

Значимость Т-рецепторных и каппа-делеционных рекомбинационных эксцизионных колец как молекулярных маркеров в оценке состояния новорожденных различного гестационного возраста

Е.Н. Волкова¹, Л.И. Ипполитова²

¹БУЗ ВО «Воронежская областная клиническая больница №1», Воронеж, Россия;

²ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко» Минздрава России, Воронеж, Россия

Significance of T-receptor and kappa-deletion recombination excision rings as molecular markers in the assessment of newborns of different gestational ages

E.N. Volkova¹, L.I. Ippolitova²

¹Voronezh Regional Clinical Hospital No. 1, Voronezh, Russia;

²Voronezh Burdenko State Medical University, Voronezh, Russia

Существует большое количество исследований у новорожденных, рожденных раньше срока, у которых отмечено снижение уровня Т-рецепторных и каппа-делеционных рекомбинационных эксцизионных колец (TREC и KREC), что свидетельствует о нарушении функционирования Т- и/или В-клеточного звеньев иммунитета. Остаются актуальными исследования, направленные на углубленное изучение причинно-значимых факторов, приведших к снижению оцениваемых показателей. Цель исследования. Определить влияние соматометрических параметров и пренатальных факторов на уровень TREC и KREC у новорожденных, а также оценить динамику этих показателей в зависимости от гестационного возраста. Материалы и методы. В исследование включены 203 новорожденных в гестационном возрасте от 22 до 41 нед. Образцы крови брали в рамках проведения неонатального скрининга. Методом ПЦР выделяли TREC и KREC из пятен сухой крови, нанесенных на карты Гатри. Оцениваемые показатели проанализированы в зависимости от срока гестации, соматометрических данных и пренатальных факторов (способ родоразрешения, число плодов в беременности). Статистический анализ проводили с использованием программы StatTech v. 4.1.4.

Результаты. Установлено, что при увеличении гестационного возраста на 1 нед повышается уровень KREC на $44,610 \cdot 10^5$ в 1 мкл ($r_{xy}=0,271$; $p<0,001$), уровень TREC — на $27,274 \cdot 10^5$ в 1 мкл ($r_{xy}=0,264$; $p=0,002$). По данным линейного регрессионного анализа выявлены прямые слабые связи между уровнями TREC и KREC и антропометрическими данными. У детей из многоплодных беременностей уровни TREC были достоверно выше, чем у новорожденных из одноплодных беременностей ($p<0,001$). Заключение. Иммунная система недоношенных новорожденных способна вырабатывать адекватное количество TREC и KREC. В период с 22-й по 28-ю неделю происходит наиболее интенсивное увеличение оцениваемых показателей, после чего их уровень относительно стабилизируется. Поскольку у недоношенных новорожденных отмечается тенденция к снижению уровня TREC и KREC, чрезвычайно важна комплексная оценка динамики этих показателей в зависимости от значимых пренатальных и соматометрических данных.

Ключевые слова: новорожденные, Т-рецепторное эксцизионное кольцо, каппа-делеционное рекомбинационное эксцизионное кольцо, неонатальный скрининг, недоношенность.

Для цитирования: Волкова Е.Н., Ипполитова Л.И. Значимость Т-рецепторных и каппа-делеционных рекомбинационных эксцизионных колец как молекулярных маркеров в оценке состояния новорожденных различного гестационного возраста. Рос вестн перинатол и педиатр 2024; 69:(4): 31–36. DOI: 10.21508/1027-4065-2024-69-4-31-36

Currently, there is a large number of studies indicating that preterm infants have reduced levels of T-receptor and kappa-deletion recombination excision rings (TREC and KREC) as indicators of impaired T- and/or B-cell immunity. Studies aimed at in-depth study of the causative factors that led to the decrease in the estimated indicators remain relevant.

Purpose. Determination of the influence of somatometric parameters and prenatal factors on the level of TREC and KREC in newborns, as well as evaluation of the dynamics of these indicators from gestational age.

