

## ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКОСТІ КОПІЙ TREC ТА KREC ДЛЯ СКРИНІНГУ ВРОДЖЕНИХ ПОМИЛОК ІМУНІТЕТУ

Г.В. МАКУХ<sup>1,3</sup>, О.Р. БОЯРЧУК<sup>2</sup>, В.С. КРАВЕЦЬ<sup>1</sup>, Н.М. ЯРЕМА<sup>2</sup>, І.Є. ШИМАНСЬКА<sup>3</sup>,  
М.І. КІНАШ<sup>2</sup>, М.Я. ТИРКУС<sup>1,3</sup>, О.М. ШУЛЬГАЙ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Науковий медико-генетичний центр ЛеоГЕН, Львів, вул. Максимовича, 7 г, 79031, Україна

<sup>2</sup> Тернопільський Національний Медичний університет ім. І. Горбачевського, Тернопіль, вул. майдан Волі, 1, 46001, Україна

<sup>3</sup> ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України», Львів, вул. Лисенка, 31а, 79008, Україна

E-mail: makukh\_halyana@ukr.net

*T-клітинні рецепторні ексцизійні кільця (TREC) і каппа-делетуючі ексцизійні кільця (KREC) – це кільцеві молекули ДНК, які утворюються у процесі дозрівання T- та B-клітин імунної відповіді людини і можуть слугувати маркерами розвитку та кількості клітин імунної відповіді. Визначити кількості копій TREC та KREC у різному біологічному матеріалі та їх інформативність для скринінгу пацієнтів з вродженими помилками імунітету. Кількість молекул TREC та KREC визначали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі з подальшим аналізом кривих плавлення у матеріалі сухих плям новонароджених та банку ДНК пацієнтів з вродженими помилками імунітету. Визначення кількості копій TREC виявляє 100 % чутливість для виявлення синдрому Ніймеген та 84 % для атаксії-телангіектазії. Визначення показника KREC показало значно нижчу чутливість, 56 та 37 %, відповідно. Проведені обрахунки при виконанні 1500 тестів, вказують на показник специфічності визначення TREC на рівні 97,6 % для першої плями крові та 97,3 % після повторного забору. Наступним етапом роботи має стати виконання даного дослідження на великій вибірці здорових новонароджених (понад 10000) для встановлення граничних значень кількості копій TREC та KREC в нашій популяції. Визначення кількості копій TRECів, KRECів є швидким та доступним методом і може бути придатним для застосування в скринінгових програмах при умові реплікації отриманих результатів на більшій вибірці. Визначення кількості копій молекул TREC запропонованим методом засвідчило чутливість 93,6 % та специфічність 97,3 % для виявлення випадків вроджених помилок імунітету, які супроводжуються T-лімфопенією.*

**Ключові слова:** ПЛР в реальному часі (RT-PCR), аналіз кривих плавлення (melting analysis), T-клітинні рецепторні ексцизійні кільця (TREC), каппа-делетуючі ексцизійні кільця (KREC), вроджені помилки імунітету.

© ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ НАН УКРАЇНИ, 2023

**Вступ.** T-клітинні рецепторні ексцизійні кільця (TREC) і каппа-делетуючі ексцизійні кільця (KREC) – це кільцеві молекули ДНК, які утворюються у процесі дозрівання T- та B-клітин імунної відповіді людини. Ці кільцеві молекули ДНК є маркерами розвитку клітин імунної відповіді, а кількість TREC та KREC відображає кількість T- і B-клітин, відповідно. (Kor-sunskiy et al, 2020; Nourizadeh et al, 2018).

Показано ефективність визначення TREC та KREC для виявлення порушень імунної відповіді на доклінічній стадії із використанням мінімальної кількості біологічного матеріалу, в тому числі сухих плям крові (Nourizadeh et al, 2018). Вроджені помилки імунітету (ВПІ), або первинні імунodefіцити охоплюють гетерогенну групу захворювань, що спричинені генетичними дефектами імунної системи. Раннє виявлення ВПІ часто є проблематичним при наявності легких і малоспецифічних симптомів (Dasouki et al, 2020). Вимірювання TRECів та KRECів використовується для скринінгу тяжких комбінованих імунodefіцитів (ТКІД) та агамаглобулінемій, відповідно (Dasouki et al, 2020). Програми масового неонатального скринінгу ТКІД з допомогою вимірювання кількості TRECів та KRECів успішно працює в більшості Американських штатів, кількох регіонах Канади, Ізраїлі, Катарі. Більше того, така програма на стадії запуску в багатьох європейських країнах (Німеччина, Нідерланди, Швеція, Франція, Норвегія, Іспанія та ін) (King et al, 2018). Проте такої програми немає ще в дуже багатьох країнах, в тому числі в Україні. Дана тематика є актуальна для України, оскільки, для її популяції показана висока частота випадків синдрому Ніймегена, який разом з атаксією-телангіектазією належить до синдромів хромосомної нестабільності і проявляється

важким комбінованим імунodefіцитом (Boyarchuk et al, 2019; Chernyshova et al, 2015).

