лимфоцитов, а также сниженные уровни молекул TREС и KREC (Рисунок 36 и Рисунок 37).

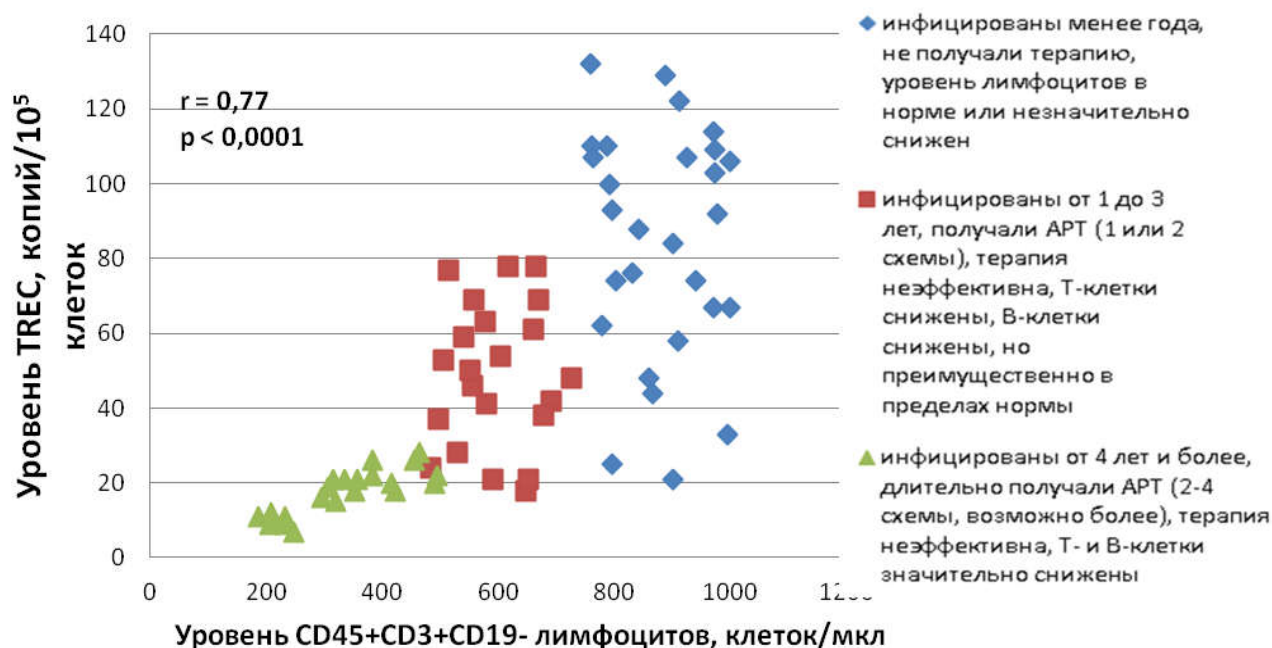


Рисунок 36. Группы больных на диаграмме корреляции уровней молекул TREС с уровнем CD45+CD3+CD19- лимфоцитов в крови ВИЧ-инфицированных пациентов. На рисунке представлены корреляционный коэффициент Спирмена (r) и критерий уровня значимости p -value

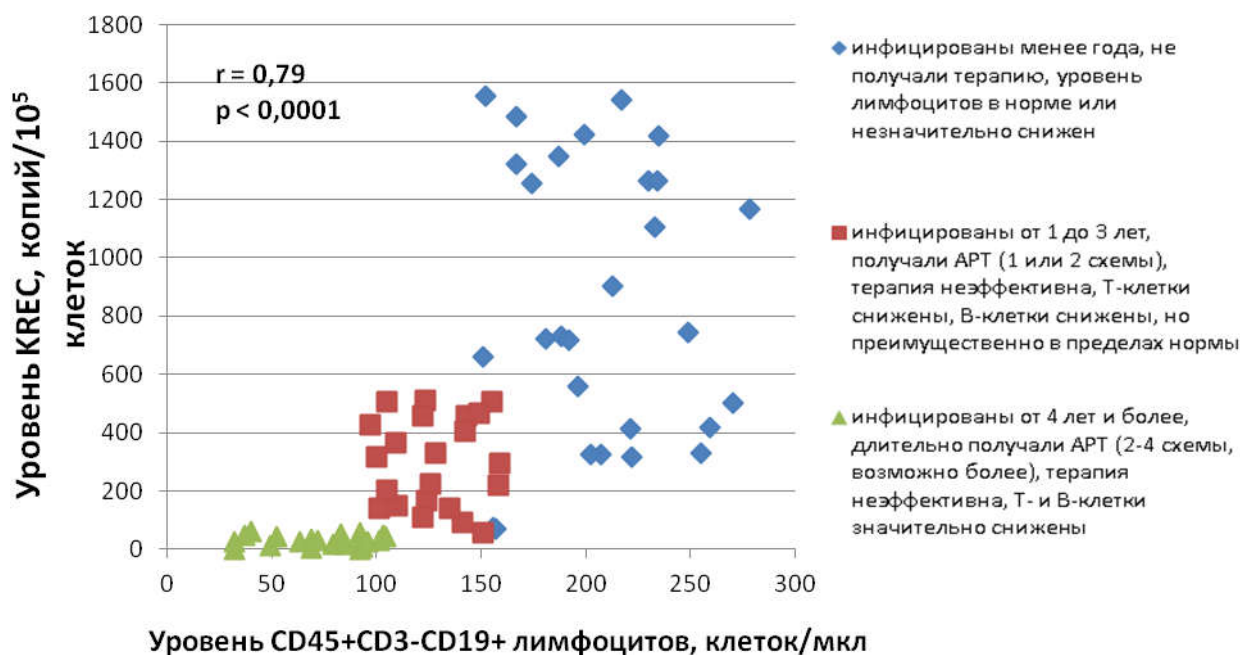


Рисунок 37. Группы больных на диаграмме корреляции уровней молекул KREC с уровнем CD45+CD3-CD19+ лимфоцитов в крови ВИЧ-инфицированных пациентов. На рисунке представлены корреляционный коэффициент Спирмена (r) и критерий уровня значимости p -value

Установлены достоверные различия между медианными значениями уровней молекул TREC и KREC, так же как и уровней лимфоцитов в крови у описанных выше подгрупп ВИЧ-инфицированных пациентов, что отображено на рисунках 38-41.

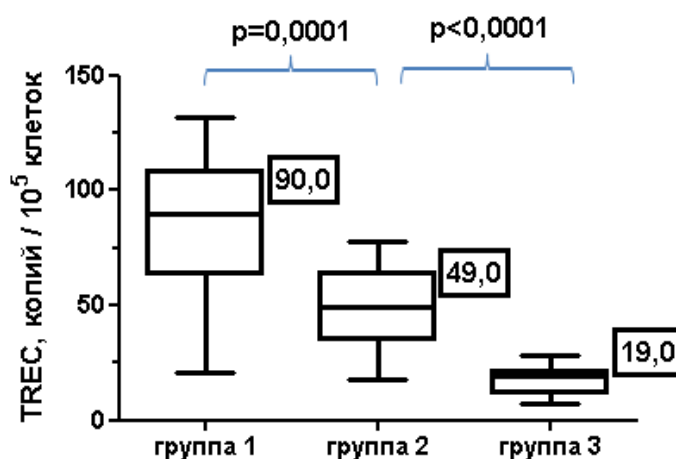


Рисунок 38. Уровни молекул TREC в крови ВИЧ-инфицированных пациентов: группа 1 - недавно инфицированные лица (менее 1 года); группа 2 – пациенты, болеющие от 1 до 3 лет, с вирусологической неэффективностью АРТ (1 или 2 схемы); группа 3 - пациенты, болеющие более 4 лет, с вирусологической неэффективностью АРТ (3 или 4 схемы).

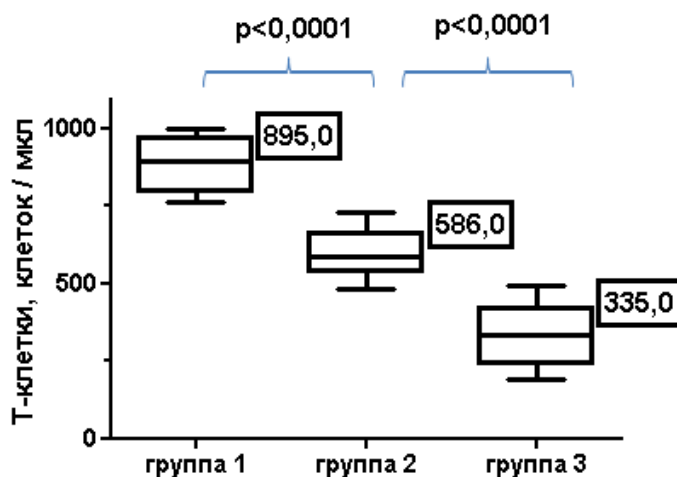


Рисунок 39. Уровни Т-лимфоцитов в крови ВИЧ-инфицированных пациентов: группа 1 - недавно инфицированные лица (менее 1 года); группа 2 – пациенты, болеющие от 1 до 3 лет, с вирусологической неэффективностью АРТ (1 или 2 схемы); группа 3 - пациенты, болеющие более 4 лет, с вирусологической неэффективностью АРТ (3 или 4 схемы).

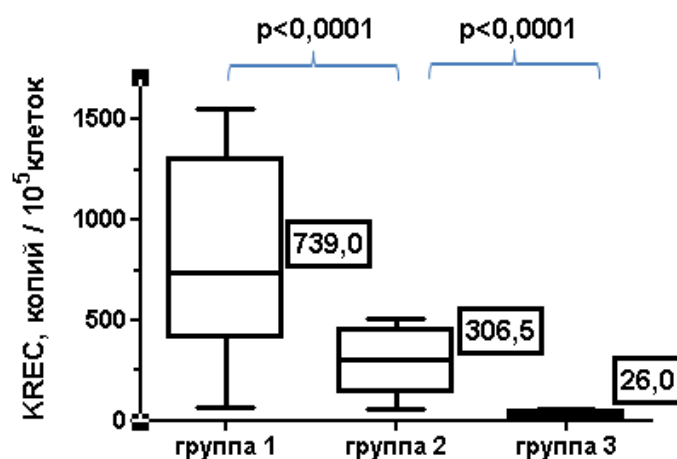


Рисунок 40. Уровни молекул KREC в крови ВИЧ-инфицированных пациентов: группа 1 - недавно инфицированные лица (менее 1 года); группа 2 – пациенты, болеющие от 1 до 3 лет, с вирусологической неэффективностью АРТ (1 или 2 схемы); группа 3 - пациенты, болеющие более 4 лет, с вирусологической неэффективностью АРТ (3 или 4 схемы).

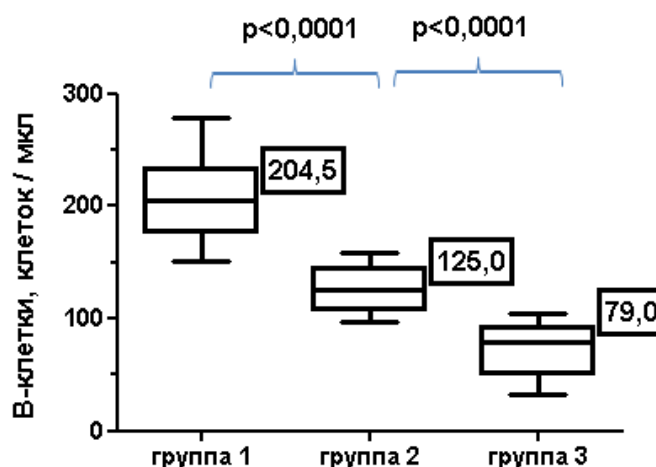


Рисунок 41. Уровни В-лимфоцитов в крови ВИЧ-инфицированных пациентов: группа 1 - недавно инфицированные лица (менее 1 года); группа 2 – пациенты, болеющие от 1 до 3 лет, с вирусологической неэффективностью АРТ (1 или 2 схемы); группа 3 - пациенты, болеющие более 4 лет, с вирусологической неэффективностью АРТ (3 или 4 схемы).