Material and methods. The study included 203 neonates with gestational ages ranging from 22 to 41 weeks. TREC and KREC were isolated by PCR from dried blood spots on Guthrie cards. Blood sampling was performed as part of neonatal screening. The estimated parameters were analyzed according to gestational age, somatometric data and prenatal factors (mode of delivery, number of fetuses in pregnancy). Statistical analysis was performed using the StatTech v. 4.1.4 software.

Results. It was found that the increase in gestational age by 1 week increases the KREC level by $44.610 \cdot 10^5$ ($r_{xy}=0.271$, $p<0.001$), TREC level by $27.274 \cdot 10^5$ ($r_{xy}=0.264$, $p=0.002$). Linear regression analysis showed weak direct relationships between TREC and KREC levels and anthropometric data. Children from multiple pregnancies had significantly higher TREC values than infants from singleton pregnancies ($p<0.001$).

Conclusion. The immune system of premature newborns is capable of producing adequate amounts of TREC and KREC. Between 22 and 28 weeks of age, the most intense increase in the assessed indicators occurs, after which their levels relatively stabilize. Since TREC and KREC levels tend to decrease in preterm newborns, a comprehensive evaluation of the dynamics of these indicators depending on significant prenatal and somatometric data is extremely important.

Key words: T-cell receptor excision circle, kappa-deleting recombination excision circle, neonatal screening, prematurity.

For citation: Volkova E.N., Ippolitova L.I. Significance of T-receptor and kappa-deletion recombination excision rings as molecular markers in the assessment of newborns of different gestational ages. Ros Vestn Perinatol i Pediatr 2024; 69:(4): 31–36 (in Russ). DOI: 10.21508/1027-4065-2024-69-4-31-36

В настоящее время оценка уровня Т-рецепторных (TREC, T-cell receptor excision circle) и каппа-делеционных (KREC, kappa-deleting recombination excision circles) рекомбинационных эксцизионных колец, т.е. кольцевых молекул ДНК, образующихся в ходе дифференцировки рецепторов Т- и В-лимфоцитов, определяемых в рамках расширенного неонатального скрининга, используется для выявления группы заболеваний (врожденных ошибок иммунитета), связанных с первичным нарушением в функционировании Т- и/или В-клеточного звена иммунитета [1]. Выявление новорожденных из группы риска развития иммунозависимых заболеваний — важная и социально значимая проблема современного здравоохранения, так как их своевременная диагностика и раннее лечение поможет значительно снизить смертность и заболеваемость у детей данной группы. Относительная доступность, высокая чувствительность и специфичность указанных тестов делает их важной и экономически эффективной мерой общественного здравоохранения [2, 3].

TREC-тест выявляет младенцев с низким количеством циркулирующих Т-лимфоцитов [4]. Любой причинно-значимый фактор, нарушающий развитие Т-клеток, блокирует их созревание в тимусе и/или способствует активации процессов, направленных на их ускоренное апоптотическое разрушение [1, 5]. TREC-тест позволяет выявить не только заболевания из группы врожденных ошибок иммунитета, но и вторичные обратимые состояния, сопровождающиеся низким содержанием Т-лимфоцитов, например при врожденных пороках сердца или при патологиях, приводящих ко вторичной потере циркулирующих нативных Т-лимфоцитов [6, 7]. Круги рекомбинации с удалением каппа-цепей (KREC) служат биомаркерами зрелых В-клеток [8]. KREC-тестирование пятен крови новорожденных потенциально полезно для выявления детей с дефектами раннего созревания В-клеток [5, 9].

В настоящее время существует большое количество исследований, отмечающих, что у новорожденных, рожденных раньше срока, наблюдаются сниженные уровни TREC и KREC [10, 11]. Остаются актуальными исследования, направленные на углубленное изучение причинно-значимых факторов, приводящих к снижению оцениваемых показателей, так как непонятно, связана ли гипопункция Т- и В-лимфоцитов у детей

данной когорты исключительно с состоянием недоношенности и гестационной незрелости или у новорожденных, рожденных раньше срока, сниженные исковые значения связаны с врожденными дефектами в работе иммунной системы [12, 13].

