

УДК 616-079.3

Анализ уровней TREC и KREC в образцах сухой крови новорожденных разного гестационного возраста и веса

Д. А. Черемохин^{1,2*}, Х. Шинвари³, С. С. Дерябина^{1,2,3}, М. А. Болков^{1,3}, И. А. Тузанкина^{1,3},
Д. А. Кудлай^{4,5}

¹Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, 620049 Россия

²Клинико-диагностический центр «Охрана здоровья матери и ребенка», Екатеринбург, 620041 Россия

³Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, 620083 Россия

⁴Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, 119991 Россия

⁵ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, 115522 Россия

*E-mail: dimacheremokhin@gmail.com

Поступила в редакцию 04.07.2021

Принята к печати 12.01.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11501

РЕФЕРАТ Врожденные ошибки иммунитета можно выявлять, определяя кольцевые молекулы ДНК, образующиеся в ходе реаранжировки T- и B-клеточных рецепторов (TREC и KREC). Известно, что созревание и активация иммунной системы плода происходят постепенно в соответствии со сроками гестации, что указывает на важность определения параметров иммунитета у недоношенных детей в разные периоды развития. Представлены результаты определения числа копий TREC и KREC с помощью ПЦР в реальном времени у детей разного гестационного возраста с учетом веса и пола новорожденного. Определены 95% интервалы уровней TREC и KREC (выраженные в числе копий на 10^5 клеток) в различных возрастных группах. Обнаружено, что количество маркеров наивных лимфоцитов зависит от гестационной стадии развития в ранний неонатальный период.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА TREC, KREC, первичный иммунодефицит, врожденные ошибки иммунитета, тяжелая комбинированная иммунная недостаточность.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ВОИ – врожденные ошибки иммунитета; ПИД – первичный иммунодефицит; ТКИН – тяжелая комбинированная иммунная недостаточность.

ВВЕДЕНИЕ

Врожденные ошибки иммунитета (ВОИ), известные как первичные иммунодефициты, представляют собой группу генетически детерминированных заболеваний, которые проявляются в разнообразных дефектах развития или функции иммунной системы. В 2019 году Международным союзом иммунологических обществ (IUIS) классифицировано и перечислено более 450 отдельных нозологических ВОИ [1]. Благодаря успехам в понимании патогенетических основ и совершенствованию методов лабораторной диагностики удалось поставить клинический диагноз большому числу пациентов, подтвержденный результатами молекулярно-гене-

тических исследований. Распространенность ВОИ в настоящее время составляет 1.27 на 10 000 случаев [2, 3].

V(D)J-рекомбинация – одно из важнейших событий адекватно реагирующей иммунной системы, в процессе которой происходит образование разнообразных и функциональных репертуаров T- и B-клеточных рецепторов (TCR и BCR соответственно), а также антител. Эти процессы – важные этапы становления адаптивного иммунитета [4], в которых важную роль играют рекомбиназы RAG1 и RAG2, катализирующие процесс реаранжировки фрагментов ДНК генов T-клеточного рецептора при созревании T-клеток и в ходе развития

В-клеточного ответа на этапе подбора вариабельных цепей иммуноглобулинов [5].