Возможность использования уровней TREC/KREC в качестве маркера эффективности используемых антиретровирусных препаратов при ВИЧ-инфекции была подтверждена на примере пяти ВИЧ-инфицированных пациентов, у которых на протяжении двух лет измеряли количество молекул TREC и KREC, а также вирусную нагрузку. Все пять случаев были представлены лицами со сроком инфицирования менее девяти месяцев, высокой вирусной нагрузкой (>5 млн копий/мл) и нормальными уровнями TREC и KREC на начальном этапе исследования. Всем пациентам было назначено лечение антиретровирусными препаратами по схеме абакавир/зидовудин/ламивудин (ADC/ZDV/3TC). Все пациенты сообщали о высокой приверженности терапии. У всех пациентов через 1 месяц приема АРТ вирусная нагрузка снизилась до 5 - 10 тысяч копий/мл, через 3 месяца приема АРТ до 300 - 500 копий/мл, при этом уровни TREC и KREC соответствовали возрастным нормам обследуемых. Через шесть месяцев у двух пациентов уровень вирусной нагрузки был менее 50 копий/мл при нормальных уровнях TREC и KREC, в то время как у двух пациентов были снижены уровни TREC, а вирусная нагрузка составила >2000 копий/мл, у одного пациента при вирусной нагрузке менее 50 копий/мл уровень TREC

оказался в два раза ниже возрастной нормы. В дальнейшем у двух пациентов количество молекул TREC и KREC оставалось выше граничного значения, а вирусная нагрузка ВИЧ оставалась неопределяемой, у трех пациентов выявляли снижение TREC и подъем вирусной нагрузки более чем до 100 тысяч копий/мл. Таким образом, снижение уровня TREC в периферической крови было определено раньше, чем подъем вирусной нагрузки. Однако статистическая значимость при таком ограниченном количестве наблюдаемых пациентов невелика и в дальнейшем требуется продолжение исследований.

5.3.2.2. Уровни TREC и KREC у пациентов с новой коронавирусной инфекцией COVID-19

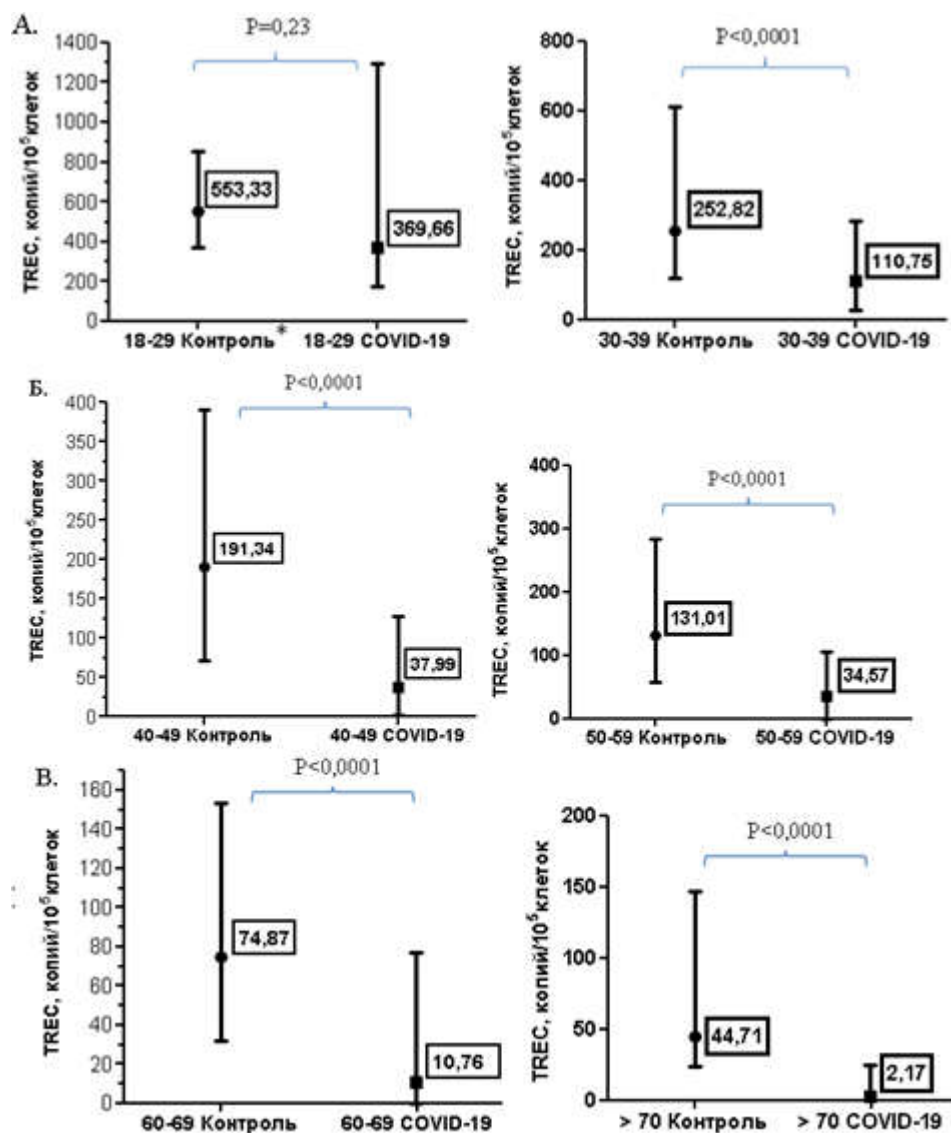
В группе инфицированных COVID-19 больных, все пациенты были распределены в шесть описанных выше возрастных групп: 18-29 лет (n=28), 30-39 лет (n=111), 40-49 лет (n=162), 50-59 лет (n=195), 60-69 лет (n=244), и лица старше 70 лет (n=288), где n – количество человек в группе (Таблица 25).

Таблица 25. Группы пациентов COVID-19, сформированные по возрасту и степени тяжести течения заболевания

| Степень тяжести | Число пациентов n (%) в возрастных группах | | | | | |
|-----------------------------|--|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | 18-29 лет | 30-39 лет | 40-49 лет | 50-59 лет | 60-69 лет | >70 лет |
| Средней тяжести | 27 (96,4) | 98 (88,3) | 123 (75,9) | 149 (76,4) | 159 (65,2) | 191 (66,3) |
| Тяжелые | 1 (3,6) | 12 (10,8) | 33 (20,4) | 34 (17,4) | 69 (28,3) | 55 (19,1) |
| Крайне тяжелые | 0 | 1 (0,9) | 6 (3,7) | 12 (6,2) | 16 (6,5) | 42 (14,6) |
| Всего | 28 | 111 | 162 | 195 | 244 | 288 |
| Общее число пациентов: 1028 | | | | | | |

Для всех возрастных групп кроме самой младшей (18-29 лет) уровни молекул TREC у больных достоверно снижены относительно контрольных групп согласно U-критерию Манна-Уитни ($p < 0,0001$ при 95% ДИ). Уровень молекул KREC у больных также достоверно снижен ($p < 0,0001$ при 95% ДИ).

На рисунках 42 и 43 представлены диаграммы сравнения медианных значений параметров TREC и KREC в образцах, полученных от больных с новой коронавирусной инфекцией, и образцах, полученных от контрольных групп. В таблице 26 указаны значения медиан уровней TREC для всех описываемых выборок.



* Интервалами на оси абсцисс обозначены возрастные диапазоны

Рисунок 42. Сравнение уровней молекул TREC у больных COVID-19 и контрольных групп: А. 18-29 лет, 30-39 лет; Б. 40-49 лет, 50-59 лет; В. 60-69 лет, >70 лет. На диаграммах указаны медианные значения с интерквартильным размахом, а также значения P-value

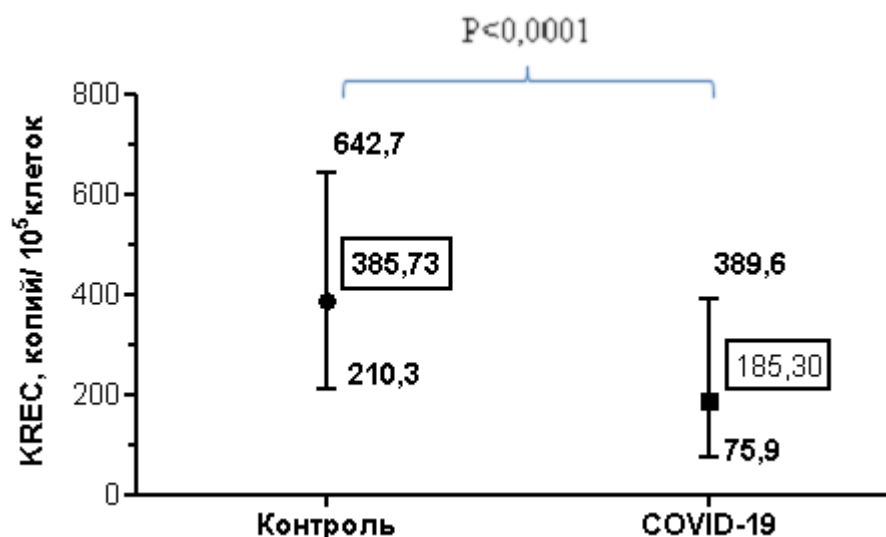


Рисунок 43. Сравнение уровней молекул KREC у больных COVID-19 и контрольной группы. На диаграмме представлены медианные значения с интерквартильным размахом. Числами обозначены значения медиан, нижнего (Q25) и верхнего квартилей (Q75), а также значение P-value

Таблица 26. Значения медиан уровней TREC в контрольных группах и группах инфицированных COVID-19 больных

| Группы сравнения | | Количество добровольцев (n) | TREC Медиана (Q25; Q75) | P-value, полученные при сравнении групп с применением критерия Манна-Уитни |
|------------------|----------|-----------------------------|-------------------------|--|
| 18-29 лет | Контроль | 120 | 553,3 (372,0; 854,5) | 0,2283 |
| | COVID-19 | 28 | 369,7 (173,0; 1293,0) | |
| 30-39 лет | Контроль | 118 | 248,9 (113,5; 595,0) | <0,0001 |
| | COVID-19 | 111 | 110,8 (27,9; 283,8) | |
| 40-49 лет | Контроль | 132 | 191,3 (72,1; 391,4) | <0,0001 |
| | COVID-19 | 162 | 38,0 (2,4; 127,5) | |
| 50-59 лет | Контроль | 135 | 131,1 (56,3; 283,2) | <0,0001 |
| | COVID-19 | 195 | 34,6 (0,3; 104,8) | |
| 60-69 лет | Контроль | 111 | 74,9 (31,5; 153,2) | <0,0001 |
| | COVID-19 | 244 | 10,8 (0,0; 76,8) | |
| >70 лет | Контроль | 101 | 44,7 (23,4; 146,3) | <0,0001 |
| | COVID-19 | 288 | 2,2 (0,0; 24,8) | |

Установлена достоверная прямая корреляционная зависимость уровней молекул TREC с количеством CD45+CD3+CD19- Т-клеток (коэффициент корреляции Спирмена $r = 0,59$, $p < 0,0001$), а также уровней молекул KREC с

количеством CD45+CD3-CD19+ В-клеток в периферической крови ($r=0,66$, $p<0,0001$). На рисунках 44 и 45 представлен корреляционный анализ уровней эксцизионных колец и лимфоцитов соответствующего фенотипа.

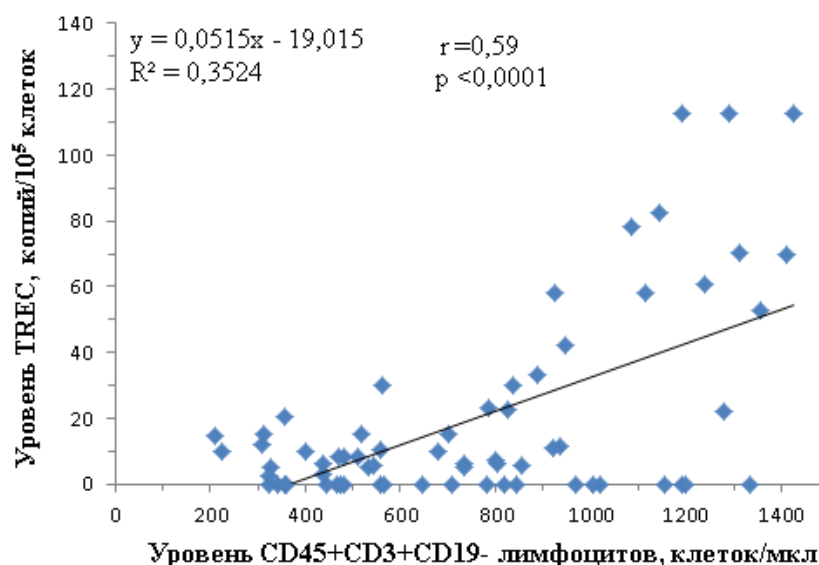


Рисунок 44. Корреляция уровней молекул TRECS с уровнем CD45+CD3+CD19- лимфоцитов в крови тяжелых и крайне тяжелых больных COVID-19. На диаграмме представлено уравнение аппроксимирующей функции, коэффициент достоверности аппроксимации (R^2), корреляционный коэффициент Спирмена (r) и критерий уровня значимости p -value

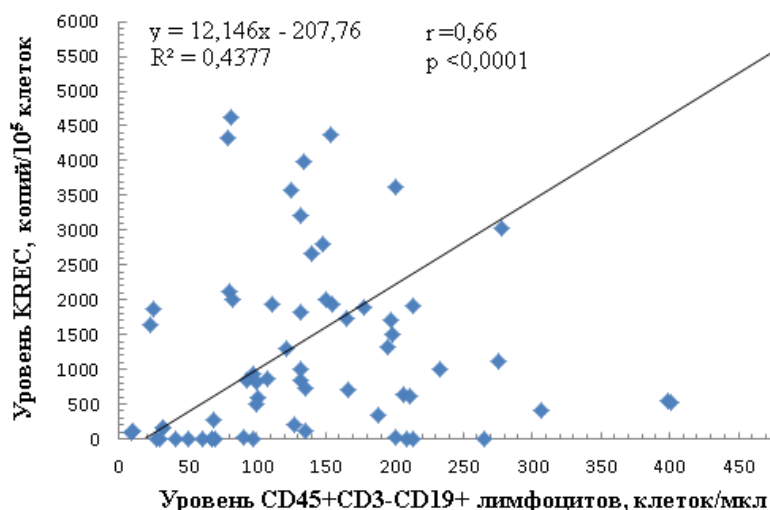


Рисунок 45. Корреляция уровней молекул KRECS с уровнем CD45+CD3-CD19+ лимфоцитов в крови тяжелых и крайне тяжелых больных COVID-19. На диаграмме представлено уравнение аппроксимирующей функции, коэффициент достоверности аппроксимации (R^2), корреляционный коэффициент Спирмена (r) и критерий уровня значимости p -value

Корреляционные коэффициенты r , указанные на рисунках 44 и 45, превышающие значение 0,5, свидетельствуют об умеренной положительной связи сравниваемых параметров.