Є ціла низка методів для проведення аналізу кількості копій Т-клітинних рецепторних ексцизійних кілець (TRECів) і каппа-делетуючих ексцизійних кілець (KRECів), кожен із яких має свої переваги та обмеження (Blom M et al, 2018). В основі більшості із них визначення кількості копій Т-клітинних рецепторних ексцизійних кілець (TRECів) і каппа-делетуючих ексцизійних кілець (KRECів) лежить ПЛР в реальному часі.

Метою роботи є визначити кількості копій TREC та KREC у різному біологічному матеріалі та інформативність для скринінгу пацієнтів з вродженими помилками імунітету.

**Матеріали та методи.** *Опис методики.* Виділення та очистка ДНК з сухих плям крові. Першим етапом дослідження є виділення та очистка зразку ДНК. ДНК з клітин венозної крові виділяли методом сольової екстракції. Для виділення ДНК з сухих плям крові в межах пілотного проекту неонатального скринінгу на ПІД використовували набір для виділення нуклеїнових кислот ДНК-SorbB (AmplifySens) у наступній модифікації. У мікропробірку об'ємом 1,5 мл поміщали половину порізаної плями крові та заливали лізуючим розчином так, щоб рідина повністю покривала пляму (~350–450 мкл). Інкубували впродовж 1 год при 65 °С у термостаті. Клітини крові, що були просочені в папір, лізуються, а ДНК разом із іншим вмістом клітини потрапляє в розчин. Переносили рідину, що містить лізат клітин крові, не захопивши саму пляму крові, в чисту мікропробірку з попередньо приготованим сорбентом, об'ємом 25 мкл. Ретельно вортексували та інкубували впродовж 2 хв при кімнатній температурі. Вортексували та інкубували впродовж 7 хв при кімнатній температурі. ДНК, що була в розчині зв'язується з твердим сорбентом. Після цього зразок центрифугували при 12 000 грм (об/хв) та відбирали супернатант з допомогою дозатора, не зачіпаючи сорбента, що залишився в осаді. Вносили в пробірку з сорбентом 300 мкл Розчину для промивання 1, ретельно вортексували, центрифугували при 12 000 грм (об/хв) та зливали супернатант в контейнер для від-

ходів. Вносили в пробірку з сорбентом 500 мкл розчину для промивання 2, ретельно вортексували, центрифугували при 12 000 грм (об/хв) та зливали супернатант в контейнер для відходів. Крок промивання виконували двічі. Відбирали залишки розчину для промивання, не зачіпаючи сорбент, та інкубували при 65 °С вродовж 10 хв. Важливим є повністю позбутися спирту, що є одним з компонентів розчину для промивання 2 і може інгібувати ПЛР в наступних етапах. Вносили 75 мкл ТЕ-буферу, ретельно вортексували та інкубували при 65 °С вродовж 5 хв, періодично перемішуючи. Таким чином ДНК розчиняється в ТЕ-буфері. Центрифугували при 12 000 грм (об/хв) та переносили супернатант в чисті мікропробірки (на 0,6 чи 1,5 мл). Вимірювали концентрацію та оптичні характеристики ДНК на приладі DENOVIX.

Полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі. Після екстракції кількість молекул TREC та KREC визначали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі. Для одного зразка ДНК ми проводимо 3 реакції в трьох різних пробірках. Ці реакції відрізняються послідовністю пари праймерів. Використовували послідовності праймерів як описано (Stegantseva et al, 2018). Готували по три реакції для кожної проби, які містили 4 мкл 5 × HOT FIREPol EvaGreen Mix Plus (Solis, BioDie), по 1 мкл 10мМ кожного із пари праймерів та 3 мкл зразку ДНК (15–25 нг/мкл).

Використовували наступні послідовності праймерів для ампліфікації послідовностей ДНК TREC (F: CCATGCTGACACCTCTGG T, R: TC GTGAGAACGGTGAATGAAG), KREC (F: TC AGCGCCCATACGTTTCT, R: GTGAGGGA CACGCAGCC) та гена альбуміну у якості контрольного (F: TGAACAGGCGACCATGCTT, R: CTCTCCTTCTCAGAAAGTGTGCATAT).