Цель исследования: определить влияния соматометрических параметров и пренатальных факторов на уровень TREC и KREC у новорожденных, а также оценить динамику этих показателей в зависимости от гестационного возраста.

Характеристика детей и методы исследования

В исследование включены 203 новорожденных в гестационном возрасте от 22 до 41 нед, родившихся на базе перинатального центра БУЗ ВО ВОКБ №1 г. Воронежа и получавших дальнейшее лечение в отделении реанимации и интенсивной терапии №5. У каждого законного представителя новорожденного ребенка было взято информированное добровольное согласие на обработку данных и использование их в научных целях. Проведение исследования одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО ВГМУ им. Н.Н. Бурденко МЗ РФ г. Воронежа.

Методом ПЦР в режиме реального времени набором реагентов «ИММУНО-БИТ МУЛЬТИ» осуществляли выделение из пятен сухой крови, нанесенных на карты Гатри, TREC и KREC. Образцы крови брали в рамках неонатального скрининга. Исследование проводили на базе лаборатории БУЗ ВО ВОКБ №1 г. Воронежа. Полученные данные сопоставляли со сроком гестации, соматометрическими данными (пол, масса тела, окружность головы и грудной клетки), пренатальными факторами (способ родоразрешения, число плодов в беременности). Из исследования были исключены 74 новорожденных с критическими уровнями TREC и KREC (менее $100 \cdot 10^5$ в 1 мкл) и дети, находящиеся в «серой зоне» (TREC от 100 до $450 \cdot 10^5$ в 1 мкл; KREC от 100 до $250 \cdot 10^5$ в 1 мкл).

Для удобства оценки имеющихся данных и большей наглядности получаемых результатов все участвующие в исследовании новорожденные были разделены на 5 групп с учетом классификации степени недоношенности Всемирной организации здравоохранения: 1-я группа — экстремально недоношенные новорожденные (срок гестации 22–27^{6/7} нед; $n=22$), 2-я группа — глубоко недоношенные новорожденные (срок гестации 28–31^{6/7} нед; $n=44$), 3-я группа — умеренно недоношенные новорожденные (срок гестации 32–33^{6/7} нед; $n=26$), 4-я группа — поздние недоношенные новорожденные (срок гестации 34–36^{6/7} нед; $n=21$), 5-я группа — доношенные новорожденные (срок гестации 37–41 нед; $n=16$).

Статистический анализ проводили с использованием программы StatTech v. 4.1.4 (разработчик — ООО «Статтех», Россия). Для определения нормальности распределения оцениваемых количественных показателей использовали критерии Шапито–Уилка

© Волкова Е.Н., Ипполитова Л.И., 2024

Адрес для корреспонденции: Волкова Елена Николаевна — врач-анестезиолог-реаниматолог отделения реанимации и интенсивной терапии №5 Воронежской областной клинической больницы №1, ORCID: 0000-0001-8979-3454

394066 Воронеж, Московский пр-т, д. 151 Б

Ипполитова Людмила Ивановна — д.м.н., зав. кафедрой неонатологии и педиатрии Воронежского государственного медицинского университета им. Н. Н. Бурденко; гл. внештатный неонатолог Воронежской области, ORCID: 0000-0001-7076-0484

394036 Воронеж, ул. Студенческая, д. 10

(до 50 исследований) и Колмогорова–Уилка (более 50 исследований). Исследуемые подгруппы между собой сравнивали при помощи критерия *U* Манна–Уитни (до 2 подгрупп) или критерия Краскала–Уоллиса (3 подгруппы и более), апостериорные сравнения — с помощью критерия Данна с поправкой Холма. Теснота корреляции и ее направление между оцениваемыми показателями определяли с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Если прогнозировалось выявление определенных исходов, использовали метод анализа ROC-кривых. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Количественные данные описаны в абсолютных значениях и процентных долях; при ненормальном распределении количественных показателей в оцениваемых подгруппах описание осуществляли с использованием медианы (*Me*) и нижнего и верхнего квартилей [*Q1*; *Q3*]; при нормальном распределении — с применением среднего арифметического значения (*M*) и сигмальных отклонений ($\pm SD$).