Самой многочисленной из выделенных групп пациентов являлась группа с возрастом больных старше 70 лет. Из таблицы 20 видно, что чем выше возраст пациентов, тем больше наблюдалось тяжелых и крайне тяжелых случаев течения инфекции. Так в возрастной группе > 70 лет 14,6% всех пациентов характеризовались крайне тяжелым состоянием. В то время как в группе 18-29 лет крайне тяжелых случаев не наблюдалось совсем.

Среди пациентов старше 70 лет в тяжелом состоянии в 69,1% случаев уровни молекул TREC/KREC были снижены относительно возрастной нормы. В 16,4% случаев у таких пациентов были одновременно снижены TREC и KREC. В группе крайне тяжелых больных старше 70 лет уровни TREC/KREC находились ниже возрастной нормы у 71,4 % пациентов, одновременно сниженные уровни TREC и KREC были установлены у 21,4 % больных (Рисунок 46).

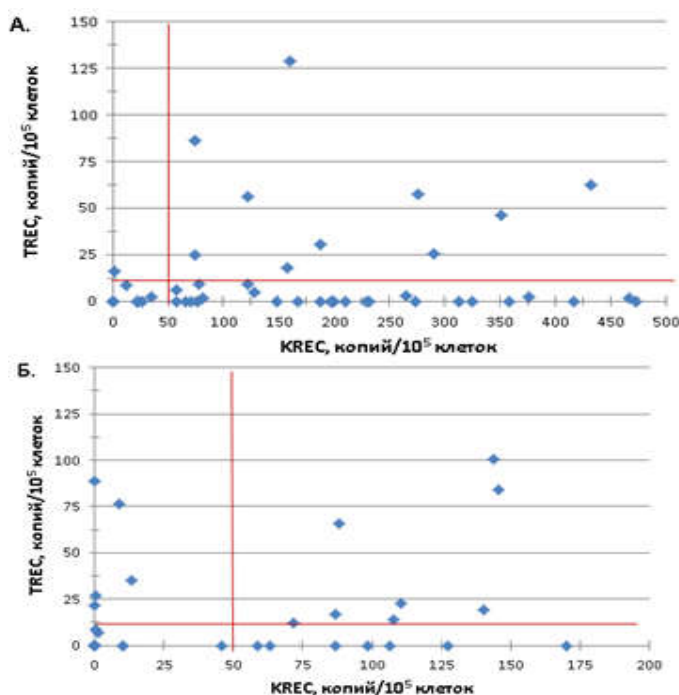


Рисунок 46. Распределение уровней молекул TREC и KREC у пациентов старше 70 лет с инфекцией COVID-19: А) в тяжелом состоянии, Б) в крайне

тяжелом состоянии. Красные линии отделяют значения, находящиеся ниже установленной нормы TREC/KREC

Значения корреляционных коэффициентов Спирмена позволяют утверждать, что пол пациента не влияет ни на степень тяжести болезни ($r = -0,066$), ни на уровни молекул TREC ($r = -0,083$) и KREC ($r = 0,026$) в периферической крови.

Присутствует достоверная слабая отрицательная корреляционная зависимость между тяжестью течения заболевания и уровнями молекул TREC в образцах крови пациентов ($r=-0,153$; $p=0,000002$). Однако модуль коэффициента корреляции принимает значение близкое к 0,1 что позволяет говорить лишь об очень слабой взаимосвязи. При этом достоверной зависимости значений аналита KREC от тяжести течения инфекции не выявлено.

На рисунках 47, 48 и 49 изображены доли пациентов с уровнями молекул TREC, KREC и одновременно TREC и KREC, соответственно, ниже нормы у групп больных с разной степенью тяжести инфекционного процесса.

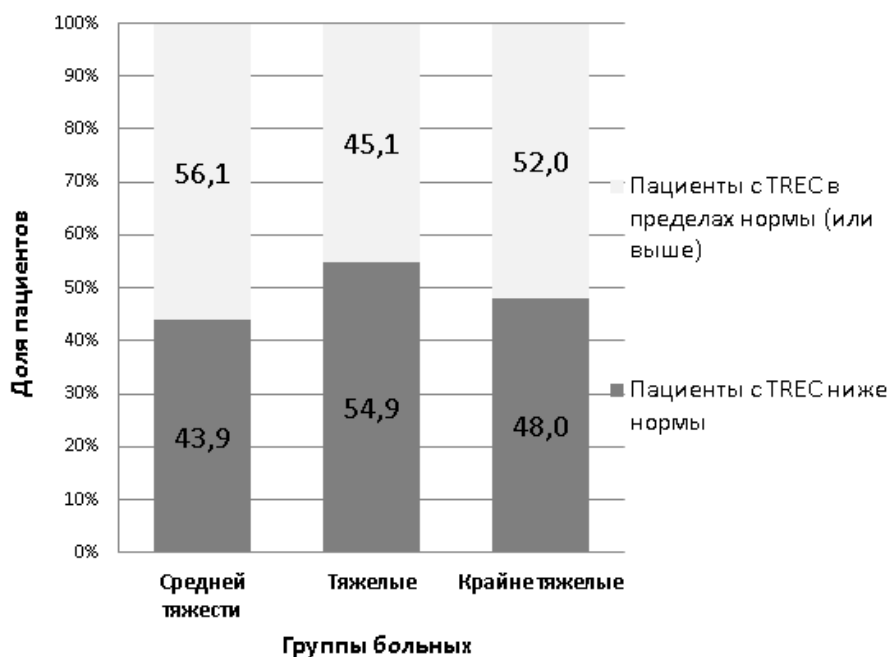


Рисунок 47. Доля пациентов со сниженным уровнем TREC у больных с разной степенью тяжести течения инфекционного процесса COVID-19

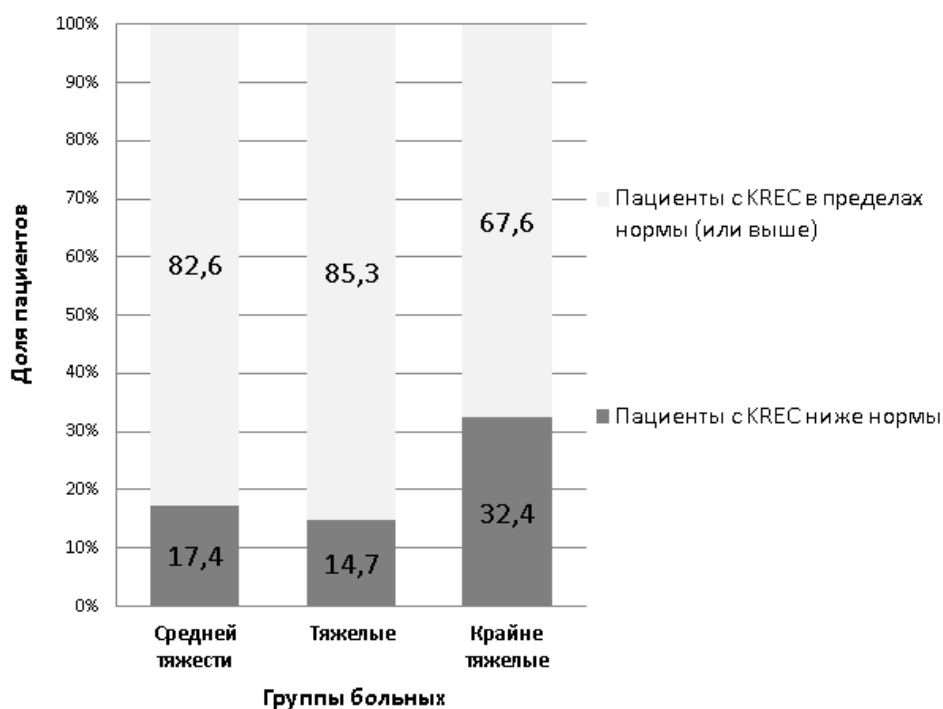


Рисунок 48. Доля пациентов со сниженным уровнем KREC у больных с разной степенью тяжести течения инфекционного процесса COVID-19

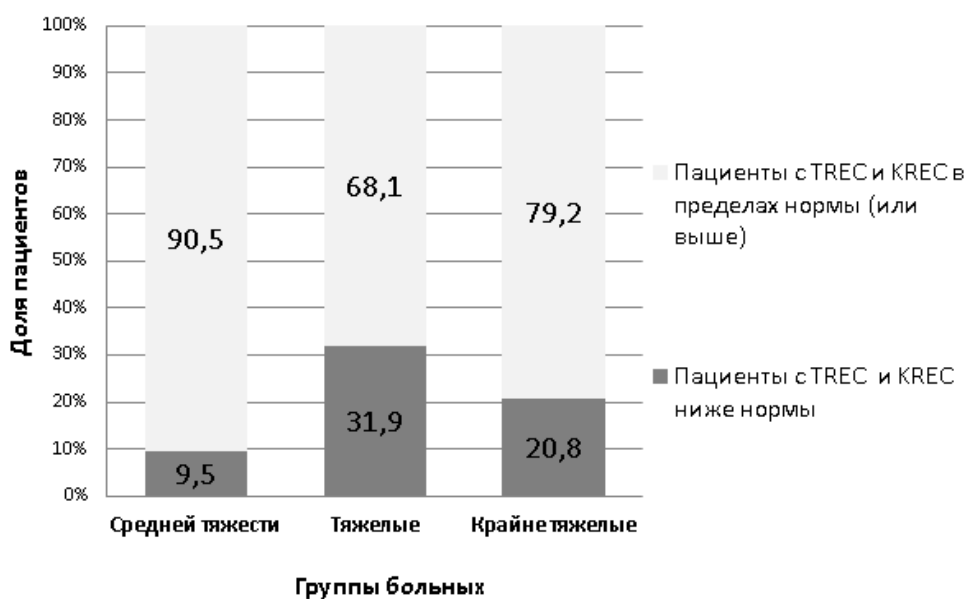


Рисунок 49. Доля пациентов с одновременным снижением уровней TREC и KREC у больных с разной степенью тяжести течения инфекционного процесса COVID-19

Сравнение медиан числовых значений параметров TREC и KREC в пределах каждой возрастной группы между выборками пациентов разных по степени тяжести течения инфекционного процесса с применением критерия Краскела-Уоллиса и теста Данна позволило установить, что уровень молекул

TREC в группе пациентов 30-39 лет у больных с тяжелым течением инфекционного процесса достоверно ниже по сравнению с больными средней тяжести ($p=0,0404$). Аналогично для возрастной группы 40-49 лет: уровень TREC у больных с тяжелым течением болезни достоверно ниже по сравнению с пациентами средней тяжести ($p=0,0356$). Однако, в возрастных группах 50-59 лет, 60-69 лет и более 70 лет достоверных различий в значениях TREC между пациентами с разной степенью тяжести инфекционного процесса не выявлено.

На рисунке 50 приведены ROC-кривые, полученные при сравнении значений TREC между выборками средне тяжелых и тяжелых больных внутри возрастных групп 30-39 лет ($AUC = 0,69$), 40-49 лет ($AUC = 0,63$), 50-59 лет ($AUC = 0,54$).