Додавали кожен зразок ДНК в 3 пробірки для проведення трьох реакцій з різними парами праймерів. Для проведення аналізу виконували вимірювання серії розведень  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  плазмиди з відомою кількістю копій генів альбуміну, TRECів і KRECів, яка відображала лінійну залежність між кількістю копій гена та Ct (цикл виходу ПЛР продукту). В експериментах у якості стандартів в RT-ПЛР вико-

ристовували плазмиду з відомою кількістю копій ( $10^3$  і  $10^4$ ) *TREC* і *KREC* зважаючи, що більшість значень знаходиться в цих межах. Як позитивний контроль ми використовували ДНК-зразок особи з підтвердженим генетично (гомозигота за мутацією с.657del5 гена *NBN*) та імунологічно діагнозом вродженого комбінованого імунодефіциту. У якості негативного контролю NTC (No template control) використовували деіонізовану воду.

Проводили постановку ПЛР в реальному часі з наступним параметрами: активація полімерази (50 °C, 2 хв), початкова денатурація (95 °C, 10 хв) та 50 циклів при 95 °C, 15 с та 60 °C, 60 с. Аналіз кривих плавлення відбувався при температурі від 50 до 90 °C з кроком 0,1 °C (melting analysis). Дослідження проводили на приладі CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, BIO-RAD, USA.

$$\begin{aligned} \text{К-сть } TREC \text{ або } KREC &= \\ &= \frac{SQ \text{ mean}(TREC \text{ або } KREC) * 2 * 10^6}{SQ \text{ mean}(\text{Ген Альбуміну})} \end{aligned}$$

За результатами дослідження проводили кількісне обчислення молекул *TREC*ів та *KREC*ів за наданою формулою (Stegantseva et al, 2018).

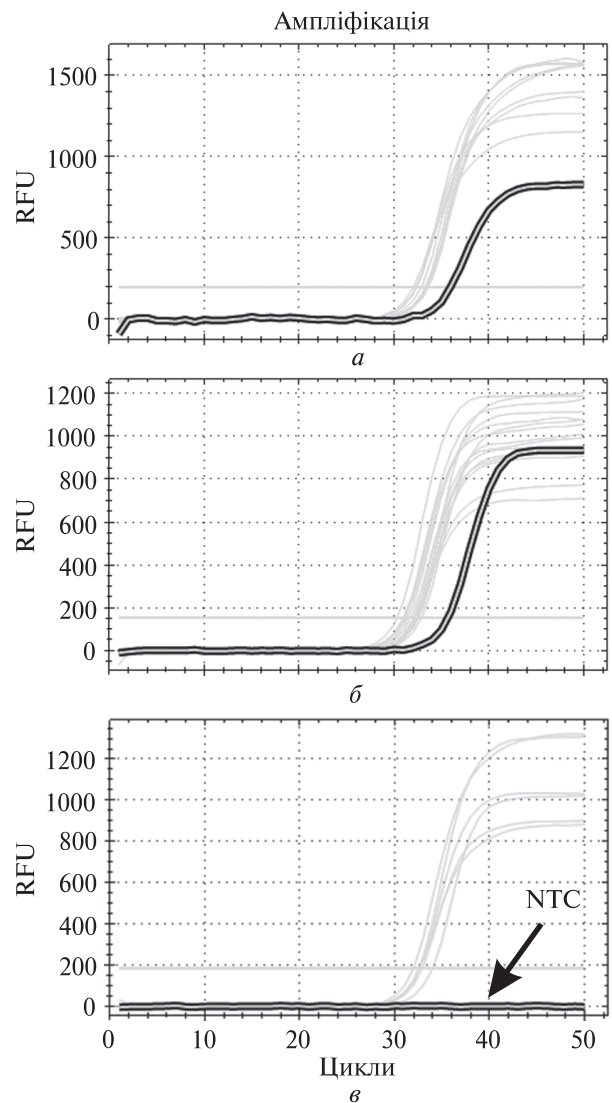
Розрахунок кількості копій *TREC* та *KREC* на 1 мільйон клітин передбачає, що в кожній клітині присутні дві копії контрольного гена альбуміну, а кількість ексцизійних молекул не може бути більше одиниці.

Були використані зразки сухих плям новонароджених Тернопільської області, які збиралися у межах виконання проекту.

Також були використані зразки банку ДНК пацієнтів з вродженими помилками імунітету: підтверджені генетично випадки синдрому Ніймегена (гомозиготи за мутацією с.657del5) та пацієнтів з атаксією-телангіектазією, які проявляються комбінованим імунодефіцитом.