Экцизионные рекомбинантные кольца Т-клеточного рецептора (T-cell Receptor Excision Circle, TREC) представляют собой кольцевые фрагменты ДНК, образующиеся при перестройке гена *TCR* в тимоцитах. TREC транспортируются в виде эписомальной ДНК из ядра в цитоплазму уже самостоятельных, хотя еще наивных Т-клеток, где они и остаются, не включаясь в процессы репликации во время митоза. В результате концентрация молекул TREC отражает содержание именно наивных Т-лимфоцитов, что, безусловно, является важным диагностическим критерием [6–8]. Во время реаранжировки гена *BCR* в наивных В-клетках образуются сходные с TREC дунитевые кольцевые ДНК – фрагменты рекомбинации генов каппа-цепей иммуноглобулинов (Каппа-deleting Recombination Excision Circle – KREC) [9]. KREC, образующийся в процессе реаранжировки интрона RSS-K в локусе *IGK*, используется для оценки неогенеза В-клеток из костного мозга [10, 11]. И TREC, и KREC нерепликативны и стабильны, их количество не изменяется во время пролиферации клеток, например, в процессе клональной экспансии [12, 13]. Как результат, определение количества молекул TREC и KREC широко используется для оценки состояния тимуса и костного мозга в различных физиологических и патологических состояниях. Значения уровней TREC и KREC в крови может служить критерием высокой диагностической значимости при различных иммунодефицитных состояниях. Разработан метод мультиплексной количественной ПЦР в реальном времени, позволяющий обнаруживать дефекты генерации Т- и В-клеток путем одновременного измерения количества копий TREC и KREC [14, 15]. Проведение массового скрининга на содержание TREC/KREC поможет отнести ребенка к группе риска по иммунологическому профилю уже в период новорожденности, что обеспечит повышение выживаемости детей с иммунозависимой патологией и снижение материальных затрат [16–18]. Этот анализ имеет и другие преимущества, включая высокую чувствительность, высокую пропускную способность, относительно низкую цену и возможность использования ДНК, выделенной из минимального объема образцов крови, собранных на Гатри-картах [6, 16, 19]. Это позволяет использовать молекулы TREC и KREC в качестве маркеров функциональности тимуса и костного мозга в различных клинических условиях, в частности, при врожденных ошибках иммунитета. Однако, чтобы говорить о характеристике пациентов с ВОИ, необходимо знать состояние данных маркеров им-

мунитета у здоровых индивидов, учитывая, в частности, половозрастные особенности каждого [20]. В настоящее время актуальным остается определение количественного содержания TREC и KREC в крови новорожденных.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Образцы сухой крови

В исследование было включено 80 образцов сухой крови, полученных от условно здоровых (отсутствие отклонений по результатам массового неонатального скрининга и факта переливания крови) детей (40 мальчиков и 40 девочек), собранных на фильтры Perkin Elmer 226 Guthrie cards (Perkin Elmer Health Sciences, США). Гатри-карты до использования хранились при комнатной температуре в лаборатории неонатального скрининга ГАУЗ СО Клинико-диагностический центр «Охрана здоровья матери и ребенка» (Екатеринбург).

Выделение ДНК

ДНК выделяли методом магнитной сорбции с помощью набора Magna Pure LC DNA Isolation Kit I из семи дисков сухой крови диаметром 3.2 мм (~20 мкл) на автоматической станции выделения нуклеиновых кислот Magna Pure LC 2.0 Instrument по стандартному протоколу DNA I Blood_Cells_High_Performance. Этап предварительной обработки образцов сухой крови включал лизис образцов вне прибора с использованием буфера, входящего в состав набора Magna Pure LC DNA Isolation Kit II (Tissue): к образцам сухой крови добавляли 260 мкл лизирующего буфера и 40 мкл протеиназы K, тщательно вортиксовали и инкубировали при 65°C в течение 20 мин, периодически перемешивая содержимое пробирок, после чего инкубировали при 95°C в течение 10 мин (встряхивали на вортексе каждые 5 мин), охлаждали образцы до комнатной температуры, экстракт переносили в «картридж для внесения образцов» и загружали на борт станции.