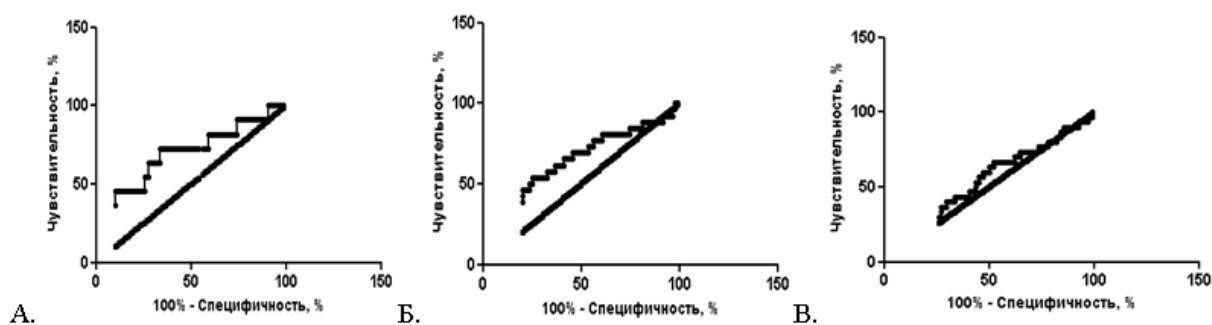


Рисунок 50. ROC-кривые, полученные при сравнении значений TREC между выборками пациентов со среднетяжелым и тяжелым состоянием А) возрастной группы 30-39 лет; Б) возрастной группы 40-49 лет; В) возрастной группы 50-59 лет (достоверных различий нет)

При сравнении выборок средне тяжелых и тяжелых пациентов 30-39 лет площадь под ROC-кривой равнялась 0,69. Пороговое значение TREC в точке cut-off составило 22,07 копий/ 10^5 клеток. Развитие критических состояний прогнозировалось при значении TREC ниже данной величины или равной ей. Чувствительность и специфичность модели составили 81,63 % и 45,45 % соответственно.

При сравнении средне тяжелых и тяжелых пациентов 40-49 лет площадь под ROC-кривой равнялась 0,63. Пороговое значение TREC в точке cut-off -

17,67 копий/ 10^5 клеток. Чувствительность и специфичность модели - 65,85% и 57,69% соответственно.

Среди умерших пациентов в 63,7% случаев уровни молекул TREC/KREC были снижены относительно соответствующих возрастных норм. В 20,9% случаев у таких пациентов были одновременно снижены и TREC, и KREC. При этом абсолютное количество лимфоцитов у таких пациентов также находилось ниже границы нормы.

Статистический анализ с применением критерия Манна-Уитни показал достоверное снижение медианных значений концентраций молекул KREC у пациентов с летальным исходом по сравнению с выжившими ($p=0,0019$), (Рисунок 51). Достоверных различий уровней молекул TREC между выборками умерших и выздоровевших не выявлено ($p=0,3289$), (Рисунок 52).

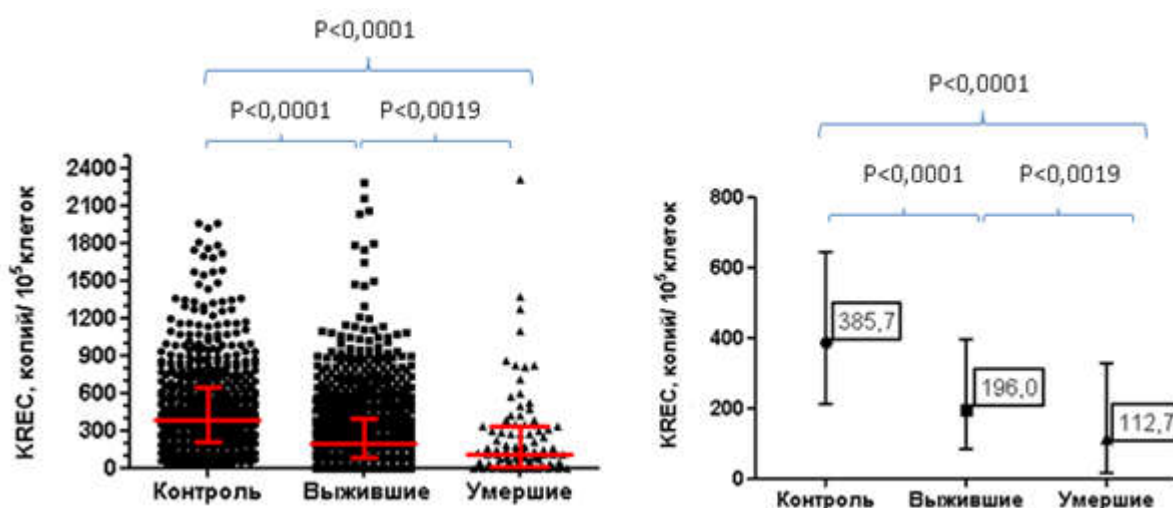


Рисунок 51. Сравнение уровней молекул KREC между группами здоровых, выживших после перенесенной новой коронавирусной инфекции COVID-19 и умерших людей. Слева представлен разброс всех полученных значений, справа - медианные значения с интерквартильным размахом. Над группами обозначены P-value, полученные при сравнении соответствующих выборок

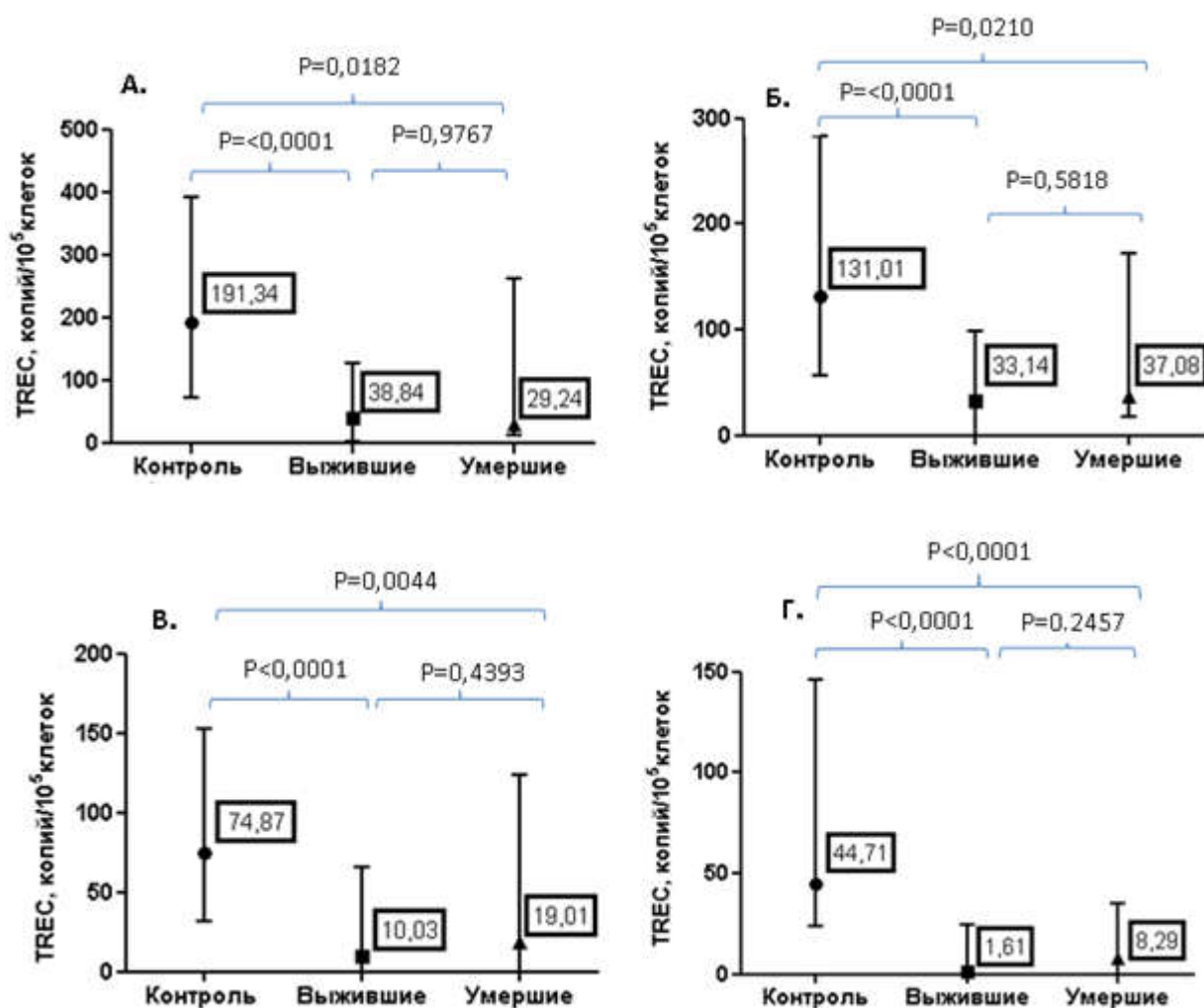


Рисунок 52. Сравнение уровней молекул TREC между группами здоровых, выживших после перенесенной новой коронавирусной инфекции COVID-19 и умерших людей: А) в возрасте 40-49 лет, Б) в возрасте 50-59 лет, В) в возрасте 60-69 лет, Г) старше 70 лет. На диаграммах указаны медианные значения с интерквартильным размахом. Над группами обозначены P-value, полученные при сравнении соответствующих выборок

В таблице 27 приведены показатели диагностической значимости определения уровня молекул KREC для прогнозирования смертности пациентов при инфекции COVID-19.

Таблица 27. Показатели диагностической информативности разработанного метода количественной оценки KREC при прогнозе смертности COVID-инфицированных пациентов.

| Определяемый аналит | Se | Sp | PPV | NPV | LR+ | LR- | Prev | coPrev | Acc |
|---------------------|------|------|------|------|------|------|-------|--------|------|
| KREC | 0,35 | 0,83 | 0,17 | 0,92 | 2,15 | 1,29 | 0,091 | 0,909 | 0,79 |

Определение уровня KREC обладает умеренной специфичностью ($Sp=0,83$) при прогнозе исхода заболевания у COVID-инфицированных лиц. Из 100 выживших пациентов с инфекцией COVID-19 у 83 результат анализа будет отрицательным (уровень KREC не снижен). Уровень чувствительности $Se=0,35$ не является информативным при прогнозе исхода заболевания.

Значение позитивной прогностической ценности превышает значение распространенность заболевания в исследуемой выборке ($PPV 0,17 > Prev 0,091$), что свидетельствует о том, что у пациентов со сниженным уровнем KREC вероятность летального исхода выше в 1,86 раз ($PPV/Prev$). Уровень KREC, определенный в пределах референтного интервала (отрицательный результат анализа), не гарантирует отсутствие риска летального исхода у пациента ($NPV 0,920 \approx coPrev 0,909$).

Согласно данным таблиц 30 и 10, отношения правдоподобия для положительных результатов $LR+$ и для отрицательных результатов $LR-$ при анализе KREC (KREC снижен), не превышающие значения 3, не являются информативными. Диагностическая точность (или эффективность) анализа KREC при оценке угрозы летального исхода $Acc = 0,79$.

Исходя из совокупности значений показателей информативности анализа, можно рекомендовать определение уровня KREC у больных COVID-19 с целью выявления критических состояний как прогностический тест.

Помимо описанных выше параметров для оценки диагностической значимости уровня молекул KREC при прогнозировании исхода заболевания, применяли метод анализа ROC-кривых (Рисунок 53)

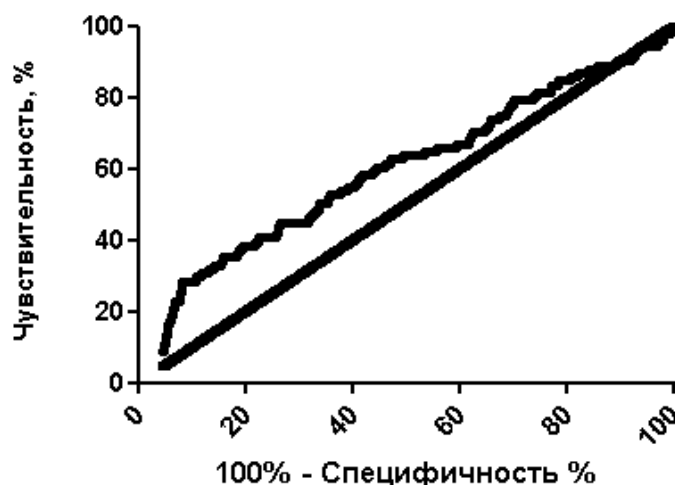


Рисунок 53. ROC-кривая, характеризующая зависимость вероятности наступления летального исхода пациента с COVID-19 от уровня КРЕС (при полной выборке пациентов)

Величина параметра площадь под кривой AUC (area under the curve) составила 0,63 с 95% ДИ: 0,54 – 0,66.