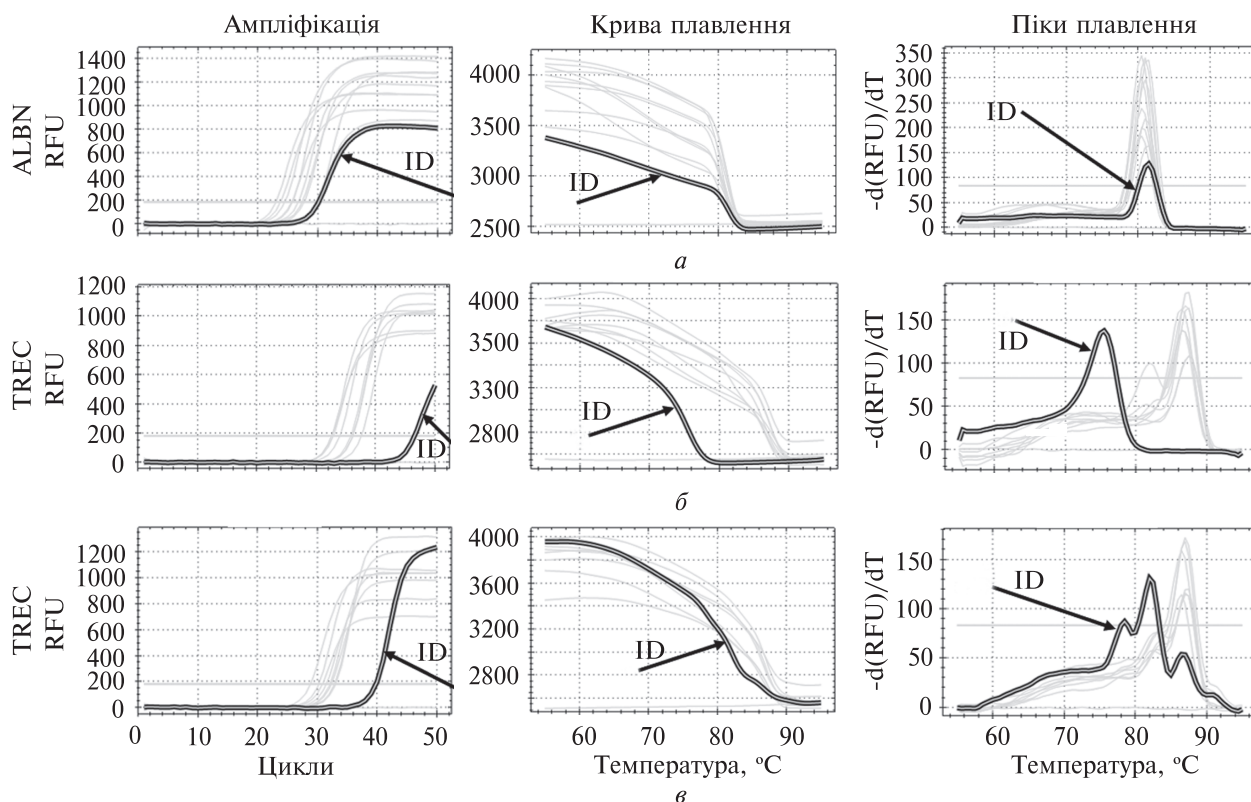
**Результати.** Запропонований метод був виконаний на 1500 зразках рандомних сухих плям крові новонароджених. Для визначення чутливості та специфічності методики проведено аналіз 25 зразків ДНК пацієнтів з верифікованим діагнозом атаксії-телангіектазії (Boyarchuk O, 2021) та 37 зразків ДНК пацієнтів з верифікованим діагнозом синдрому Ніймеген.

На рис. 1 зображено криві ампліфікації *TREC*ів (рис. 1, а) та *KREC*ів (рис. 1, б).



**Рис. 1.** Криві ампліфікації *TREC*ів (а) та *KREC*ів (б). Крива позитивного контролю (36-ий цикл) починає рости на 3–5 циклів пізніше, ніж більшість зразків ДНК (30–33-ий цикли). Крива негативного контролю не виявляє підйому NTC (в)

При аналізі кривих росту *TREC* та *KREC* видно, що крива позитивного контролю (36 цикл) починає рости на 3–5 циклів пізніше, ніж більшість зразків ДНК (30–33 цикли), що ми аналізуємо. Таким чином, зразки, криві ампліфікації, яких дуже близькі до NTC контролю є потенційними пацієнтами з низькими рівнями *TREC*ів та *KREC*ів й, відповідно, підозрами щодо імунодефіцитних станів. Зразки, які у яких



**Рис. 2.** Криві ампліфікації та піки плавлення ПЛР-фрагментів гена альбуміну (а), TRECів (б) та KRECів (в). ID – результат аналізу зразка з імунodefіцитом (низькі значення TREC та/або KREC). а – криві ампліфікації (ліворуч), криві т.з. «мелтингу» та один пік плавлення (праворуч) ПЛР продукту гена альбуміну; б – криві ампліфікації (ліворуч), криві плавлення з різними піками плавлення TRECів у різних зразках (праворуч); в – криві ампліфікації (ліворуч), криві мелтингу та різні піки плавлення фрагментів KRECів у різних зразках (праворуч). Зразок NTC негативного контролю реакції

значення порогового циклу ( $C_t$ ) TREC та KREC було вище 37 при значенні  $C_t$  для альбуміну (22–30) підлягали повторному дослідженню.