ПЦР-анализ TREC и KREC

Количественное определение молекул TREC и KREC основано на использовании метода ПЦР в режиме регистрации флуоресцентного сигнала в реальном времени. Исследование проводили с помощью набора реагентов «Иммуно-БиТ» (АБВ-тест, Россия) на приборе CFX96 (Bio-Rad, США) согласно инструкции производителя. Рассчитывали количество молекул TREC и KREC в 10^5 ядросодержащих клеток (лейкоцитов) относительно количества копий гена *ALB* по формуле:

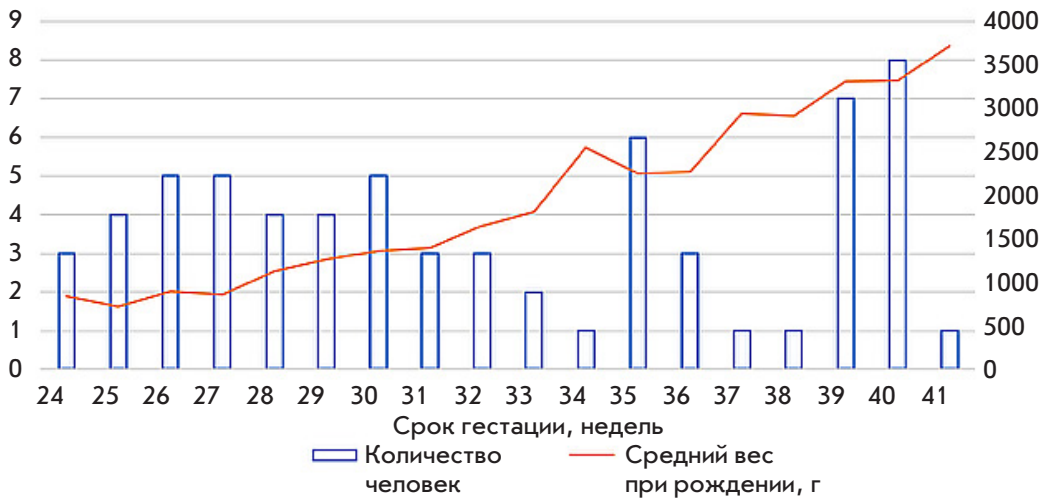


Рис. 1. Распределение группы условно здоровых детей по гестационному возрасту и весу при рождении

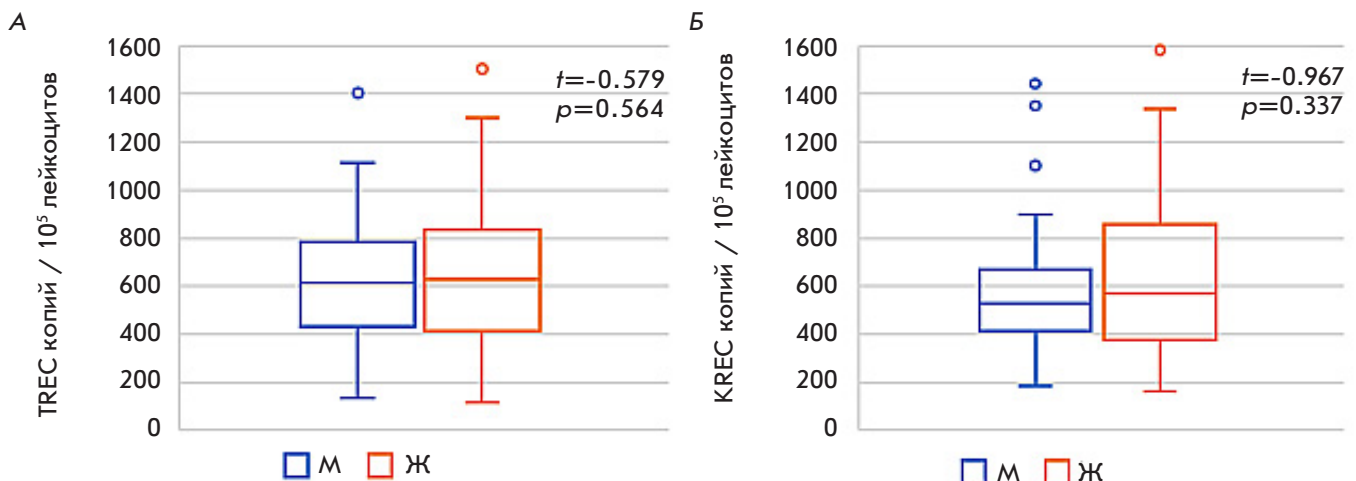


Рис. 2. Количество TREC (А) и KREC (Б) в группе условно здоровых девочек (Ж) и мальчиков (М). Примечание: здесь и далее – на диаграмме отображены: медиана, межквартильный (25-й и 75-й процентиля) и максимальный размах (минимум, максимум) переменной