Сила прогностической модели наступления смерти пациентов в зависимости от уровня КРЕС в крови значительно увеличилась при проведении сравнительного ROC-анализа между летальными и выжившими пациентами COVID-19 до 60 лет. На рисунке 54 приведена полученная ROC-кривая.

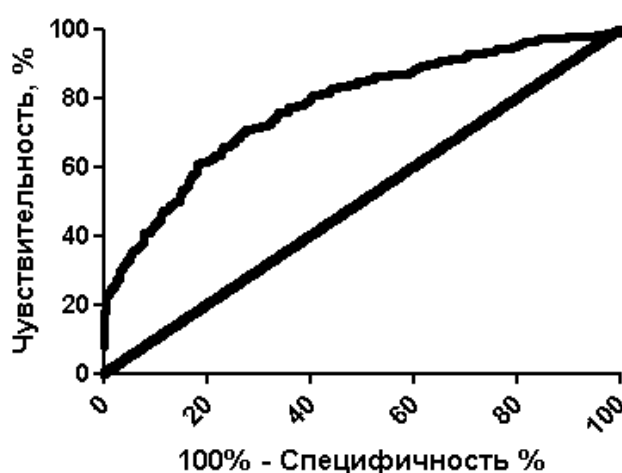


Рисунок 54. ROC-кривая, характеризующая зависимость вероятности наступления летального исхода пациента с COVID-19 до 60 лет от уровня КРЕС

Параметр AUC при этом достиг значения 0,77 (95% ДИ: 0,74-0,80), что говорит о хорошем качестве прогностической модели наступления смерти пациентов в зависимости от уровня КРЕС в крови. Построенная модель является статистически значимой ($p < 0,0001$).

При выборе порогового значения КРЕС (точка cut-off) 48,55 копий/ 10^5 клеток (то есть в тех случаях, когда анализ КРЕС снижен относительно установленного референтного интервала) чувствительность прогностической модели наступления смерти составила 25,7 %, специфичность – 97,6 %.

Из полученных данных следует, что пациенты с уровнем КРЕС выше значения 48,55 копий/ 10^5 клеток находятся вне зоны риска летального исхода с вероятностью 97,6 %. Несмотря на небольшую чувствительность модели, определение уровня КРЕС у тяжелых больных COVID-19 позволит выявлять пациентов с повышенным риском летального исхода для своевременного обеспечения превентивных мер.

ГЛАВА 6. ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка концентраций ДНК-молекул TREC и KREC требует высокой точности метода, особенно, когда речь идет о взрослых лицах, для которых характерны относительно низкие уровни указанных аналитов, по сравнению с новорожденными [61]. Наибольшей точностью и чувствительностью, по сравнению с традиционной Real-time ПЦР обладает цифровая ПЦР, ее применение позволяет снизить частоту получения ложных результатов [80, 93]. Однако высокая стоимость анализа с применением цифровой ПЦР, а также необходимость использования дополнительного высокотехнологичного оборудования, делает не оправданным использование этого метода в рутинной диагностике. Тем не менее, использование в настоящей работе цифровой ПЦР на стадии первичного определения концентрации калибраторов, позволило увеличить точность метода без существенного увеличения его стоимости. Кроме того, при разработке были учтены все параметры ПЦР-анализа, которые могут вносить значимую погрешность в конечный результат, такие как выбор олигонуклеотидных праймеров и зондов, выбор способа нормировки данных и другие. Оптимальное сочетание компонентов реакции и подобранные условия амплификации обеспечивают эффективность реакции близкую к 100 %, свидетельствующую о том, что концентрация целевого ДНК-фрагмента в каждом цикле ПЦР увеличивается в 2 раза, что соответствует теоретическим нормам ПЦР-анализа [15]. Параметр эффективности важно учитывать при количественном анализе, как для минимизации погрешности расчетных результатов, так и для их высокой воспроизводимости.

Несомненно, релевантность получаемых результатов определяется и выбором нормировочных генов. Так, выбор гена домашнего хозяйства *RPP30* был обоснован анализом литературных данных, свидетельствующих о применимости данного гена в качестве контрольного для определения

эффективности экстракции геномной ДНК человека, в качестве эндогенного контроля для диагностики и количественной оценки бактериальной и вирусной нагрузки, для нормализации количества копий инфекционных агентов с количеством клеток, основанной на наличии двух копий RPP30 в каждой клетке, а также в качестве эталонного гена для определения вариаций числа копий некоторых генов в геноме человека [42]. Выбор гена HPRT, локализованного на X-хромосоме, обусловлен тем, что половая принадлежность потенциально может влиять на иммунитет, развитие связанных с иммунным статусом заболеваний. Кроме того, хотя одни исследователи сообщают об отсутствии корреляции уровней TREC и KREC с полом, другие указывают на более высокий уровень TREC у девочек-подростков, более замедленное снижение уровня TREC у взрослых женщин по сравнению с мужчинами, более высокий уровень TREC у новорожденных девочек, чем у новорожденных мальчиков и, напротив, более высокий уровень KREC у девочек в возрасте полового созревания (9-12 лет), чем у мальчиков [93]. Можно предположить, что половые гормоны играют роль в регуляции иммунологических реакций. Выбор одного из нормировочных генов с локализацией на X-хромосоме и, соответственно, отличающиеся формулы расчетов уровней TREC и KREC для женского и мужского пола позволяют более точно оценить влияние гендера на уровни TREC и KREC. Однако наши результаты не показали значительных различий в уровнях целевых анализов между женщинами и мужчинами, вне зависимости от возраста. Такие отличия в результатах, получаемых разными исследовательскими группами, могут быть связаны с особенностями и объемами анализируемых выборок.

Созревание и дифференцировка Т- и В-клеток являются органоспецифичными процессами и демонстрируют индивидуальную кинетику лимфоидных органов. В работах зарубежных авторов продемонстрирована корреляция уровней TREC/KREC с количеством периферических наивных Т- и В-клеток, соответственно [73]. Следовательно,

одновременная количественная оценка TREC/KREC является практичным методом мониторинга продукции тимуса и костного мозга.

Высокие уровни TREC у новорожденных сильно снижаются с возрастом за счет инволюции тимуса. Тем не менее, молекулы TREC могут быть зафиксированы у людей старшего возраста, в том числе у людей старше 80 лет. Присутствие у таких лиц в периферической крови лимфоцитов, содержащих TREC, может отражать продолжительность жизни этих клеток, но также может указывать на то, что вилочковая железа частично сохраняет свою функцию в пожилом возрасте [40, 41]. В нашей работе показано постепенное снижение уровней TREC у взрослых лиц, начиная от 44,91 копий/ 10^5 клеток у лиц 18-29 лет до 11,43 копий/ 10^5 клеток у людей старше 70 лет, что согласуется с литературными данными и отражает динамику снижения активности тимуса. При этом интересно отметить, что в целом разница между возрастными группами относительно невелика, однако между группами 18-29 лет и 30-39 лет уровни TREC снижаются практически в два раза. Стабильность количественных измерений KREC в периферической крови с возрастом отражает связь уровней KREC с продолжающимся выходом В-клеток из костного мозга на протяжении жизни [73]. В нашем исследовании продемонстрировано постоянство уровней KREC у лиц старше 18 лет, однако определено значительное снижение уровней KREC у взрослых (49,9 копий/ 10^5 клеток) по сравнению с новорожденными (400,4 копий/ 10^5 клеток).

Определенные в ходе работы значения показателей диагностической информативности анализа, позволяют сделать вывод о том, что разработанный метод количественного определения TREC и KREC имеет высокую дискриминационную способность и диагностическую значимость, подтвержденную при первичных иммунодефицитах.

Разработанный метод позволяет с высокой точностью оценивать количество целевых аналитов как у детей, так и у взрослых. Для разработанного нами метода показаны 2% ложноположительных результатов при оценке уровней целевых аналитов среди условно здоровых лиц как старше

18 лет, так и у новорожденных. Сходный уровень ложноположительных результатов был показан для тест-системы «ИММУНО-БИТ» («АБВ-Тест», Москва) и несколько больший (3%) для «EnLite™ TREC-KREC kit» («PerkinElmer», Финляндия). Отметим, что всем лицам, старше 18 лет со сниженным уровнем TREC и/или KREC была рекомендована консультация иммунолога. Среди этих лиц не были выявлены люди с ПИД или иными, связанными со снижением иммунитета, заболеваниями. Сниженные уровни анализов могут быть связаны с заболеваниями, не выявленными в рамках консультации. Кроме того, низкое количество TREC и/или KREC может быть обусловлено индивидуальными особенностями обследуемых. Еще одной причиной ложноположительных результатов является неправильная пробоподготовка клинических образцов для анализа: например, ошибки при взятии сухой капли крови.

Несмотря на то, что правила сбора образцов крови на карты Гатри, а также требования к условиям хранения и транспортировки полученных DBS описаны в ряде международных рекомендаций, статьях, и в Российской Федерации регламентируются приказом министерства здравоохранения № 185 «О массовом обследовании новорождённых детей на наследственные заболевания» [14], младший медицинский персонал зачастую допускает ошибки пробоподготовки сухой капли крови, которые могут приводить к искажению результата анализа или невозможности осуществить исследование. К наиболее часто встречаемым ошибкам можно отнести не полное и не равномерное пропитывание фильтра образцом крови, точечное и послойное нанесение капель дозатором, не полное заполнение кровью обозначенной окружности, следы соприкосновения не просохших бланков друг с другом. В ходе настоящей работы было установлено, что корректность подготовки сухих пятен крови существенно влияет на измеряемые концентрации молекул TREC и KREC, и имеет принципиальное значение, прежде всего, для исключения ложноположительных результатов.

Протестированные в ходе работы наборы для экстракции ДНК («МагноПрайм ЮНИ», ФБУН ЦНИИЭ, Россия, «ЭКСТРА-преп PS», ФБУН НИИ им. Пастера, Россия, «Экстра-ДНК-Био», Алкор-Био, Россия) позволяют получить препараты ДНК из сухих капель крови, которые отвечают требованиям, необходимым для проведения количественных ПЦР-тестов. Но поскольку даже при соблюдении всех рекомендаций по пробоподготовке карт Гатри, количество клеток, попадающих в анализ, разнится от пробы к пробе, для оценки влияния способа выделения ДНК на результат анализа нельзя опираться только на показатели чистоты ДНК, ее концентрации или результат амплификации контрольных генов. Однако модифицированный нами ПЦР-метод позволяет рассчитывать количество ДНК-молекул TREC и KREC в суммарной экстрагированной ДНК-пробе, приходящихся на 10^5 клеток крови. Такой подход учитывает количество клеток, попадающих в пробирку при выделении ДНК. Поэтому сравнение систем выделения ДНК с использованием модифицированного нами ПЦР-метода диагностики TREC и KREC позволяет заключить, что способ экстракции не влиял в данном исследовании на определяемый уровень молекул TREC/KREC, а протестированные наборы для выделения ДНК могут быть использованы для количественного анализа указанных аналитов.

Наиболее распространенным врожденным иммунодефицитным состоянием, встречающимся среди взрослого населения, является общий переменный иммунодефицит, который, в том числе, может оказывать влияние на продукцию клеток крови центральными лимфоидными органами. Литературные данные описывают значительное снижение уровней молекул KREC, CD19+ лимфоцитов, CD4+ лимфоцитов, общую лимфопению у пациентов с диагнозом ОВИН [106]. В нашей работе, среди обследованных лиц с диагнозом ОВИН мы наблюдали снижение уровней либо молекул TREC, либо молекул KREC, а также одновременное снижение указанных аналитов, нередко принимающих нулевые значения. При интерпретации результатов анализа следует помнить о чрезвычайной гетерогенности этиологии ОВИН.

Трудности, возникающие при оценке результатов ПЦР-анализа уровней TREC/KREC, могут быть связаны с периферическими событиями, такими как пролиферация среди наивных клеток, приводящая к уменьшению числа молекул TREC и KREC относительно общего количества клеток крови за счет того, что эксцизионные кольца не дублируются во время митоза и, следовательно, разбавляются при каждом клеточном делении. Однако периферическая экспансия наивных клеток происходит медленно, и не редкими причинами снижения наивных лимфоцитов, несущих эксцизионные кольца, могут служить внешние факторы, такие, например, как инфекционные процессы [41, 66].