Результаты и их обсуждение

Основным методом родоразрешения у исследуемых было кесарево сечение (71,3% случаев; $n=92$), в 37 случаях (28,7%) произошли вагинальные роды. По половому признаку дети распределялись практически поровну — 50,4% ($n=65$) мальчиков, 49,6%

($n=64$) девочек. Только 22 новорожденных были из многоплодных беременностей, остальные 107 — от одноплодных.

При оценке уровня TREC и KREC в зависимости от срока гестации отмечено, что с увеличением гестационного возраста происходит статистически значимое увеличение уровней TREC и KREC (табл. 1). Самые низкие значения наблюдаются у рожденных на 22–27 $\frac{6}{7}$ неделе. С 28-й недели оцениваемые показатели выходят на своего рода плато, согласно которому резких колебаний в медианных значениях не наблюдается.

Данные корреляционного анализа также подтвердили наличие статистически значимой связи между уровнями TREC/KREC и сроком гестации (рис. 1). Установлено, что при увеличении гестационного возраста на 1 нед уровень KREC повышается на $44,610 \cdot 10^5$ в 1 мкл ($r_{xy}=0,271$; $p < 0,001$), уровень TREC — на $27,274 \cdot 10^5$ в 1 мкл ($r_{xy}=0,264$; $p=0,002$).

Ввиду наличия прямых статистически значимых связей между гестационным возрастом и значениями KREC/TREC мы изучили связь между антропометрическими данными (рост, масса тела, окружность головы, окружность грудной клетки) и уровнями TREC/KREC (табл. 2). По данным линейного регрессионного анализа отмечены статистически значимые прямые слабые связи. Наличие

Таблица 1. Уровни TREC/KREC в зависимости от срока гестации

Table 1. Levels of TREC/KREC depending on gestation period

Показатель, $\cdot 10^5$ в 1 мкл (<i>Me</i> [<i>Q1</i> ; <i>Q3</i>])	Срок гестации				
	экстремально недоношенные (1-я группа)	глубоко- недоношенные (2-я группа)	умеренно недоношенные (3-я группа)	поздние недоношенные (4-я группа)	доношенные новорожденные (5-я группа)
Результат TREC	678,50 [577,75; 918,25]	1167,00 [893,00; 1328,75]	1143,50 [660,00; 1483,00]	1146,00 [841,00; 1411,00]	1122,50 [706,50; 1604,50]
			$p_{2-1}=0,002$ $p_{4-1}=0,005$ $p_{5-1}=0,015$		
Результат KREC	673,00 [434,75; 867,00]	1048,00 [705,00; 1490,00]	1163,00 [685,50; 2033,5]	1013,00 [671,00; 2176,00]	995,50 [482,25; 2351,50]
			$p_{2-1}=0,018$ $p_{3-1}=0,009$ $p_{4-1}=0,003$ $p_{5-1}=0,049$		

Таблица 2. Результаты корреляционного анализа взаимосвязи уровня KREC/TREC и антропометрических показателей

Table 2. The results of the correlation analysis of the relationship between the KREC/TREC result and anthropometric indicators

