

ПЕРВИЧНЫЕ ИММУНОДЕФИЦИТЫ

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛ ДНК TREC И KREC В ПУПОВИННОЙ КРОВИ НОВОРОЖДЕННЫХ САНКТ-ПЕТЕРБУРГА

Дробышевская В.Г.^{1,2}, Любимова Н.Е.¹, Семенов А.В.^{1,2}, Тотолян Арег А.^{1,2}

¹ Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

² ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Первичные иммунодефициты – это большая группа заболеваний, связанных с разнообразными врожденными генетическими нарушениями механизмов иммунной защиты организма, что приводит к развитию тяжелых хронических инфекций и часто к смерти или инвалидизации в раннем возрасте за счет формирования необратимых изменений в органах и тканях. По статистике, на первом месте среди первичных иммунодефицитов находятся гуморальные дефекты (61%), на втором месте – комбинированные иммунодефицитные состояния (18%). (Ярцев М.Н., и соавт., 2006). Данные группы иммунодефицитов характеризуются полным или частичным отсутствием Т- и/или В-клеток, или ослаблением функций этих клеток. В связи с чем особый научный интерес представляет исследование содержания у людей Т-рецепторных эксцизионных колец – TREC (T-cell receptor excision circles) и В-клеточных эксцизионных колец – KREC (kappa-deleting recombination excision circles). TREC формируются в процессе V(D)J-реарранжировки, когда часть генетического материала вырезается и замыкается в кольцо. TREC служат маркерами созревания Т-клеток, недавно эмигрировавших из тимуса и слабо вовлекавшихся в процесс пролиферации или не делившихся совсем. В ходе пролиферации клеток иммунной системы эксцизионные кольца остаются в одной из дочерних клеток, что позволяет использовать их определение как показатель пролиферации лимфоцитов и суррогатный маркер нормального развития иммунной системы. Аналогично образуются KREC (kappa-deleting recombination excision circles) – В-клеточные эксцизионные кольца. Содержание KREC в периферической крови является также суррогатным маркером эффективности развития В-клеточного звена иммунной системы в процессе эмбриогенеза. Определение TREC и KREC можно применять для ранней диагностики иммунодефицитных состояний (van Zelm et al., 2011).

Цели и задачи. 1. Отработка наиболее удобной для практического применения в скрининговом режиме методики выделения ДНК из образцов доноров.

2. Валидация методики количественного определения молекул ДНК TREC и KREC с помощью ПЦР в режиме реального времени.

3. Популяционный анализ концентрации TREC и KREC в крови условно здоровых новорожденных С.-Петербурга.

Материалы и методы. В настоящем исследовании использовалась пуповинная кровь новорожденных. Образцы крови до обследования были заморожены и хранились при -80 °С. Выделение ДНК из клеток крови осуществляли ручным методом на наборе для выделения ДНК/РНК «Рибо-Преп» (ИнтерЛабСервис, РФ) согласно инструкции фирмы-производителя и с небольшими модификациями. Для определения количества TREC и KREC использовали российскую тест-систему, предоставленную Институтом химической биологии и фундаментальной медицины подробно описанной в (Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 5. С. 467-478). Интерпретацию полученных результатов проводили, согласно рекомендациям разработчика. Статистический анализ осуществляли с использованием программы GraphPad Prizm 5.0

Результаты и обсуждение. В нашем случае проанализированы образцы пуповинной крови 157 новорожденных – 79 девочек и 78 мальчиков. Концентрация TREC составила от 10762 до 121068 копий/10⁵ лимфоцитов. Среднее значение TREC 29945±1412 копий/10⁵ лимфоцитов. Концентрация KREC составила от 10550 до 89533 копий/10⁵ лимфоцитов, среднее 36199±1347 копий/10⁵ лимфоцитов. Достоверных межполовых различий концентрации TREC и KREC выявлено не было, что совпадает с литературными данными (Xue-ling Ou et al., 2012; Донцова А.Д. и др., 2014; Гордукова и др., 2015).

Заключение. Определение количества TREC успешно используется в разных скрининговых программах новорожденных на выявление иммунодефицитов (Chiari et al., 2013; Kwan et al., 2014). Возможность определения количества KREC для диагностики гуморальных дефектов иммунной системы так же показано в ряде зарубежных и отечественных исследований. Для установления более точного диапазона референтных величин и формулировки возможных рекомендаций использования тест-системы в широкой практике национальной программы скрининга новорожденных требуются дальнейшие эксперименты.