У зв'язку із низькою копійністю TREC та KREC, порівняно із генами ядерної ДНК для підвищення специфічності методу, проводили додатковий аналіз ПЛР продуктів методом плавлення. Дана методика базується на залежності температури плавлення фрагменту ДНК від її первинної структури. Таким чином, ми можемо віддиференціювати псевдонегативні результати та неспецифічні ПЛР продукти від цільових копій TREC, KREC. Етап аналізу плавлення («мелтинг») продуктів ПЛР проводили на приладі CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System. На рис. 2 зображено криві ампліфікації та плавлення ПЛР-фрагментів гена альбуміну (а), TRECів (б) та KRECів

(в), де відзначено зразок із ДНК особи із імунodefіцитним станом (низькими значеннями кільцевих молекул, які утворюються при дозріванні Т- та В-лімфоцитів).

Оцінка кривих плавлення свідчить, що піки кривих мелтингу альбуміну, TRECів та KRECів становить 81, 87,5 та 87 °С, відповідно. Криві мелтингу, що мають додаткові піки чи піки яких істотно відрізняються (>2 °С) можна вважати мелтингом іншого ПЛР-продукту, відмінного від цільового. При аналізі кривих мелтингу TRECів час від часу може траплятися крива з піком на 76 °С (як зображено на рис. 2, б). Зразки ДНК пацієнтів із нульовими значеннями TREC, NTC (вода чи зразки без внесення ДНК) можуть давати такого типу криві, що може бути зумовлено неспецифічним залишковим синтезом димерів прайме-

рів та їх видовженням під час ПЛР за відсутності цільової матриці. При аналізі KRECSів трапляються криві з дуже чітко вираженими 2-ма чи 3-ма піками, один з яких найчастіше – це 83 °С.

Дослідження виконано у вибірці 1500 зразків сухих плям новонароджених. Зразки, у яких встановлено відсутність продукту ПЛР фрагмента гена альбуміну, пізні цикли виходу для TREC та/або KREC, відмінні від визначених криві плавлення, підлягали повторній постановці з цієї ж пробки ДНК. А при відтворенні результатів – виділенню зразку ДНК з другої (цього ж бланку) плями крові (96 зразків, що становить 6,4 %). Якщо у повторному експерименті рівень молекул TREC та/або KREC є низьким (менше 1000 копій на 1 мільйон клітин), або продукт відсутній зовсім, при нормальному синтезі гена альбуміну ( $Ct < 33$ ), проводили забір повторної пляма крові (36 зразків, що становить 2,5 %). З повторної сухої плями крові проводили виділення ДНК і постановку реакції, як описано вище. Якщо результат скринінгу знову позитивний (кількість молекул TREC та/або KREC менше 1000, або продукт відсутній зовсім), то пацієнта скеровували на подальшу діагностику можливого імунodefіцитного стану. Одного такого пацієнта було виявлено за результатами скринінгу та скеровано на поглиблене обстеження. В результаті, у пацієнта не виявлено відхилень у клінічних та імунологічних показниках, проте встановлено, що пацієнт є гетерозиготним носієм мутації c.657del5 гена NBN, що і спричинило позитивний результат при скринінгу на вроджені помилки імунітету. Результати ви-

значення TREC та KREC у досліджуваних когортах наведено в таблиці.

У 21 з 25 пацієнтів (84 %) з атаксією-телангіектазією встановлено знижену кількість копій молекул TREC, які були менше 1000. Кількість копій KREC була нижче референтних значень у 15 пацієнтів (60 %).

В усіх 37 зразках ДНК пацієнтів з синдромом Ніймеген (100 %) встановлено дуже низькі ( $<10^2$ ) кількість копій молекул TREC і серед них у 16 (37 %) ця кількість прирівнювалася до нульового значення. Кількість копій KREC менше 1000 визначалась у 28 пацієнтів (75 %) з синдромом Ніймеген.

Таким чином, визначення кількості копій молекул TREC показує 100 % чутливість для виявлення синдрому Ніймеген та 84 % для атаксії-телангіектазії, разом – 93,6 %. Щодо специфічності, то за результатами обстеження 1500 сухих плям новонароджених встановлено специфічність на рівні 97,6 % (36 повторних заборів з 1500 зразків) для першої плями крові та 97,3 % після другої.