Показатель	Характеристика корреляции					
	r_{xy}		теснота связи по шкале Чеддока		p	
	KREC	TREC	KREC	TREC	KREC	TREC
Масса тела	$r_{xy}=0,208$	$r_{xy}=0,214$	Слабая	Слабая	$p=0,006$	$p=0,015$
Рост	$r_{xy}=0,256$	$r_{xy}=0,225$	Слабая	Слабая	$p < 0,001$	$p=0,010$
Окружность головы	$r_{xy}=0,181$	$r_{xy}=0,307$	Слабая	Умеренная	$p=0,018$	$p < 0,001$
Окружность грудной клетки	$r_{xy}=0,177$	$r_{xy}=0,258$	Слабая	Слабая	$p=0,021$	$p=0,003$

Таблица 3. Зависимость уровней KREC/TREC от пренатальных факторов
Table 3. Dependence of KREC/TREC levels on prenatal factors

Показатель, копий на 10 ⁵ в 1 мкл (Me [Q1; Q3])	Вагинальные роды	Кесарево сечение	Мужской пол	Женский пол	Многоплодная беременность	Одноплодная беременность
KREC	938,00 [6578,00; 1430,00]	909,00 [635,00; 1646,00]	1000,00 [600,50; 1624,5]	871,00 [643,75; 1465,25]	971,50 [701,00; 1346,00]	912,00 [597,75; 1594,75]
	$p=0,803$		$p=0,790$		$p=0,717$	
TREC	921,00 [659,00; 1376,00]	1080,00 [693,00; 1349,75]	1113,00 [659,00; 1398,00]	947,00 [711,75; 1339,50]	1408,50 [1207,75; 1527,50]	928,00 [656,50; 1235,50]
	$p=0,599$		$p=0,934$		$p<0,001^*$	

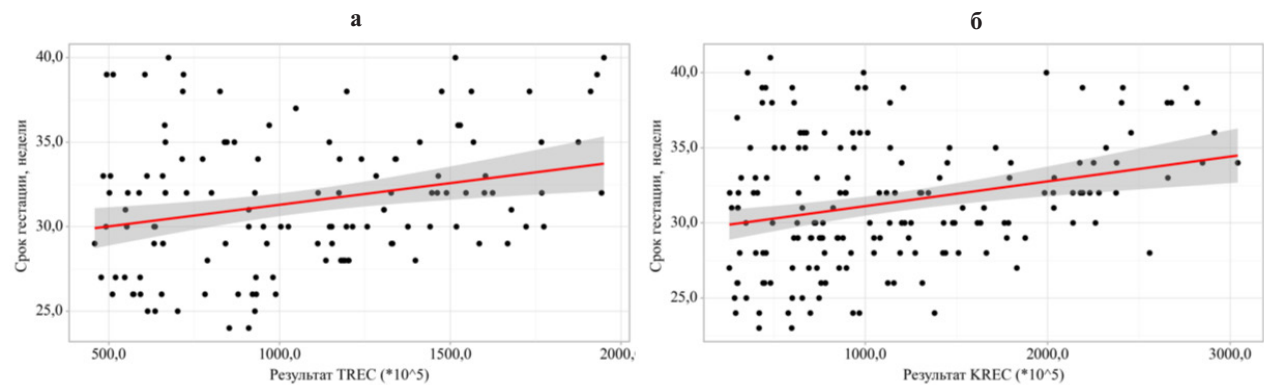


Рис. 1. График регрессионной функции, характеризующий зависимость результата TREC (а) и KREC (б) от срока гестации. На рис. 1–3 красная линия — линия регрессии; черные точки — наблюдения.
Fig. 1. Regression function graph characterizing the dependence of the result of KREC (a) and KREC (b) on the gestation period. In Fig. 1–3, the “red line” is the regression line and the “black dots” are observations.