$$TREC(KREC)_{копий} / (10^5 \text{ лейкоцитов}) = \frac{TREC(KREC)_{копий}}{ALB_{\frac{копий}{мл}}} \times 200000.$$

Если количество копий гена *ALB* было меньше 10^5 копий/мл, то результат считали невалидным, исследование повторяли, начиная с этапа выделения ДНК.

Статистические методы

Математическую обработку данных проводили с использованием пакетов статистических программ Microsoft Excel (Microsoft Office 365, США) и IBM SPSS Statistics, version 21 (IBM Corp., США).

Нормальность распределения данных оценивали с использованием теста Шапиро–Уилка, для описательных характеристик использовали среднее арифметическое и стандартную ошибку среднего ($m \pm SE$). В ходе анализа статистической значимости различий средних значений и наличия корреляционных взаимосвязей использовали Т-критерий Стьюдента для независимых выборок и коэффициент корреляции Пирсона (r) соответственно. Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В исследование вошли 80 условно здоровых детей (40 мальчиков и 40 девочек), рожденных в Свердловской области в 2020 году на разных сроках гестации (рис. 1).

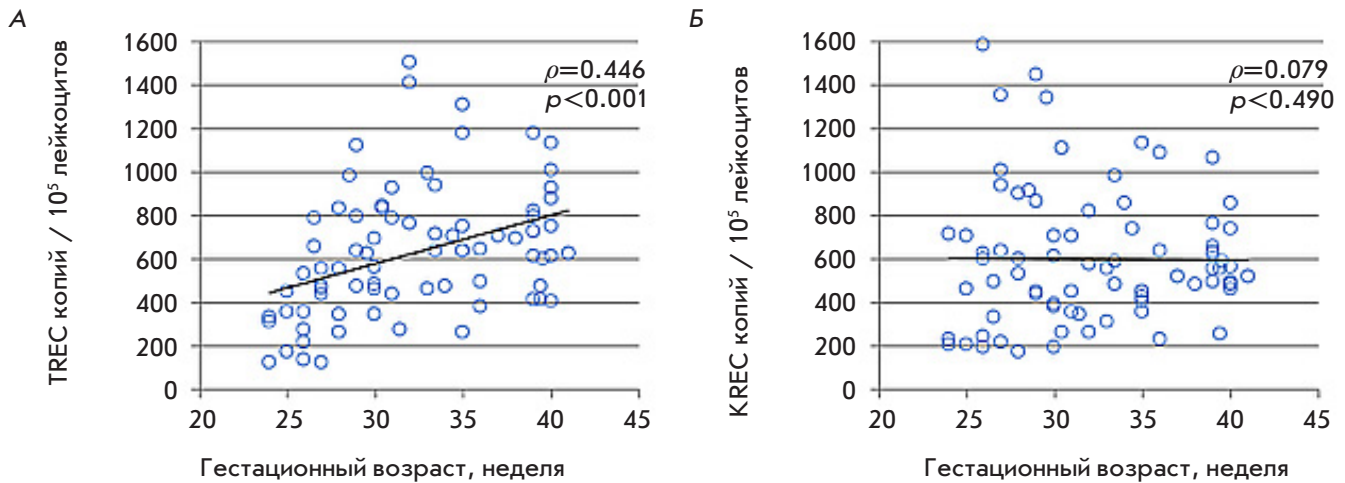


Рис. 3. Количество молекул TREC (А) и KREC (Б) в образцах сухой крови условно здоровых детей в зависимости от гестационного возраста в раннем неонатальном периоде