СОДЕРЖАНИЕ TNF α , IFN γ , IL-4 И IL-10 В СЫВОРотКЕ КРОВИ У ДЕТЕЙ С ТРАНЗИТОРНОЙ ГИПОГАММАГЛОБУЛИНЕМИЕЙ

Климов А.В., Климов В.В., Деев И.А.

Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

Транзиторная гипогаммаглобулинемия детского возраста (ТГД), относительно доброкачественная форма первичного иммунодефицита, характеризуется задержкой становления синтеза IgG, а иногда и снижением IgM

и IgA у детей в возрасте старше 6 месяцев до 2-6 лет. Молекулярные аномалии в основе ТГД до настоящего времени не выявлены. Возможно, что в связи со снижением экспрессии части корцепторного комплекса В-клеток (CD19) при сохранении другой части (CD21 и CD81) после распознавания антигенов через BCR первоначально нарушается активация В-клеток, а в последующем – прекращение синтеза IgM на продукцию IgG (Artac et al., 2013). Однако этот процесс при ТГД является преходящим и нивелируется с возрастом. В настоящее время описаны немногочисленные данные по функционированию клеток, вовлечённых в иммунорегуляцию, а также цитокинов и хемокинов при ТГД.

Цель. Определение содержания TNF α , IFN γ , IL-4 и IL-10 в сыворотке крови у детей с транзиторной гипогаммаглобулинемией.

Проведено клиническое наблюдение и обследовано 14 детей в возрасте от 6 месяцев до 4 лет, страдающих рецидивирующими пиогенными инфекциями, у которых были снижены сывороточные иммуноглобулины ниже диагностических критериев: IgG < 5 г/л, IgM < 0,4 г/л, IgA < 0,2 г/л. У данных детей были исключены другие, тяжелые формы первичных иммунодефицитов. Группу сравнения составили 24 ребенка того же возраста, страдающих повторными респираторными инфекциями, без доказанного первичного иммунодефицитного состояния. Все исследования проводились в периоде ремиссии инфекций. В контрольную группу вошли 16 здоровых детей того же возраста.

В результате исследований отмечено достоверное повышение при ТГД по сравнению с группой сравнения и здоровыми детьми содержания TNF α и IL-10. Концентрации всех остальных цитокинов не менялись, включая группу сравнения по отношению к контрольной группе.

На первый взгляд полученные данные являются парадоксальными, т.к. у детей с ТГД найдено повышение одного из потенциальных провоспалительных цитокинов с системным действием (TNF α) и одновременно одного из основных иммуносупрессивных цитокинов (IL-10).

В одной из ранних работ Kowalczyk и соавт. (1997) продемонстрировали повышение TNF α , TNF β и IL-10 в крови детей с ТГД *in vivo*, а также снижение продукции IgG и IgA В-клетками в условиях стимуляции митогеном лаконоса при добавлении TNF α и TNF β *in vitro*. Это не исключает ингибирующего действия TNF α и TNF β на антителопродукцию при ТГД. IL-10 является одним из цитокинов nTreg, и его повышение может косвенно свидетельствовать об увеличенной активности этих клеток при ТГД. Такая интерпретация нашла подтверждение в исследованиях Rutkowska и соавт. (2013), которые определили существенное увеличение количества nTreg (CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺) в крови детей с ТГД.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА НАСЛЕДСТВЕННОГО АНГИОНЕВРОТИЧЕСКОГО ОТЕКА

Махарова М.А.^{1,2}, Останкова Ю.В.¹, Чурина М.А.¹, Кузнецова Р.Н.^{1,3}, Семенов А.В.^{1,3}

¹ ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

² ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург, Россия

³ ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Наследственный ангионевротический отёк (НАО) – заболевание, относящееся к группе первичных

иммунодефицитов, связанное с генетически детерминированным дефектом гена, кодирующего C1-ингибитор системы комплемента (C1-INH). Несмотря на низкую частоту, это заболевание представляет серьезную проблему в практической медицине. Этиопатогенетическая структура отечного синдрома чрезвычайно вариабельна и имеет полиморфный генез. Это приводит к постановке неправильного диагноза и назначению неадекватной для данного заболевания терапии, что и является причиной высокой смертности пациентов с НАО. Ген SERPING1 локализован в 11 хромосоме (11q11-q13.1), имеет протяженность 17 тысяч п.о. и содержит 8 экзонов, где на данный момент (согласно базе данных ClinVar) описаны около 50 мутаций, ассоциированных с НАО. Заболевание не только приводит к существенному снижению качества жизни пациентов, но и является жизнеугрожающим. Только установленный вовремя диагноз и соответствующая терапия позволяют говорить об относительно благоприятном прогнозе. Очевидна значимость своевременного определения НАО у пациентов.