**Обговорення.** Частота вроджених помилок імунітету у світі варіює від 1 до 100 на 100 000 живонароджених (Schwartz et al, 2021). Частота тяжких комбінованих імунodefіцитів в США становить 1 на 100 000 (Schwartz et al, 2021). В Україні цей показник становить від 1 : 8 500 до 1 : 100 000 (Chernyshova et al, 2015). Беручи до уваги населення України при доступності трансплантації кісткового мозку в країні, багато життів може бути врятовано, вчасно виявляючи такі захворювання. Дана тематика є актуальна для України, де як і в інших слов'янських популяціях показана висока частота

#### Результати визначення TREC та KREC у досліджуваних когортах

Кількість на $10^6$ клітин	Сухі плями крові новонароджених, n = 1500	ДНК пацієнтів з атаксією-телангіектазією, n = 25	ДНК пацієнтів з синдромом Ніймеген, n = 37	p
	N (%)			
TRECS				
<1000	1	21 (84)	37 (100)	<0,001
>1000	1499	4 (16)	0	
KRECS				
<1000	1	15 (60)	28 (75)	<0,001
>1000	1499	10 (40)	9 (25)	

випадків синдрому Ніймегена. Синдром Ніймеген (Nijmegen breakage syndrome) – це спадкове захворювання з важким перебігом, що проявляється комбінованим Т- і В-клітинним імунodefіцитом, схильністю до онкологічних захворювань та чутливістю до іонізуючої радіації. Причиною виникнення патології є спадкові мутації гена *NBN* (Wegner R, 1999). В Україні відбувається успішна замісна імунотерапія пацієнтів з синдромом Ніймеген (Костюченко, 2012; Sharapova et al, 2021).

У ході проведеного дослідження нами модифіковано методику скринінгу імунodefіцитних станів шляхом вимірювання кількості копій TREC та KREC з використанням ПЛР в реальному часі. Запропонована методика відрізняється від описаних в літературі наявністю додаткового етапу – аналізу кривих плавлення продуктів ПЛР (Stegantseva et al, 2018; Blom et al, 2018; Shakerian et al, 2021). У зв'язку із дуже низькою копійністю TREC та KREC, порівняно із генами ядерної ДНК для підвищення специфічності методу, нами вперше запропоновано виконання додаткового етапу дослідження, а саме аналіз ПЛР продуктів методом плавлення. Дана методика базується на залежності температури плавлення фрагменту ДНК від її первинної структури (Allison B, 2016). Таким чином, ми можемо віддиференціювати псевдонегативні результати та неспецифічні ПЛР продукти від цільових копій TRECів, KRECів. Даний додатковий етап не вимагає інших реактивів чи обладнання, а проводиться безпосередньо на приладі для проведення ПЛР в реальному часі після закінчення ампліфікації.

На сьогоднішній час є доступні основні дві комерційні тест системи для скринінгу важких комбінованих імунodefіцитів (SCID) у новонароджених: EnLite™ Neonatal TREC Perkin-Elmer (США) та SCREEN-ID Immuno-IVD (Швеція). Використання комерційних наборів має в своїй перевазі уніфікацію, проте в цей же час є значно дорожчим. Деякі користувачі можуть обмежувати підхід до скринінгу лише до TREC, тоді як інші вирішують повідомляти як TREC, так і KREC. Виробники рекомендують проводити пілотні дослідження великих вибірок, щоб встановити граничні нормальні значення для конкретної популяції (Blom et

al, 2018; Shakerian et al, 2021). В Україні такі дослідження не проводилися, і даний проект є першим кроком для впровадження аналізу кільцеві молекули ДНК для масового скринінгу новонароджених на вроджені помилки імунітету. Вважаємо, що наступним етапом роботи має стати виконання даного дослідження на великій вибірці здорових новонароджених (понад 10000) для встановлення граничних значень кількості копій TREC та KREC в нашій популяції.

Дослідження TREC та KREC проведено у пацієнтів з комбінованими імунodefіцитними станами. Результати виконання вимірювання на зразках банку ДНК пацієнтів з підтвердженими випадками синдрому Ніймегена та пацієнтів з атаксією-телангіектазією, показали, що визначення кількості копій молекул TREC виявляє 100 % чутливість для виявлення синдрому Ніймеген та 84 % для атаксії-телангіектазії, в сумі – 93,6 %. Визначення показника KREC показало нижчу чутливість, 75 та 37 %, відповідно, що подібно до даних отриманих (Korsunskiy et al, 2020).