Полученные нами результаты, свидетельствующие о снижении уровней TREC и KREC у длительное время инфицированных ВИЧ лиц с вирусологической неэффективностью АРТ, согласуются с данными иностранных коллег, согласно которым ВИЧ-инфекция способна ингибировать функции тимуса и приводить к гибели тимоцитов [20, 29, 34, 71, 86, 87, 104]. Кроме того, количество TREC у ВИЧ-инфицированных пациентов коррелирует с различными клинико-патологическими параметрами (возраст больных, вирусная нагрузка РНК ВИЧ в плазме, количество CD4+ Т-лимфоцитов, процентное содержание CD4+ Т-лимфоцитов), а продукция KREC при АРТ остается неизменной на протяжении 10-12 месяцев, однако снижается после продолжительной терапии [55]. Известно, что уровень TREC у ВИЧ-инфицированных лиц повышается после начала АРТ и, хотя не поднимается до характерных для здоровых людей уровней, достигает плато через 12 месяцев и остается стабильным в течение нескольких лет [55]. В нашей работе мы не наблюдали достаточно высоких уровней TREC у длительно инфицированных ВИЧ больных, находящихся на терапии. По всей видимости, это может быть связано с тем, что исследуемая нами группа была представлена больными с вирусологической неэффективностью АРТ и, соответственно, высокой вирусной нагрузкой, а также преимущественно низким количеством CD4+ клеток. Полученные результаты согласуются с

ранее показанными данными, согласно которым количество TREC у пациентов, нуждающихся в АРТ, значительно ниже не только по сравнению с контрольной группой, но и по сравнению с недавно инфицированными лицами с относительно низкой вирусной нагрузкой и сохранным числом клеток CD4+ [41]. Таким образом, количественное определение уровней TREC и KREC в периферической крови можно рассматривать как метод мониторинга состояния иммунитета ВИЧ-инфицированных лиц.

Как известно, новая коронавирусная инфекция COVID-19 способна нарушать лимфопоэз, поражать лимфоциты и усиливать их апоптоз, вызывая лимфопению [9, 24, 54, 58, 60, 72]. Поскольку значимую роль в контроле инфекционного процесса играет активация субпопуляций Т- и В-лимфоцитов, более легкое течение заболевания ассоциировано с адекватным функционированием CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов, а также В-клеточным звеном иммунного ответа. Выраженность лимфопении является одним из факторов, влияющих на прогноз исхода заболевания. Полученные нами результаты, демонстрирующие снижение уровней TREC и KREC у больных с новой коронавирусной инфекцией COVID-19 соотносятся с литературными данными о снижении абсолютного числа лимфоцитов в подавляющем большинстве случаев в крови больных с тяжелыми формами проявления [56, 79]. Нарушения лимфопоэза могут быть связаны с прямым поражением вирусом SARS-CoV-2 клеток-предшественников лимфоцитов в костном мозге или тимусе до инициации процессов антигеннезависимой дифференцировки и формирования молекул TREC/KREC, что приводит к детекции их сниженных уровней. Кроме того, описаны АПФ-независимые пути негативного воздействия вируса SARS-Cov-2 на лимфоцитарные функции. Например, повышенная экспрессия хемокинов CXCL10 (IP-10) и CCL2 (MCP-1), зафиксированная в мононуклеарах периферической крови больных, способна подавлять развитие гемопоэтических клеток-предшественников [32, 56, 103]. Описано подавление лимфопоэза посредством прямого воздействия молекул IL-6 на гемопоэтические стволовые клетки/клетки-предшественники,

установлена прямая зависимость между количеством IL-6 и тяжестью заболевания [49, 56].

Выявленная нами отрицательная корреляционная зависимость между тяжестью клинических проявлений инфекции COVID-19 и уровнем молекул TREC в крови пациентов в возрастном диапазоне 30-49 лет говорит о возможности применения данного параметра как диагностического и прогностического лабораторного показателя состояния пациента. Однако применение такого лабораторного теста может быть ограничено возрастными особенностями. Как известно, с увеличением возраста человека функция тимуса истощается, обновление Т-лимфоцитов замедляется, следовательно, количество циркулирующих молекул TREC в крови становится значительно меньше. По-видимому, естественное угасание работы тимуса усугубляется действием инфекционных процессов. В таких случаях не всегда есть возможность установить разницу в содержании молекул TREC у здоровых людей и инфицированных больных.

Достоверное снижение молекул KREC в крови умерших пациентов по сравнению с выжившими говорит о более выраженных нарушениях в процессах дифференцировки В-лимфоцитов в костном мозге при тяжелом течении инфекции COVID-19, что может быть одним из факторов, влияющих на исход заболевания. Согласно полученным нами результатам, прогностическая модель летальности, построенная на основе определения уровня молекул KREC, с высокой специфичностью отражает риск наступления летального исхода у больных COVID-19 до 60 лет.

Детекция ошибок в процессах лимфопоэза на фоне плохой клинической картины и искажения других предиктивных лабораторных маркеров поспособствует выявлению пациентов с повышенным риском летального исхода и своевременному назначению таким пациентам специализированного лечения.

Исходя из совокупности значений показателей информативности анализа, можно рекомендовать определение уровня KREC у больных COVID-19 с целью выявления критических состояний как прогностический тест.

Таким образом, количественную оценку уровня молекул TREC и KREC можно отнести к методам превентивной персонализированной диагностики, направленной на повышение выживаемости больных. Количественный ПЦР-анализ молекул TREC и KREC в крови больных с новой коронавирусной инфекцией COVID-19 позволяет дать оценку функциональной активности Т- и В-клеточного звена иммунитета, и, как следствие, своевременно выявлять пациентов нуждающихся в особом внимании, и применять превентивные меры, способствующие снижению числа летальных исходов. Несложный алгоритм ПЦР-анализа делает актуальным применение описанного способа оценки состояния иммунитета больных в условиях широкого распространения вируса SARS-CoV-2, его системного негативного влияния на организм и тяжестью возможных осложнений у пациентов.

Можно предположить, что выявленное нами снижение уровней молекул TREC и KREC при ВИЧ-инфекции и новой коронавирусной инфекции COVID-19 отражает общую реакцию иммунной системы, и может быть также определено при других инфекционных заболеваниях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанный метод количественной оценки ДНК-молекул TREC/KREC в периферической крови обладает высокими показателями диагностической значимости при выявлении первичных и вторичных иммунодефицитных состояний. Метод позволяет диагностировать снижение Т- и/или В-клеточного иммунитета у детей и взрослых, и может быть применен для детекции молекул TREC и KREC как в образцах цельной периферической крови, так и в сухой капле крови с использованием карт Гатри. Результаты испытаний свидетельствуют о возможности использования количественного ПЦР-анализа TREC/KREC в целях диагностики пациентов со

вторичными иммунодефицитами инфекционного генеза, что показано на примере ВИЧ-инфекции и новой коронавирусной инфекцией COVID-19.

ВЫВОДЫ

1. Разработана тест-система для количественной оценки молекул TREC и KREC в периферической крови у взрослых и детей на основе технологии ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени;

2. Предел обнаружения разработанного метода составил 10^3 копий ДНК TREC/KREC на 1 мл анализируемого образца крови; аналитический диапазон измерений метода составил 10^3 - 10^8 копий ДНК TREC/KREC на 1 мл образца; аналитическая чувствительность метода - 10^3 копий/мл; линейность измерений метода лежит в диапазоне от $1,29 \cdot 10^3$ до $8,49 \cdot 10^8$ копий/мл; коэффициенты вариации при испытаниях воспроизводимости результатов не превышают 8%;

3. Референтные интервалы уровня TREC у разных возрастных групп составили (копий/ 10^5 клеток): 44,91 – 2135,00 у лиц 18-29 лет; 23,60 – 1597,00 у лиц 30-39 лет; 18,27 – 1098,00 у лиц 40-49 лет; 13,98 – 1543,00 у лиц 50-59 лет; 12,54 – 1715,00 у лиц 60-69 лет, 11,43-683,10 у лиц старше 70 лет. Нижняя граница нормы уровня молекул TREC в крови новорожденных составила 892,6 копий/ 10^5 клеток. Уровень KREC у взрослых лиц разных возрастных групп постоянен и составил 49,90 – 1478,00 копий/ 10^5 клеток. Нижняя граница нормы уровня молекул KREC в крови новорожденных составила 400,4 копий/ 10^5 клеток;

4. Установлена достоверная прямая корреляция уровней TREC с количеством CD45+CD3+CD19- Т-клеток ($r = 0,77$ для ВИЧ-инфицированных лиц, $r = 0,59$ для COVID-19 инфицированных лиц, $p < 0,0001$), уровней KREC с количеством CD45+CD3-CD19+ В-клеток ($r = 0,79$ для ВИЧ-инфицированных лиц, $r = 0,66$ для COVID-19 инфицированных лиц, $p < 0,0001$) в периферической крови. Показана диагностическая значимость ПЦР-метода количественного

определения молекул TREC и KREC при первичных иммунодефицитах (Se=0,80, Sp=0,99, Acc=0,99 для TREC; Se=0,95, Sp=0,99, Acc=0,99 для KREC);

5. Показаны достоверно сниженные уровни молекул TREC и KREC у ВИЧ-инфицированных лиц с высокой вирусной нагрузкой и вирусологической неэффективностью применяемой антиретровирусной терапии (AUC=0,99, Se=0,99, Sp=0,99 для TREC и для KREC);

6. Установлены достоверно сниженные уровни TREC и KREC у пациентов с тяжелым течением новой коронавирусной инфекции COVID-19 ($p < 0,0001$). Установлена достоверная отрицательная корреляция между тяжестью течения заболевания и уровнем молекул TREC ($r = -0,153$; $p < 0,0001$). Показана информативность определения уровня KREC для прогноза исхода заболевания в острый период у больных COVID-19 до 60 лет (AUC=0,77, Sp=0,98 при пороговом значении уровня KREC в точке cut-off - 48,55 копий/ 10^5 клеток).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Рекомендуется использование разработанной тест-системы для определения уровней молекул TREC и KREC в периферической крови врачам-иммунологам и врачам-инфекционистам для выявления нарушений в функционировании Т- и В-клеточного звеньев иммунитета с целью уточнения диагноза и планирования терапии у пациентов с подозрением на первичный иммунодефицит; с целью мониторинга эффективности применяемой антиретровирусной терапии у ВИЧ-инфицированных лиц; для прогноза тяжести течения и исхода заболевания в острый период у больных COVID-19.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Перспективным направлением продолжения работы является установление референтных интервалов количественного содержания молекул TREC и KREC у детей от 1 года до 17 лет, не охваченных в настоящем исследовании, а также установление норм содержания молекул TREC и KREC в периферической крови у людей в зависимости от их этнической или расовой принадлежности. Кроме того, в качестве перспектив разработки темы можно рассматривать изучение влияния других различных острых и хронических инфекций на процессы лимфоцитарного неогенеза, и оценку возможности использования уровней TREC и KREC в крови пациентов при таких заболеваниях в качестве диагностических и прогностических маркеров развития тяжелых состояний и летальных исходов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- АПК - антигенпрезентирующие клетки
- АРТ – антиретровирусная терапия
- ВИЧ – вирус иммунодефицита человека
- ГОСТ - государственный стандарт
- ГСК - гемопоэтические стволовые клетки
- ДИ – доверительный интервал
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ДЧ - диагностическая чувствительность
- МКА – моноклональные антитела
- НК – нуклеиновая кислота
- ОВИН – общая вариабельная иммунная недостаточность
- ПДГ – предполагаемый диагностический тест
- ПО – программное обеспечение
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- ПИД – первичный иммунодефицит
- ПИДС – первичное иммунодефицитное состояние
- РЗ - референтное значение
- РИ - референтные интервалы
- РНК - рибонуклеиновая кислота
- СПИД – синдром приобретенного иммунодефицита
- ТИ – точность измерений
- ТКИД - тяжелый комбинированный иммунодефицит
- ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты
- ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота
- AUC - area under the curve
- coPrev. - Contr Prevalence
- DBS - dried blood spots
- FN – false negative

FP – false positive

IFCC - International Federation of Clinical Chemistry

KREC - Kappa-deleting recombination excision circles

LR - likelihood ratio

NGS - next generation sequencing

NPV – negative predictive values

PPV – positive predictive values

Prev. - Prevalence

RAG - recombinase activation gene

REC - recombination excision circle

RSS - recombination signal sequences

RTE - recent thymic emigrants

Se – sensitivity

Sp – specificity

TCR – T-cell receptor

TREC – T-cell receptor excision circles

TN – true negative

TP – true positive

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арсентьева, Н.А. Цитокины в плазме крови больных COVID-19 в острой фазе заболевания и фазе полного выздоровления / Н.А. Арсентьева, Н.Е. Любимова, О.К. Бацунов и др. // Медицинская иммунология. – 2021. – Т.23, № 2. – С. 311-326.
2. Бояркина, А.В. Методология оценки информационной значимости диагностических тестов в анестезиологии и реаниматологии / А. В. Бояркина, А. Л. Потапов // Вестник анестезиологии и реаниматологии. – 2015. – Т. 12, №. 5. – С. 71-75.
3. Гордукова, М.А. 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.П. Оскорбин, О.В. Мишукова и др. // Медицинская иммунология. – 2015. – Т. 17, №. 5. – Р. 467-478.
4. ГОСТ Р 51352-2013. Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Методы испытаний. – 2015.
5. ГОСТ Р 53022.3-2008. Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов. – 2008.
6. Евгина, С.А. Современные теория и практика референтных интервалов / С.А. Евгина, Л.И. Савельев // Лабораторная служба. – 2019. – Т. 8, № 2. – С. 36-44.
7. Зайцева, Е.В. Современное состояние вопроса диагностики и лечения первичных иммунодефицитов / Е.В. Зайцева, В.В. Запарий // Современные проблемы науки и образования. – 2020. – №. 5. – С. 139-139.
8. Корнеенков, А.А. Вычисление и интерпретация показателей информативности диагностических медицинских технологий / А.А. Корнеенков, С.В. Рязанцев, Е.Э. Вяземская // Медицинский совет. – 2019. – №. 20. – С. 41-47.