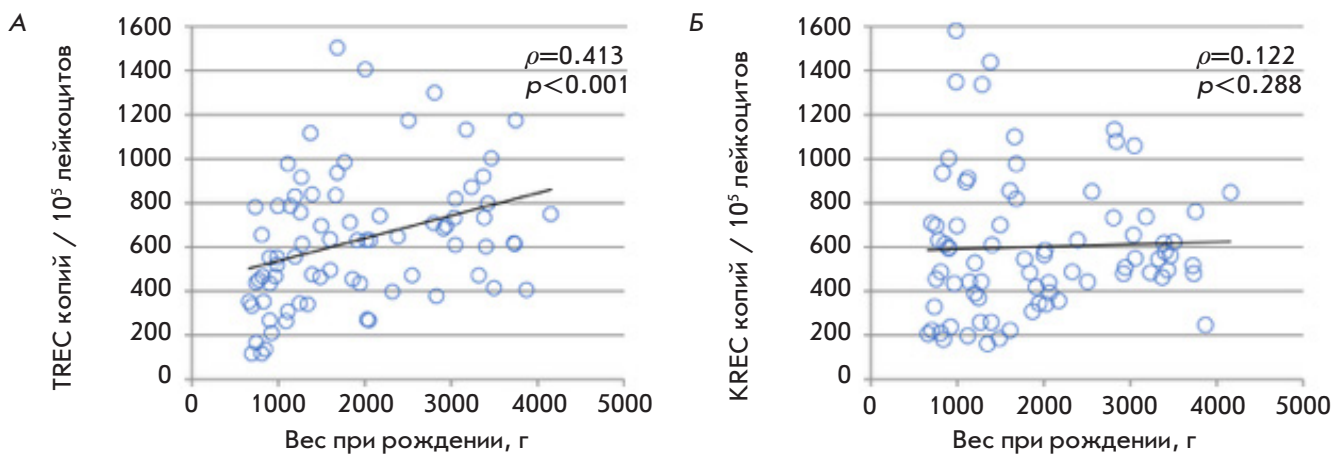


Рис. 4. Количество молекул TREC (А) и KREC (Б) в образцах сухой крови условно здоровых детей в зависимости от веса при рождении

Гендерные различия в содержании TREC и KREC

Анализ содержания молекул TREC и KREC в образцах сухой крови условно здоровых мальчиков и девочек не выявил статистически значимых различий (рис. 2), что соответствует результатам, полученным другими исследователями [21].

Количество TREC и KREC у недоношенных в разные гестационные сроки

На основе данных корреляционного анализа проведен статистический анализ с целью определения возможных вариаций количества молекул TREC и KREC, ассоциированных с разным гестационным возрастом новорожденных. Установлена статистически значимая положительная связь ($\rho = 0.446$ ($p < 0.001$)) между гестационным возрастом и количеством молекул TREC. Не обнаружено связей

между возрастом ребенка и количеством молекул KREC – маркера наивных В-клеток (рис. 3).

Количество TREC и KREC у недоношенных с разной массой при рождении

Проанализирована также зависимость между количественным содержанием маркеров наивных Т- и В-лимфоцитов и весом новорожденных. Естественно, что с увеличением срока беременности развивается и плод. В соответствии с гестационным периодом развиваются все внутренние органы и, в частности, тимус. Тимогенные ткани по мере их роста и дифференцировки обогащаются предшественниками лимфоцитов, причем теми, которые уже смогли пройти рубеж двойной рекогнизации – позитивной и негативной селекции. Это выражается в положительной корреляционной зависимо-