Цель и задачи. Апробация молекулярно-генетического метода диагностики НАО 1 и 2 типов.

Материалы и методы. Материалом служила цельная кровь здоровых людей, а также образец крови пациента Т. предположительно больного НАО. Предварительный диагноз был поставлен на основании ряда симптомов и показаний лабораторных исследований (концентрация C1-ингибитора в пределах нормы, активность < 60% от нормы). Геномную ДНК выделяли с помощью тест-системы «Ампли-Прайм Рибо-преп» (ФБУН ЦНИИЭ). Нуклеотидные последовательности 8-ми экзонно-промоторных областей гена SERPING1 длиной 140-600 нт определяли с помощью прямого секвенирования фрагментов. При этом после проведения ПЦР с экзон-специфичными праймерами производилось очищение продуктов реакции и определение концентрации спектрофотометрическим методом на Quantus fluorometer (Promega, США). Очищенные фрагменты использовали для постановки секвенирующих реакций с прямого и обратного праймеров. Для анализа продукта секвенирующей реакции очищенный осадок растворяли в формамиде и помещали в генетический анализатор ABIPRISM 3500 (Applied Biosystems, США). Обработка и анализ последовательностей проводились в программе Contig Express пакета VectorNTI 10 Advance (Invitrogen, США).

Результаты. Полученные в результате секвенирования нуклеотидные последовательности в 2 случаях (здоровые люди) не имели особенностей, а в 1 случае была выявлена гетерозиготная точечная миссенс-мутация G- > A 57.614.516 (rs4926), приводящая к замене аминокислоты Val480Met. В базе данных ClinVar данная мутация имеет статус не патологичной, что сопровождается 3мя клиническими подтверждениями. Полученные нами результаты не противоречат этим данным, так как пациента Т. беспокоили рецидивирующие отеки конечностей и лица, однако тяжелых патологических состояний не наблюдалось. Не стоит исключать, что такая полиморфная форма белка в сочетании с другими нарушениями элементов системы комплемента может являться причиной описанных клинических проявлений и снижения активности C1-ингибитора. Этот случай только доказывает важность генетического анализа как гена C1-ингибитора, так и других ключевых белков системы комплемента при постановке диагноза.

Выводы. В ходе работы была успешно отработана и внедрена в клиническую практику методика генетического анализа НАО 1 и 2 типов. Секвенирование ДНК у конкретного индивидуума и накопление данных о конкретных мутациях может существенно облегчить и ускорить постановку диагноза у больных НАО.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОГО ПОДХОДА В ДИАГНОСТИКЕ И НАБЛЮДЕНИИ БОЛЬНЫХ С СЕЛЕКТИВНЫМ ИММУНОДЕФИЦИТОМ ИММУНОГЛОБУЛИНА А

Савин Т.В.¹, Кузнецова Р.Н.^{1,2}

¹ Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Распространенность селективного дефицита иммуноглобулина А в мире, по данным Pereira L.F., Sapina A.M. (1997), составляет 1:163 человека. В Российской Федерации частота данного первичного иммунодефицита, по данным Российской ассоциации аллергологов и клинических иммунологов (2014), составляет 1:300-1:700 человек. Несмотря на то, что данная форма иммунодефицита является самой распространенной формой первичного иммунодефицита, стандартного лечения, позволяющего контролировать данное заболевание, в настоящий момент не предложено.

Цель. Разработка клинико-иммунологических критериев течения различных форм селективного иммунодефицита иммуноглобулина А и оценка возможности дифференцированного подхода в лечении больных.

Материалы и методы. Всего было обследовано 24 пациента в возрасте от 18 до 42 лет (женщины – 13, мужчины – 11), которые наблюдаются в Центре первичных иммунодефицитов в ФБУН НИИ ЭМ им. Пастера. Контрольную группу составили 25 условно здоровых лиц.

Оценка иммунного статуса включала определение у больных концентрации иммуноглобулинов, подклассов иммуноглобулина G в сыворотке крови и носоглоточных смывах, определение субпопуляций лимфоцитов.