У літературі є повідомлення про результати дослідження TREC та KREC у пілотних та національних програмах скринінгу новонароджених, проте лише окремі стосуються саме діагностики вроджених помилок імунітету (Korsunskiy I, 2020). Автори показали доцільність аналізу TREC для встановлення діагнозу комбінований первинний імунodefіцитний стан та синдромальний імунodefіцитний стан (Korsunskiy I, 2020). Вроджені помилки імунітету – це велика група порушень, до якої відносять понад 400 нозологій, впливають на розвиток та/або функціонування імунної системи у людини (Picard, 2015). Дане дослідження дозволяє визначати серед них ті порушення, які зумовлені кількісними змінами показників імунної відповіді і має обмеження щодо скринінгу функціональних змін. Методика проточної цитометрії є стандартом для оцінки функції імунної системи та верифікації діагнозу імунodefіцитного стану (Knight V, 2019). Проте, ця методика є достатньо дорогавартісною і вимагає окремого обладнання. Визначення показників TREC і KREC є дешевшим і може додати діагностичної цінності у випадках підозри на вроджені помилки імунітету.

Для апробації методики були використані зразки геномної ДНК, виділеної з лейкоцитів периферійної крові пацієнтів різного віку (від двох місяців до дванадцяти років), залежно від часу звернення на проведення генетичного аналізу (Tretuyak et al, 2015).

Отримані дані свідчать на користь вимірювання в широкій практиці лише показника TREC. У переліку вроджених помилок імунітету є понад сотня рідних нозологій, кожна із яких є рідкісною (Dasouki et al, 2020). Припускаємо, що на жаль, багато пацієнтів з вродженими помилками імунітету помирають в ранньому віці при відсутності відповідного лікування чи підлягають пересадці кісткового мозку, і відповідно є малодоступні як контрольні позитивні зразки. Отримані результати вказують на чутливість запропонованого методу дослідження в цій доступній вибірці пацієнтів з вродженими помилками імунітету. Проведені нами обрахунки при виконанні 1500 тестів, вказують на показник специфічності на рівні 97,6 % для першої плями крові та 97,3 % після повторного забору. Показники специфічності методу при неонатальному скринінгу можуть бути сформовані лише за результатами багаторічного виконання програми (Blom et al, 2021).

Для подальшого впровадження вимірювання TREC, KREC у практику, вважаємо доцільним виконання методики на великій вибірці (понад 10000 зразків), одночасний епідеміологічний аналіз та визначення граничних нормальних значень кількості копій TREC та KREC в нашій популяції.

**Висновки.** Визначення кількості копій TRECів, KRECів є швидким та доступним методом для впровадження в скринінгових програмах. Визначення кількості копій молекул TREC запропонованим методом засвідчило чутливість 93,6 % та специфічність 97,3 % для виявлення випадків вроджених помилок імунітету, які супроводжуються Т-лімфопенією.

**Дотримання етичних стандартів.** Ця стаття не містить будь-яких досліджень з використанням людей і тварин як об'єктів.

**Конфлікт інтересів.** Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

**Фінансування.** Дослідження підтримане Міністерством охорони здоров'я України (дослідниць-

кий проект «Пілотне дослідження щодо скринінгу первинних імунodefіцитів новонароджених методом визначення Т- та В-лімфопенії за допомогою TRECs та KRECs»).

#### TRECS AND KRECS MEASUREMENT FOR SCREENING OF INBORN ERRORS OF IMMUNITY

H. Makukh, O. Boyarchuk, V. Kravets, N. Yarema, I. Shymanska, M. Kinash, M. Tyrkus, O. Shulhai

Scientific medical genetic center LeoGENE, LTD, Lviv, Maksymovycha 7 g, 79031, Ukraine  
I. Horbachevsky Ternopil National Medical University, Ternopil, maydan Voli, 1, 46001, Ukraine  
Institute of Hereditary Pathology of the Ukrainian National Academy of Medical Sciences, Lviv, Lysenka, 31 a, 79008, Ukraine

E-mail: makukh\_halya@ukr.net

T-cell receptor excision rings (TRECs) and kappa-deleting excision rings (KRECs) are circular DNA molecules that are formed during the maturation of human T- and B-cells and may serve as markers of immune response cell development. To determine the TREC and KREC quantities in different biological material and their informative value for the screening of patients with inborn errors of immunity. The analysis of TREC and KREC molecules was performed by real-time polymerase chain reaction followed by the analysis of melting curves in neonatal dry spots and DNA bank of patients with inborn errors of immunity. The proposed method showed that determining the TREC copies shows 100 % sensitivity for the detection of Nijmegen syndrome and 84 % for ataxia-telangiectasia. The determination of KREC showed considerably lower sensitivity, 75 and 37 %, respectively. The calculations performed with 1,500 tests indicate the specificity of 97.6 % for the first blood spot and 97.3 % after re-collection. It would be expedient to use the method on a cohort of over 10,000 samples to clarify the specificity and to set the TREC and KREC threshold levels in our population. Determining the number of TRECs and KRECs copies is a quick and affordable method for implementation in screening programs on condition of the replication of the obtained results using a larger cohort. The determination of the TREC quantity by the proposed method showed the sensitivity of 93.6 and the 97.6 % specificity for the detection of inborn errors of immunity accompanied by T-lymphopenia.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