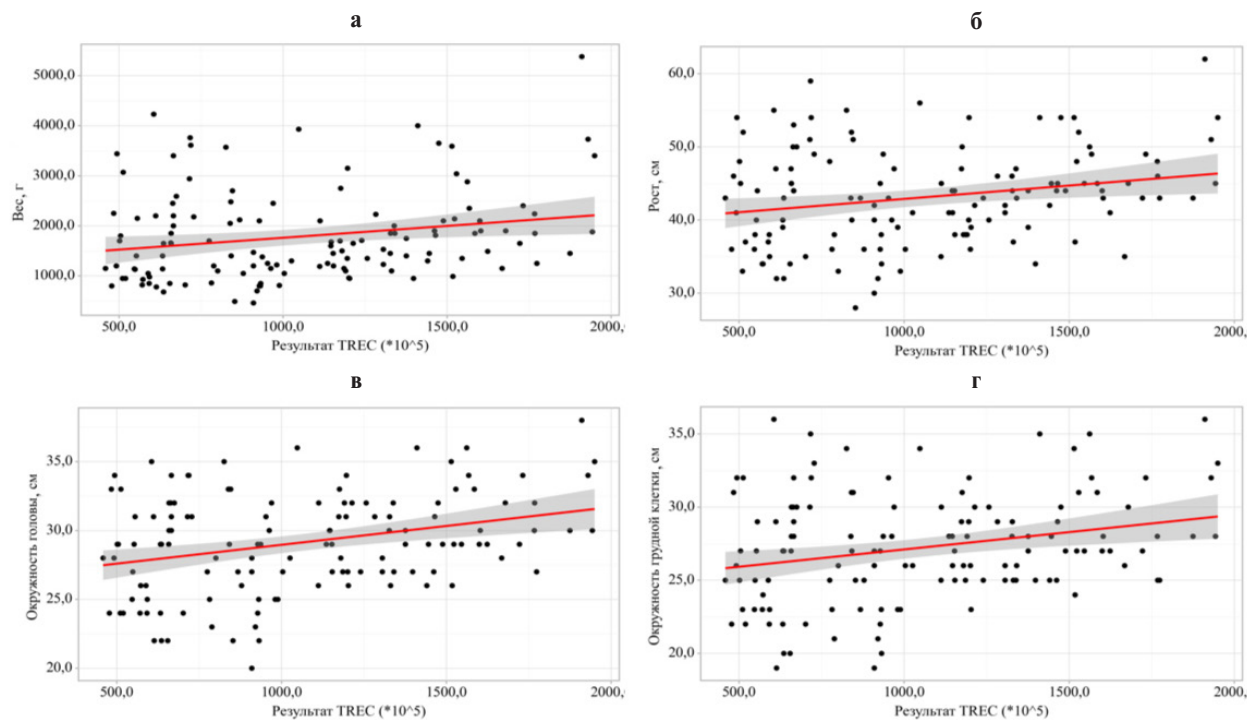


Рис. 2. График регрессионной функции, характеризующий зависимость значений TREC от массы тела (а), роста (б), окружности головы (в), окружности грудной клетки (г).
Fig. 2. Regression function graph characterizing the dependence of TREC values on weight (a), height (б), head circumference (в), chest circumference (г).