9. Кудрявцев, И.В. Т-хелперы и их клетки-мишени при COVID-19 / И.В. Кудрявцев, А.С. Головкин, А.А. Тотолян // Инфекция и иммунитет. – 2022. – Т. 12, №. 3. – С. 409-426.
10. Лаптева, Е.А. Диагностическая значимость молекулярно-генетического метода GeneXpert MTB/Rif для диагностики туберкулеза в сравнении с традиционными методами / Е.А. Лаптева, И.В. Коваленко, О.И. Буракевич и др. // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2023. – Т. 21, №. 2. – С. 118-123.
11. Латышева, Е. А. Первичные иммунодефициты: состояние проблемы на сегодняшний день. JMF-центры в России // Вопросы современной педиатрии. – 2013. – Т. 12, №. 6. – С. 73-77.
12. Лушова, А.А. Субпопуляции В-лимфоцитов: функции и молекулярные маркеры / А.А. Лушова, Э.А. Жеремян, Е.А. Астахова и др. // Иммунология. – 2019. – Т. 40, №. 6. – С. 63-76.
13. Мухина, А.А. Характеристика пациентов с первичными иммунодефицитными состояниями в Российской Федерации: от рождения до старости / А.А. Мухина, Н.Б. Кузьменко, Ю.А. Родина и др. // Педиатрия им. Г.Н. Сперанского. – 2019. – Т. 3, № 98. – С. 24-31.
14. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 21.04.2022 № 274н "Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи пациентам с врожденными и (или) наследственными заболеваниями". Зарегистрирован 13.07.2022 № 69251.
15. Ребриков, Д.В. ПЦР в реальном времени / Д.В. Ребриков, Г.А. Саматов, Д.Ю. Трофимов. - М.: Бином. Лаборатория знаний, 2009. – Т. 115.
16. Сизякина, Л.П. Динамика изменений В1- и В2-лимфоцитов при серонегативном ревматоидном артрите суставной формы / Л.П. Сизякина, М.В. Харитонова // Медицинская иммунология. - 2019. - Т. 21, № 6. - С. 1073-1080

17. Тузанкина, И.А. Анализ клинических проявлений дебюта первичных иммунодефицитов у взрослых / И.А. Тузанкина, М.Л. Каракина, Е.В. Власова // *Медицинская иммунология*. – 2014. – Т. 16, №. 4. – С. 367-374.
18. Ярилин, А.А. *Иммунология* / А.А. Ярилин. – М.: ГЕОТАР-МЕД, 2010. – 251-260.
19. Ahmed, A. Emerging patterns of regulatory T cell function in tuberculosis / A. Ahmed, A. Vyakarnam // *Clinical & Experimental Immunology*. – 2020. – Vol. 202, №. 3. – P. 273-287.
20. Aldrovandi, G.M. The SCID-hu mouse as a model for HIV-1 infection / G.M. Aldrovandi, G. Feuer, L. Gao et al. // *Nature*. – 1993. – Vol. 363, №. 6431. – P. 732-736.
21. Almansa, R. Immunological monitoring to prevent and treat sepsis / R. Almansa, J. Wain, E. Tamayo et al. // *Critical Care*. – 2013. – Vol. 17, №. 1. – P. 1-3.
22. Amaya-Uribe, L. Primary immunodeficiency and autoimmunity: a comprehensive review / L. Amaya-Uribe, M. Rojas, G. Azizi et al. // *Journal of autoimmunity*. – 2019. – Vol. 99. – P. 52-72.
23. Baker, M.W. Development of a routine newborn screening protocol for severe combined immunodeficiency / M.W. Baker, W.J. Grossman, R.H. Laessig et al. // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2009. – Vol. 124, №. 3. – P. 522-527.
24. Bakin, E.A. A novel approach for COVID-19 patient condition tracking: from instant prediction to regular monitoring / E.A. Bakin, O.V. Stanevich, M.P. Chmelevsky et al. // *Frontiers in Medicine*. – 2021. – Vol. 8. – P. 744652.
25. Barry, M. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death / M. Barry, R.C. Bleackley // *Nature Reviews Immunology*. – 2002. – Vol. 2, №. 6. – P. 401-409.
26. Basha, S. Immune responses in neonates / S. Basha, N. Surendran, M. Pichichero // *Expert review of clinical immunology*. – 2014. – Vol. 10, №. 9. – P. 1171-1184.

27. Bates, C.A. Granulomatous-lymphocytic lung disease shortens survival in common variable immunodeficiency / C.A. Bates, M.C. Ellison, D.A. Lynch et al. // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2004. – Vol. 114, №. 2. – P. 415-421.
28. Bonilla, F.A. Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiency / F.A. Bonilla, D.A. Khan, Z.K. Ballas et al. // *Annals of allergy, asthma & immunology*. – 2005. – Vol. 94, №. 5. – P. 1-63.
29. Bonyhadi, M.L. HIV induces thymus depletion in vivo / M.L. Bonyhadi, L. Rabin, S. Salimi et al. // *Nature*. – 1993. – Vol. 363, №. 6431. – P. 728-732.
30. Borgella, S. Impact of pregnancy-associated malaria on infant malaria infection in southern Benin / S. Borgella, N. Fievet, B.T. Huynh et al. // *PloS one*. – 2013. – Vol. 8, №. 11. – P. 624.
31. Busse, P.J. Pulmonary complications of common variable immunodeficiency / P.J. Busse, S. Farzan, C. Cunningham-Rundles // *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. – 2007. – Vol. 98, №. 1. – P. 1-9.
32. Cheung, C.Y. Cytokine responses in severe acute respiratory syndrome coronavirus-infected macrophages in vitro: possible relevance to pathogenesis / C.Y. Cheung, L.L.M. Poon, I.H.Y. Ng et al. // *Journal of virology*. – 2005. – Vol. 79, №. 12. – P. 7819-7826.
33. Choi, E. H. Rapid DNA extraction from dried blood spots on filter paper: potential applications in biobanking / E.H. Choi, S.K. Lee, C. Ihm et al. // *Osong Public Health and Research Perspectives*. – 2014. – Vol. 5, №. 6. – P. 351-357.
34. Chun, T.W. Differential susceptibility of naive and memory CD4+ T cells to the cytopathic effects of infection with human immunodeficiency virus type 1 strain LAI / T.W. Chun, K. Chadwick, J. Margolick et al. // *Journal of virology*. – 1997. – V. 71, №. 6. – P. 4436-4444.
35. Crotty, S. The 1 - 1 - 1 fallacy / S. Crotty // *Immunological reviews*. – 2012. – Vol. 247, №. 1. – P. 133-142.

36. Cunningham-Rundles, C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients / C. Cunningham-Rundles, C. Bodian // *Clinical immunology*. – 1999. – Vol. 92, №. 1. – P. 34-48.
37. De Santis, W. Health care and infective aspects in patients affected by common variable immunodeficiency assisted in the Lazio Regional Authority Reference Centre for Primary Immunodeficiencies / W. De Santis, A. Esposito, V. Conti et al. // *Infez Med*. – 2006. – Vol. 14, №. 1. – P. 13-23.
38. Deane, S. Common variable immunodeficiency: etiological and treatment issues / S. Deane, C. Selmi, S.M. Naguwa // *International archives of allergy and immunology*. – 2009. – Vol. 150, №. 4. – P. 311-324.
39. Di Renzo, M. Common variable immunodeficiency: a review / M. Di Renzo, A. L. Pasqui, A. Auteri // *Clinical and experimental medicine*. – 2004. – Vol. 3. – P. 211-217.
40. Douek, D.C. Assessment of thymic output in adults after haematopoietic stemcell transplantation and prediction of T-cell reconstitution / D.C. Douek, R.A. Vescio, M.R. Betts et al. // *The Lancet*. – 2000. – Vol. 355, №. 9218. – P. 1875-1881.
41. Douek, D.C. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection / D.C. Douek, R.D. McFarland, P.H. Keiser et al. // *Nature*. – 1998. – Vol. 396, №. 6712. – C. 690-695.
42. Dyavar, S.R. Normalization of cell associated antiretroviral drug concentrations with a novel RPP30 droplet digital PCR assay / S.R. Dyavar, Z. Ye, S.N. Byrareddy et al. // *Scientific reports*. – 2018. – Vol. 8, №. 1. – P. 1-11.
43. Eades-Perner, A.M. The European internet-based patient and research database for primary immunodeficiencies: results 2004–06 / A.M. Eades-Perner, B. Gathmann, V. Knerr et al. // *Clinical & Experimental Immunology*. – 2007. – Vol. 147, №. 2. – P. 306-312.
44. Edelbroek, P.M. Dried blood spot methods in therapeutic drug monitoring: methods, assays, and pitfalls / P.M. Edelbroek, J. van der Heijden, L.M.L. Stolk // *Therapeutic drug monitoring*. – 2009. – Vol. 31, №. 3. – P. 327-336.

45. Fink, P.J. The biology of recent thymic emigrants / P.J. Fink // *Annual review of immunology*– 2013. – Vol. 31. – P. 31-50.
46. Gathmann, B. The European internet-based patient and research database for primary immunodeficiencies: update 2011 / B. Gathmann // *Clinical & Experimental Immunology*. – 2012. – Vol. 167, №. 3. – P. 479-491.
47. Ghosn, E.E.B. CD11b expression distinguishes sequential stages of peritoneal B-1 development / E.E.B. Ghosn, Y. Yang, J. Tung et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2008. – Vol. 105, №. 13. – P. 5195-5200.
48. Griffin, D.O. Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+ CD27+ CD43+ CD70– / D.O. Griffin, N.E. Holodick, T.L. Rothstein // *Journal of Experimental Medicine*. – 2011. – Vol. 208, №. 1. – P. 67-80.
49. Gubernatorova, E.O. IL-6: Relevance for immunopathology of SARS-CoV-2 / E.O. Gubernatorova, E.A. Gorshkova, A.I. Polinova et al. // *Cytokine & growth factor reviews*. – 2020. – Vol. 53. – P. 13-24
50. Guthrie, R. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants / R. Guthrie, A. Susi // *Pediatrics*. – 1963. – Vol. 32, №. 3. – P. 338-343.
51. Haddad, R. Molecular characterization of early human T/NK and B-lymphoid progenitor cells in umbilical cord blood / R. Haddad, P. Guardiola, B. Izac et al. // *Blood*. – 2004. – Vol. 104, №. 13. – P. 3918-3926.
52. Heimall, J.R. Use of Genetic Testing for Primary Immunodeficiency Patients / J.R. Heimall, D. Hagin, J. Hajjar et al. // *J Clin Immunol*. – 2018 – Vol. 38, №. 3. – P. 320-329.
53. Henny, J. Recommendation for the review of biological reference intervals in medical laboratories / J. Henny, A. Vassault, G. Boursier et al. // *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. – 2016. – Vol. 54, №. 12. – P. 1893-1900.
54. Hu, B. The cytokine storm and COVID - 19 / B. Hu, S. Huang, L. Yin // *Journal of medical virology*. – 2021. – Vol. 93, №. 1. – P. 250-256.