Blom M, Bredius RM, Weijman G et al (2018) Introducing Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency (SCID) in the Dutch Neonatal

- Screening Program. *Int J Neonatal Screen* 4(4):10. <https://doi.org/10.3390/ijns4040040>.
- Blom, M; Bredius, RM; van der Burg M (2021) Future Perspectives of Newborn Screening for Inborn Errors of Immunity. *Int J Neonatal Screen* 7(4):13. <https://doi.org/10.3390/ijns7040074>.
- Boyarchuk O, Dmytrash L (2019) Clinical Manifestations in the Patients with Primary Immunodeficiencies: Data from One Regional Center. *Turkish J Immunol* 7(3):113–119. <https://doi.org/10.25002/tji.2019.1168>.
- Boyarchuk OR, Makukh HV, Kostyuchenko LV et al (2021) TREC/KREC levels in children with ataxia-telangiectasia. *Immunol Res* 69:436–444. <https://doi.org/10.1007/s12026-021-09216-1>.
- Chambliss AB, Resnick M, Petrides AK, Clarke WA, Marzinke MA (2016) Rapid screening for targeted genetic variants via high-resolution melting curve analysis. *Clin Chem Laboratory Med* 55(4):507–516. <https://doi.org/10.1515/cclm-2016-0603>.
- Chernyshova L., Bondarenko A., and Kostyuchenko L. (2015) Epidemiology of primary immunodeficiencies in Ukraine according to the register of patients. *Clin Pediatr* 7:16–23.
- Dasouki M, Jabr A, Dakheel A (2020) TREC and KREC profiling as a representative of thymus and bone marrow output in patients with various inborn errors of immunity. *Clinic Exp Immunol* 202(1):60–71. <https://doi.org/10.1111/cei.13484>.
- King JR, Hammarstrum L (2018) Newborn Screening for Primary Immunodeficiency Diseases: History, Current and Future Practice. *J Clin Immunol* 38:56–66. <https://doi.org/10.1007/s10875-017-0455-x>.
- Knight V (2019) The utility of flow cytometry for the diagnosis of primary immunodeficiencies. *Int J Lab Hematol* 41(S1):63–72. <https://doi.org/10.1111/ijlh.13010>.
- Korsunskiy I, Blyuss O, Gord M (2020) Expanding TREC and KREC Utility in Primary Immunodeficiency Diseases Diagnosis. *Front Immunol* 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00320>.
- Kostyuchenko L, Chernyshova L, Romanishyn I, Savchak I (2012) Experience of treating children with primary combined immunodeficiency and their survival in the conditions of Ukraine. *Sovremen Pediatr* (2):133–137.
- Nourizadeh L, Shakerian M, Borte S (2018) Newborn screening using TREC/KREC assay for severe T and B cell lymphopenia in Iran. *Scand J Immunol* 88(2):e12699. <https://doi.org/10.1111/sji.12699>.
- Nourizadeh M, Badalzadeh M, Fazlollahi R et al (2021) Investigating the Variation of TREC/KREC in Combined Immunodeficiencies. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 20(4):402–412. <https://doi.org/10.18502/ijaai.v20i4.6950>.
- Picard C, Al-Herz W, Bousfiha A et al (2015) Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the international union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency 2015. *J Clin Immunol* 35: 696–726. <https://doi.org/10.1007/s10875-015-0201-1>.
- Sharapova SO, Pashchenko OE, Bondarenko AV et al (2021) Geographical Distribution, Incidence, Malignancies, and Outcome of 136 Eastern Slavic Patients With Nijmegen Breakage Syndrome and NBN Founder Variant c. 657-661. *Front in Immunol* 11:602482. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.602482>.
- Schwartz RA (2021) Pediatric Severe Combined Immunodeficiency. *Medscape*.
- Stegantseva MV, Guryanova IS, Sakovich et al (2018) Method for quantitative determination of circular DNA molecules of T- and B-cell receptor, TREC and KREC, in peripheral blood using real-time PCR. *Euras Oncol J*.
- Tretyak B, Makukh H, Kitsera N et al (2015) The molecular genetic analysis of common ATM gene mutations among patients with ataxia-telangiectasia suspicion. *Fact Experim Evol Organism* 16:251–255.
- Wegner RD, Chrzanowska K, Sperling K, Stumm M (1999) Ataxia-telangiectasia variants (Nijmegen breakage syndrome). In: *Primary Immunodeficiency Diseases. A Molecular and Genetic Approach*.

Надійшла в редакцію 27.01.22  
Після доопрацювання 16.08.22  
Прийнята до друку 18.01.23