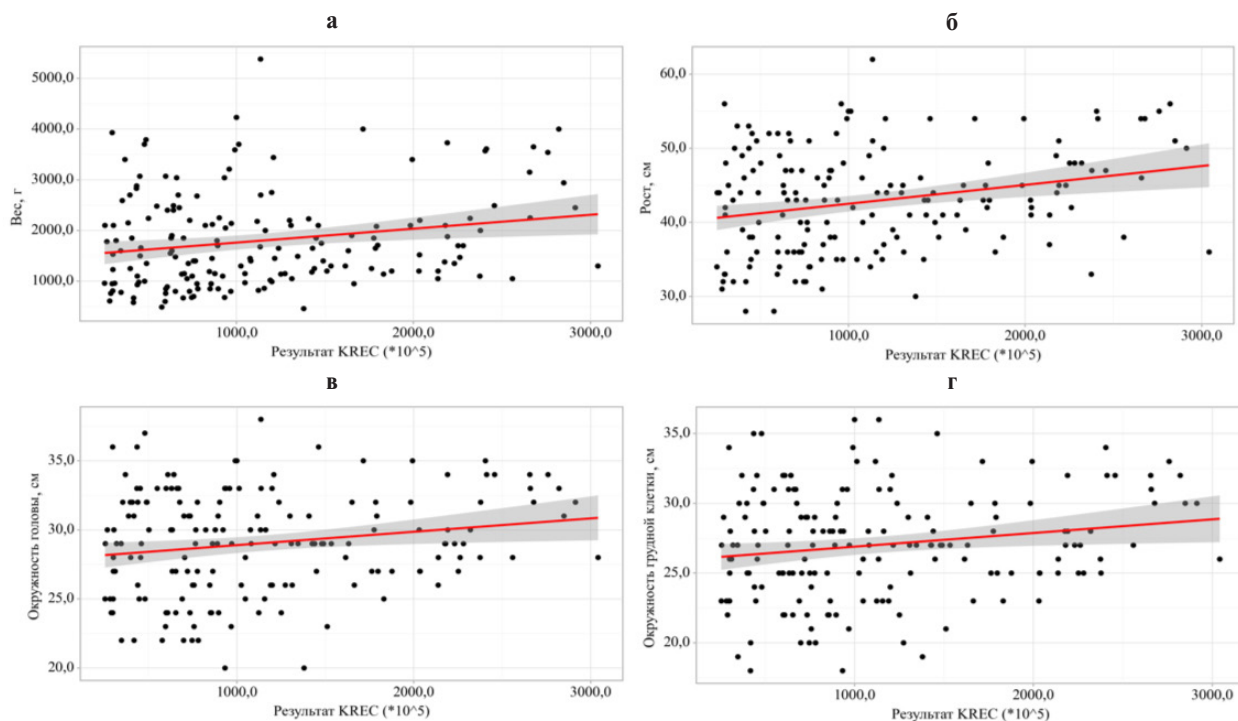


Рис. 3. График регрессионной функции, характеризующий зависимость значений KREC от веса (а), роста (б), окружности головы (в), окружности грудной клетки (г).

Fig. 3. Regression function graph characterizing the dependence of CREC values on weight (а), height (б), head circumference (в), chest circumference (г).

полученных взаимосвязей можно объяснить тем, что с увеличением гестационного возраста увеличивается общая масса тела, а соответственно, отмечается прирост основных клеточных структур по всем органам и системам организма, в том числе связанным с организацией работы иммунной системы. Графики регрессионных функций, характеризующие зависимость антропометрических данных от результата TREC/KREC, представлены на рис. 2 и 3.

Нами не отмечено статистически значимых различий между уровнями TREC/KREC и способом родоразрешения, а также статистически значимых связей между TREC/KREC и полом. У детей из многоплодных беременностей значения TREC были достоверно выше, чем у новорожденных от одноплодных беременностей (табл. 3).

Выводы

1. С увеличением срока гестации происходит статистически значимое повышение уровня TREC

и KREC, наименьшие показатели наблюдаются у недоношенных с экстремально низкой массой тела.

2. Иммунная система недоношенных новорожденных способна генерировать адекватное количество TREC и KREC. В период с 22-й по 28-ю неделю происходит наиболее интенсивный прирост оцениваемых показателей, после чего их уровень относительно стабилизируется.

3. Выявлены статистически значимые прямые слабые связи между уровнями TREC/KREC и антропометрическими данными (окружность головы, окружность грудной клетки, рост, масса тела).

4. У новорожденных из многоплодных беременностей показатели TREC достоверно выше, чем у детей, рожденных от одноплодных беременностей.

Выражение признательности. Коллективу отделения реанимации и интенсивной терапии №5 и коллективу медико-генетической консультации и клинико-диагностической лаборатории БУЗ ВО ВОКБ №1 г. Воронежа.