55. Imberti, L. Effects of combined antiretroviral therapy on B-and T-cell release from production sites in long-term treated HIV-1+ patients / E. Quiros-Roldan, F. Serana, M. Chiarini et al. // *Journal of translational medicine*. – 2012. – Vol. 10. – P. 1-11.
56. Jafarzadeh, A. Lymphopenia an important immunological abnormality in patients with COVID - 19: possible mechanisms / A. Jafarzadeh, S. Jafarzadeh, P. Nozari et al. // *Scandinavian Journal of Immunology*. – 2021. – Vol. 93, № 2. – P.12967.
57. Kazer, S.W. Evolution and diversity of immune responses during acute HIV infection / S.W. Kazer, B.D. Walker, A.K. Shalek // *Immunity*. – 2020. – Vol. 53, № 5. – P. 908-924.
58. Khadzhieva, M.B. TREC/KREC levels in young COVID-19 patients / M.B. Khadzhieva, E.V. Kalinina, S.S. Larin et al. // *Diagnostics*. – 2021. – Vol. 11, №. 8. – P. 1486.
59. King, J.R. Newborn Screening for Primary Immunodeficiency Diseases: History, Current and Future Practice / J.R. King, L. Hammarström // *J Clin Immunol*. – 2018. – Vol. 38, № 1. - P. 56-66.
60. Korobova, Z.R. Changes in Anti-SARS-CoV-2 IgG subclasses over time and in association with disease severity / Z.R. Korobova, E.V. Zueva, N.A. Arsentieva et al. // *Viruses*. – 2022. – Vol. 14, №. 5. – P. 941.
61. Kwok, J.S.Y. Establishing simultaneous T cell receptor excision circles (TREC) and K-deleting recombination excision circles (KREC) quantification assays and laboratory reference intervals in healthy individuals of different age groups in Hong Kong / J.S.Y. Kwok, S.K.F. Cheung, J.C.Y. Ho et al. // *Frontiers in immunology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 1411.
62. Laitala, V. Time-resolved detection probe for homogeneous nucleic acid analyses in one-step format / V. Laitala, A. Ylikoski, H.M. Raussi et al. // *Analytical biochemistry*. – 2007. – Vol. 361, №. 1. – P. 126-131.

63. Latiff, A.H.A. The clinical significance of immunoglobulin A deficiency / A.H.A. Latiff, M.A. Kerr // *Annals of clinical biochemistry*. – 2007. – Vol. 44, № 2. – P. 131-139.
64. Lawson, A.J. Newborn screening blood spot analysis in the UK: influence of spot size, punch location and haematocrit / A. J. Lawson, L. Bernstone, S.K. Hall // *Journal of Medical screening*. – 2016. – Vol. 23, № 1. – P. 7-16.
65. Litzman, J. Mannose-binding lectin gene polymorphic variants predispose to the development of bronchopulmonary complications but have no influence on other clinical and laboratory symptoms or signs of common variable immunodeficiency / J. Litzman, T. Freiburger, B. Grimbacher et al. // *Clinical & Experimental Immunology*. – 2008. – Vol. 153, № 3. – P. 324-330.
66. Livak, F.T-cell receptor alpha locus V (D) J recombination by-products are abundant in thymocytes and mature T cells / F. Livak, D.G. Schatz // *Molecular and Cellular Biology*. – 1996. – Vol. 16, № 2. – P. 609-618.
67. Locci, M. Human circulating PD-1+ CXCR3- CXCR5+ memory Tfh cells are highly functional and correlate with broadly neutralizing HIV antibody responses / M. Locci, C. Havenar-Daughton, E. Landais et al. // *Immunity*. – 2013. – Vol. 39, № 4. – P. 758-769.
68. Loenen, W.A.M. Immune evasion by human cytomegalovirus: lessons in immunology and cell biology / W.A.M. Loenen, C.A. Bruggeman., E. Wiertz // *Seminars in immunology*. – Academic Press, 2001. – Vol. 13, № 1. – P. 41-49.
69. Lucas, M. Infection outcomes in patients with common variable immunodeficiency disorders: relationship to immunoglobulin therapy over 22 years / M. Lucas, M. Lee, J. Lortan et al. // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2010. – Vol. 125, № 6. – P. 1354-1360.
70. McCabe, E.R.B. DNA microextraction from dried blood spots on filter paper blotters: potential applications to newborn screening / E.R.B. McCabe, S.Z. Huang, W.K. Seltzer et al. // *Human genetics*. – 1987. – Vol. 75. – P. 213-216.

71. Mclean, A.R. In vivo estimates of division and death rates of human T lymphocytes / A.R. Mclean, C.A. Michie // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1995. – Vol. 92, № 9. – P. 3707-3711.
72. Mehta, P. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression / P. Mehta, D.F. McAuley, M. Brown et al. // *The lancet*. – 2020. – Vol. 395, № 10229. – P. 1033-1034.
73. Mensen, A. Utilization of TREC and KREC quantification for the monitoring of early T-and B-cell neogenesis in adult patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation / A. Mensen, C. Ochs, A. Stroux et al. // *Journal of translational medicine*. – 2013. – Vol. 11. – P. 1-9.
74. Moir, S. Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals / S Moir, J Ho, A Malaspina, W Wang et al. // *The Journal of experimental medicine*. – 2008. – Vol. 205, № 8. – P. 1797-1805.
75. Monaghan, T.F. Foundational statistical principles in medical research: sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value / T.F. Monaghan, S.N. Rahman, C.W. Agudelo et al. // *Medicina*. – 2021. – Vol. 57, № 5. – P. 503.
76. Morimoto, Y. Granulomatous disease in common variable immunodeficiency / Y. Morimoto, J.M. Routes // *Current allergy and asthma reports*. – 2005. – Vol. 5, № 5. – P. 370-375.
77. Nakagawa, N. Quantification of κ -deleting recombination excision circles in Guthrie cards for the identification of early B-cell maturation defects / N. Nakagawa, K. Imai, H. Kanegane et al. // *Journal of allergy and clinical immunology*. – 2011. – Vol. 128, № 1. – P. 223-225.
78. Notarangelo, L.D. Human inborn errors of immunity: An expanding universe / L.D. Notarangelo, R. Bacchetta, J.L. Casanova et al. // *Science immunology*. – 2020. – Vol. 5, № 49. – P. 1662.

79. Pascarella, G. COVID - 19 diagnosis and management: a comprehensive review / G. Pascarella, A. Strumia, C. Piliego et al. // *Journal of internal medicine*. – 2020. – Vol. 288, № 2. – P. 192-206.
80. Profaizer, T. A multiplex, droplet digital PCR assay for the detection of T-cell receptor excision circles and kappa-deleting recombination excision circles / T. Profaizer, P. Slev // *Clinical Chemistry*. – 2020. – Vol. 66, № 1. – P. 229-238.
81. Quinti, I. Long-term follow-up and outcome of a large cohort of patients with common variable immunodeficiency / I. Quinti, A. Soresina, G. Spadaro et al. // *Journal of clinical immunology*. – 2007. – Vol. 27. – P. 308-316.
82. Saeed, S. Evidence based emergency medicine part 2: positive and negative predictive values of diagnostic tests / S. Safari, A. Baratloo, M. Elfil et al. // *Archives of Academic Emergency Medicine*. – 2015. – Vol. 3, № 3. – P. 87-88.
83. Sánchez-Ramón, S. Primary and secondary immunodeficiency diseases in oncohaematology: warning signs, diagnosis, and management / S. Sánchez-Ramón, A. Bermúdez, L.I. González-Granado et al. // *Frontiers in immunology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 586.
84. Sanz, E. Ordering human CD34+ CD10– CD19+ pre/pro-B-cell and CD19– common lymphoid progenitor stages in two pro-B-cell development pathways / E. Sanz, N. Muñoz-A, J. Monserrat et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2010. – Vol. 107, № 13. – P. 5925-5930.
85. Schäffer, A.A. Deconstructing common variable immunodeficiency by genetic analysis / A.A. Schäffer, U. Salzer, L. Hammarström et al. // *Current opinion in genetics & development*. – 2007. – Vol. 17, №. 3. – P. 201-212.
86. Schnittman, S.M. Evidence for susceptibility of intrathymic T cell precursors to human immunodeficiency virus infection: a mechanism for T4 (CD4) lymphocyte depletion / S.M. Schnittman, S.M. Denning, J.J. Greenhouse et al. // *Transactions of the Association of American Physicians*. – 1990. – Vol. 103. – P. 96-101.
87. Schnittman, S.M. Preferential infection of CD4+ memory T cells by human immunodeficiency virus type 1: evidence for a role in the selective T-cell

functional defects observed in infected individuals / S.M. Schnittman, H.C. Lane, J. Greenhouse et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1990. – Vol. 87, №. 16. – P. 6058-6062.

88. Seidel, M.G. Autoimmune and other cytopenias in primary immunodeficiencies: pathomechanisms, novel differential diagnoses, and treatment / M.G. Seidel // Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2014. – Vol. 124, №. 15. – P. 2337-2344.

89. Seidel, M.G. The European Society for Immunodeficiencies (ESID) registry working definitions for the clinical diagnosis of inborn errors of immunity / M.G. Seidel, G. Kindle, B. Gathmann et al. // The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice. – 2019. – Vol. 7, №. 6. – P. 1763-1770.

90. Serana, F. 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 / F. Serana, M. Chiarini, C. Zanotti et al. // Journal of translational medicine. – 2013. – Vol. 11, №. 1. – P. 1-11.

91. Tanaka, N. Lung diseases in patients with common variable immunodeficiency: chest radiographic, and computed tomographic findings / N. Tanaka, J.S. Kim, C.A. Bates et al. // Journal of computer assisted tomography. – 2006. – Vol. 30, № 5. – P. 828-838.

92. Tangye, S.G. Human inborn errors of immunity: 2022 update on the classification from the international union of immunological societies expert committee / S.G. Tangye, W. Al-Herz, A. Bousfiha et al. // Journal of clinical immunology. – 2022. - Vol. 42, № 7. – P. 1473-1507.

93. Tessitore, M.V. Detection of newly produced T and B lymphocytes by digital PCR in blood stored dry on nylon flocced swabs / M.V. Tessitore, A. Sottini, A.M. Roccaro et al. // Journal of Translational Medicine. – 2017. – Vol. 15, № 1. – P. 1-10.

94. Tonegawa, S. Somatic generation of antibody diversity / S. Tonegawa // Nature. – 1983. – Vol. 302, № 5909. – P. 575-581.

95. Tortorella, D. Viral subversion of the immune system / D. Tortorella, B.E. Gewurz, M.H. Furman // *Annual review of immunology*. – 2000. – Vol. 18, № 1. – P. 861-926.
96. Tuano, K.S. Secondary immunodeficiencies: An overview / K.S. Tuano, N. Seth, J. Chinen // *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. – 2021. – Vol. 127, № 6. – P. 617-626.
97. Vale, A.M. Development and function of B cell subsets / A.M. Vale, J.F. Kearney, A. Nobrega et al. // *Molecular Biology of B Cells*. – Academic Press. - 2015. – P. 99-119.
98. Van Zelm, M.C. PID comes full circle: applications of V (D) J recombination excision circles in research, diagnostics and newborn screening of primary immunodeficiency disorders / M.C. Van Zelm, M. Van Der Burg, A.W. Langerak et al. // *Frontiers in immunology*. – 2011. – Vol. 2. – P. 12.
99. Van Zelm, M.C. Replication history of B lymphocytes reveals homeostatic proliferation and extensive antigen-induced B cell expansion / M.C. Van Zelm, T. Szczepanski, M. Van Der Burg et al. // *The Journal of experimental medicine*. – 2007. – Vol. 204, № 3. – P. 645-655.
100. Verma, N. Therapeutic management of primary immunodeficiency in older patients / N. Verma, A. Thaventhiran, B. Gathmann et al. // *Drugs & aging*. – 2013. – Vol. 30. – P. 503-512.
101. Verschuren, M.C. Preferential rearrangements of the T cell receptor-delta-deleting elements in human T cells / M.C. Verschuren, I.L. Wolvers-Tettero, T.M. Breit et al. // *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. – 1997. – Vol. 158, № 3. – P. 1208-1216.
102. Wilcken, B. Newborn screening / B. Wilcken, V. Wiley // *Pathology*. – 2008. – Vol. 40, № 2 – P. 104-115.
103. Wong, C.K. Plasma inflammatory cytokines and chemokines in severe acute respiratory syndrome / C.K. Wong, C.W.K. Lam, A.K.L. Wu et al. // *Clinical & Experimental Immunology*. – 2004. – Vol. 136, № 1. – P. 95-103.

104. Wykrzykowska, J.J. Early regeneration of thymic progenitors in rhesus macaques infected with simian immunodeficiency virus / J.J. Wykrzykowska, M. Rosenzweig, R.S. Veazey et al. // *The Journal of experimental medicine*. – 1998. – Vol. 187, № 11. – P. 1767-1778.

105. Yang, J. Broad phenotypic alterations and potential dysfunction of lymphocytes in individuals clinically recovered from COVID-19 / J. Yang, M. Zhong, E. Zhang et al. // *Journal of Molecular Cell Biology*. – 2021. – Vol. 13, №. 3. – P. 197-209.

106. Yaz, I. Lymphocyte subgroups and KREC numbers in common variable immunodeficiency: a single center study / I. Yaz, B. Ozbek, Y.Y. Ng et al. // *Journal of clinical immunology*. – 2020. – Vol. 40. – P. 494-502.

107. Zhang, S.Y. Human inborn errors of immunity to infection affecting cells other than leukocytes: from the immune system to the whole organism / S.Y. Zhang, E. Jouanguy, Q. Zhang et al. // *Current opinion in immunology*. – 2019. – Vol. 59. – P. 88-100.