В работе использованы коммерческие тест-системы «Вектор-Бест». Оценка концентрации сывороточных иммуноглобулинов проводилась методом иммунотурбидиметрии, подклассы иммуноглобулина G – методом иммуноферментного анализа. Оценка субпопуляций лимфоцитов проводилась с использованием метода проточной цитофлуориметрии.

Результаты. Выявлены различные клинические формы течения селективного иммунодефицита иммуноглобулина А (1 группа – больные с аутоиммунной патологией, 2 группа – пациенты с рецидивирующими заболеваниями верхних и нижних дыхательных путей).

Анализ показателей гуморального иммунитета показал, что концентрация иммуноглобулина А в сыворотке крови больных была достоверно ниже уровня данного иммуноглобулина у пациентов группы практически здоровых лиц ($p < 0,001$), что подтверждало наличие у больных селективного иммунодефицита иммуноглобулина А.

Проведенный сравнительный анализ гуморального профиля позволил выявить, что в группе больных с преимущественно аутоиммунной патологией уровень имму-

ноглобулина А в сыворотке крови был достоверно выше, чем в группе больных с рецидивирующими заболеваниями верхних и нижних дыхательных путей ($p < 0,01$).

При проведении нашего исследования мы обнаружили, что концентрация иммуноглобулина А в носоглоточных смывах больных была снижена всего в 1,5 раза в сравнении с показателями практически здоровых лиц, а уровень иммуноглобулина М резко повышен. Но выявленная особенность требует дальнейшего изучения и проведения статистической обработки.

Таким образом, анализ клинического течения селективного иммунодефицита иммуноглобулина А и показателей гуморального иммунитета позволяет предположить наличие связи между особенностями течения заболевания и гуморальным профилем больных.

ЗНАЧИМОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ ФАКТОРОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУННОГО ОТВЕТА У БОЛЬНЫХ ОБЩЕВАРИАБЕЛЬНОЙ ИММУННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ

Сизязкина Л.П., Андреева И.И., Кролевец Д.И.

ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Ростов-на-Дону, Россия

Патогенетически значимым принципом терапии пациентов с общевариабельной иммунной недостаточностью (ОВИН) – гипогаммаглобулинемией является замещение недостающего эффекторного звена гуморальной иммунной защиты внутривенными иммуноглобулинами (ВВИГ). Однако не у всех больных на фоне регулярной заместительной терапии происходит полное купирование признаков иммунной недостаточности (Караулов А.В., Сидоренко И.В., 2011; Сизязкина Л.П., Андреева И.И., 2012). Возможно, что помимо протективной роли заместительной иммуноглобулинотерапии немаловажный вклад в обеспечение эффективности работы иммунной системы у больных с первичными иммунодефицитами по гуморальному типу вносят факторы врожденного иммунитета, в первую очередь – клеточное звено.

Целью настоящей работы является выявление роли клеточных факторов врожденного иммунитета у пациентов с первичным иммунодефицитом – ОВИН.

Под наблюдением находилось 16 пациентов в возрасте 8-59 лет (9 мужчин, 7 женщин) с диагнозом ОВИН – гипогаммаглобулинемия, получавших в течение года заместительную терапию ВВИГ (0,4 г/кг массы ежемесячно). При этом у пяти больных на фоне регулярного приема препаратов регистрировались эпизоды воспаления придаточных пазух, обострение хронического бронхита, гнойный конъюнктивит. Комплексную оценку параметров иммунного статуса проводили методом проточной лазерной цитометрии на приборе «FC 500» и определяли экспрессию CD16 и содержание Гранзима В в CD3⁺CD16⁺ лимфоцитах, экспрессию HLA-DR на CD14⁺ моноцитах периферической крови с использованием соответствующих моноклональных антител (Becton Coulter). Кислородзависимую метаболическую активность нейтрофилов оценивали в НСТ-тесте. Контрольную группу составили 10 практически здоровых доноров крови в возрасте 20-32 лет. Математическую обработку полученных данных проводили, используя программу Statistica 7.0.