ЛИТЕРАТУРА (REFERENCES)

1. Marinova M., Georgyeva A., Yordanova V., Ivanov N., Atanasova V., Naumova E. et al. Implementation of TREC/KREC detection protocol for newborn SCID screening in Bulgaria: a pilot study. Cent Eur J Immunol 2022; 47(4): 339–349. DOI: 10.5114/ceji.2022.124396
2. Cheremokhin D., Shinwari K., Deryabina S., Bolkov M., Tuzankina I., Kudlay D. Analysis of the TREC and KREC

Levels in the Dried Blood Spots of Healthy Newborns with Different Gestational Ages and Weights. Acta Naturae 2022; 14(1): 101–108. DOI:10.32607/actanaturae.11501

3. Currier R., Puck J. SCID newborn screening: What we've learned Allergy. Clin Immunol 2021; 147(2): 417–426. DOI: 10.1016/j.jaci.2020.10.020

4. Korsunskiy I., Blyuss O., Gordukova M., Davydova N., Zaikin A., Zinovieva N. *et al.* Expanding TREC and KREC Utility in Primary Immunodeficiency Diseases Diagnosis. *Front Immunol* 2020; 11: 320. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00320
5. Dasouki M., Jabr A., Aldakheel G., Elbadaoui F., Alazami A., Al-Saud B. *Et al.* TREC and KREC profiling as a representative of thymus and bone marrow output in patients with various inborn errors of immunity. *Clin Exp Immunol* 2020; 202(1): 60–71. DOI: 10.1111/cei.13484
6. Remaschi G., Ricci S., Cortimiglia M., De Vitis E., Iannuzzi L., Boni L. *et al.* TREC and KREC in very preterm infants: reference values and effects of maternal and neonatal factors. *J Matern Fetal Neonatal* 2021; 34(23): 3946–3951. DOI: 10.1080/14767058.2019.1702951
7. Mauracher A., Pagliarulo F., Faes L., Vavassori S., Gingör I., Bachmann L. *et al.* Causes of low neonatal T-cell receptor excision circles: A systematic review. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2017; 5(5): 1457–1460. DOI: 0.1016/j.jaip.2017.02.009
8. Currier R., Puck J. SCID newborn screening: What we've learned. *J Allergy Clin Immunol* 2021; 147(2): 417–426. DOI: 10.1016/j.jaci.2020.10.020
9. Dasouki M., Jabr A., Aldakheel G., Elbadaoui F., Alazami A., Al-Saud B. *et al.* TREC and KREC profiling as a representative of thymus and bone marrow output in patients with various inborn errors of immunity. *Clin Exp Immunol* 2020; 202(1): 60–71. DOI: 10.1111/cei.13484
10. Mauracher A., Pagliarulo F., Faes L., Vavassori S., Gingör I., Bachmann L. *et al.* Causes of low neonatal T-cell receptor excision circles: A systematic review. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2017; 5(5): 1457–1460. DOI: 0.1016/j.jaip.2017.02.009
11. Kutlug S., Alpaslan M., Hancioglu G., Okan S., Yesilirmak D., Bulut H. *et al.* Multiplex PCR-Based Newborn Screening for Severe T and B-Cell Lymphopenia: The first Pilot Study in Turkey. *Sisli Etfal Hastan Tip Bul* 2021; 55(4): 551–559. DOI: 10.14744/SEMB.2020.09623
12. Gul K., Strand J., Pettersen R., Brun H., Abrahamsen T. T-cell Receptor Excision Circles in Newborns with Heart Defects. *Pediatr Cardiol* 2020; 41(4): 809–815. DOI: 10.1007/s00246-020-02317-y
13. Morton S., Schnur M., Kerper R., Young V., O'Connell A. Premature Infants Have Normal Maturation of the T Cell Receptor Repertoire at Term. *Front Immunol* 2022; 30:13:854414. DOI: 10.3389/fimmu.2022.854414

Поступила: 29.05.2024

Received on: 2024.05.29

Конфликт интересов:

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов и финансовой поддержки, о которых необходимо сообщить.

Conflict of interest:

The authors of this article confirmed the lack of conflict of interest and financial support, which should be reported.