При анализе параметров клеточных факторов врожденного иммунитета выявлено, что для всех обследован-

ных больных характерным является снижение количества циркулирующих CD16⁺ лимфоцитов (6,3±2,1%, в контроле 12,1±1,2%), также как и угнетение их цитолитического потенциала в сравнении с данными практически здоровых (CD16⁺GrB⁺ 4,30±2,3; в контроле 10,21±1,10%). Однако функциональная активность CD16⁺ натуральных киллеров (НК), оцениваемая по процентному содержанию Гранзим-содержащих НК от их общего числа, у не болеющих выше (20,1±3,7%) по сравнению с пациентами с клиническими признаками иммунной недостаточности на фоне терапии ВВИГ (7,2±2,9%). Кроме того, у больных без клинических проявлений ОВИН в условиях заместительной терапии более высокий антигенпрезентирующий потенциал макрофагальных клеток: CD14⁺HLA-DR⁺ – 73±8% (в контроле 85±5%), тогда как у болеющих отитами, конъюнктивитами, бронхитами количество CD14⁺HLA-DR⁺ составило лишь 52±3%. Также выявлены отличия функционирования фагоцитирующих нейтрофилов, которые наиболее показательны при сопоставлении значения К ст. НСТ-теста. У болеющих на фоне ВВИГ-терапии регистрируется существенное снижение адаптационного потенциала нейтрофильного фагоцитоза (К ст. 1,4±0,2 у.е.) в сравнении с аналогичным показателем не болеющих пациентов (1,8±0,3).

Таким образом, у больных с врожденным дефектом гуморальной составляющей адаптивной иммунной защиты клеточные факторы врожденного иммунитета играют существенную роль в поддержании целостного функционального потенциала иммунной системы, что следует учитывать при иммунокоррекции в случае неполной эффективности заместительной терапии.

ТАРГЕТНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ (NGS) В ДИАГНОСТИКЕ ПЕРВИЧНЫХ ИММУНОДЕФИЦИТОВ

Суспицын Е.Н.^{1,2}, Гусева М.Н.^{3,4}, Соколенко А.П.^{1,2}, Бизин И.В.⁵, Имянитов Е.Н.^{1,2}

¹ ФГБОУ «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет», Санкт-Петербург, Россия

² ФГБУ «Научно-исследовательский институт онкологии им. Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

³ Консультативно-диагностический центр Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета, Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия

⁵ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

Первичные иммунодефициты (ПИД) – заболевания, связанные с наличием наследственного дефекта како-

го-либо звена иммунной защиты. Диагностика ПИД затрудняется существованием большого числа нозологических форм (более 300), которое регулярно увеличивается. Клинико-лабораторные признаки часто недостаточно специфичны, что не всегда позволяет с уверенностью поставить диагноз, а высокая генетическая гетерогенность ограничивает ценность ДНК-анализа. Эффективность диагностики может быть повышена за счет применения методов секвенирования нового поколения (NGS), которые дают возможность одномоментного тестирования множества генов.

Цель и задачи. Установление генетической причины заболевания у детей с клиническими признаками возможного первичного иммунодефицита.

Материалы и методы. Для проведения ДНК-анализа были отобраны 34 пациента с подозрением на наличие ПИД; отбор осуществлялся на основании наличия клинических признаков ПИД, предложенных Jeffrey Modell Foundation. Клинические и иммунологические признаки позволяли заподозрить конкретные нозологические формы ПИД лишь в трети случаев (12/34, 35%). Поиск мутаций проводился посредством высокопроизводительного таргетного секвенирования на платформе Illumina. При этом целевому обогащению с помощью наборов зондов SeqCapEZMedExome (Roche) подвергались кодирующие последовательности 302 известных генов первичных иммунодефицитов. При отборе потенциально патогенных вариантов учитывались тип мутации, популяционная частота, наличие сведений о патогенности, а также данные предиктивных программ.

Результаты. Однозначный результат генетического исследования, т.е. выявление патогенной мутации, соответствующей клинической картине и типу наследования заболевания, был получен в 13/34 (38%) случаев. Выявлен широкий спектр нозологических форм ПИД, включая такие заболевания как аутоиммунный полиэндокринный синдром 1 типа, синдром IPЕХ, агаммаглобулинемия Брутона, хроническая грануломатозная болезнь, атаксия-телеангиэктазия, синдром Нетертона, аутовоспалительные синдромы и др. В 6 из 13 случаев результат ДНК-анализа соответствовал диагнозу, предполагаемому ранее на основании клинических и лабораторных данных.

Заключение. Мультигенное таргетное секвенирование является ценным методом диагностики первичных иммунодефицитных состояний, особенно в ситуациях, когда клинико-лабораторные данные не дают оснований к проведению «прицельного» тестирования отдельных генов. Эффективность выявления генетических причин ПИД в проведенном исследовании соответствует данным зарубежных работ, выполненных с использованием аналогичных подходов.

Работа поддержана за счет средств гранта РФФИ 15-15-00079.