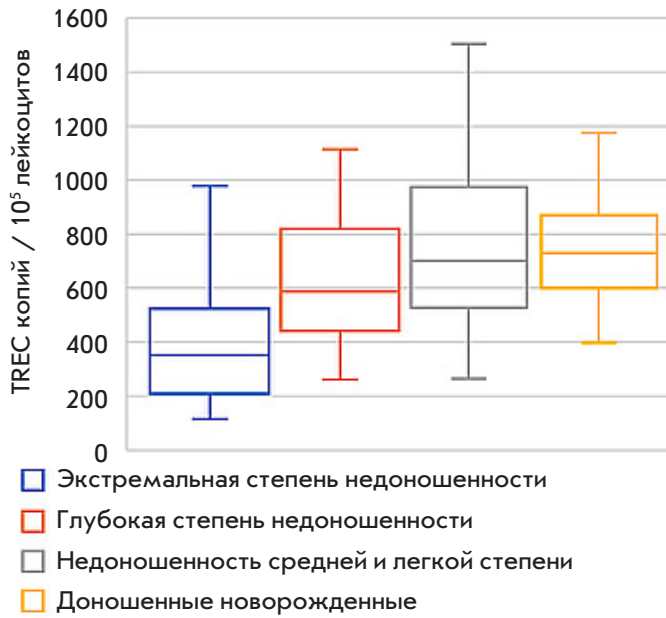


Рис. 5. Количество молекул TREC в сухих образцах крови условно здоровых детей разной степени доношенности в раннем неонатальном периоде

сти ($\rho = 0.413$ ($p < 0.001$)) между массой ребенка при рождении и количеством молекул TREC, содержащихся в сухих образцах крови новорожденных. При этом подобной корреляционной зависимости между массой ребенка при рождении и количеством молекул KREC не выявлено (рис. 4).

Анализ количества TREC и KREC у детей с разной степенью доношенности

Обнаружив положительную корреляцию между гестационным возрастом новорожденного и содер-

жанием молекул TREC, мы решили оценить возможность значимых различий в количестве молекул TREC у детей с разной степенью доношенности. С этой целью было решено разделить новорожденных на четыре группы по степени доношенности: дети с экстремальной степенью недоношенности (<28 недель), дети с тяжелой недоношенностью (28–32 недели), дети со средней и легкой степенью недоношенности (33–38 недель) и доношенные новорожденные (39–41 неделя) (рис. 5, табл. 1).

На рис. 5 видна тенденция к увеличению содержания маркера TREC во время роста и развития плода, однако статистически значимых отличий между степенью доношенности и содержанием TREC не выявлено. Поскольку не обнаружено статистически значимых зависимостей между количественным содержанием молекул KREC в сухих образцах крови с массой тела и гестационным возрастом детей с разной степенью доношенности, предложено не разделять детей на отдельные группы. В среднем в образце обнаруживалось 599.9 копий KREC на 10^5 лейкоцитов ($SE = 34.9$), однако для практического использования более важно иметь представление о нижних границах полученных референсных интервалов. Наименьшее значение KREC в группе условно здоровых детей составило 162.8 копий/ 10^5 лейкоцитов, нижняя граница 95% интервала составила 210.9 копии/ 10^5 лейкоцитов (результаты описательной статистики представлены в табл. 1).

ОБСУЖДЕНИЕ

К настоящему времени проведено множество исследований TREC/KREC в различных возрастных группах, начиная с младенцев и детей более старшего возраста и заканчивая анализом взрослого

Таблица 1. Количество молекул TREC и KREC (копий / 10^5 лейкоцитов) в сухих образцах крови условно здоровых детей разной степени доношенности в раннем неонатальном периоде

Степень доношенности	Среднее	95% интервал	Стандартная ошибка среднего	MIN	MAX
TREC					
Экстремальная недоношенность (<28 недель)	402.7	116.6–784.0	52.8	115.9	978.0
Глубокая недоношенность (28–32 недели)	611.1	271.0–917.9	52.5	261.4	1115.6
Недоношенность средней и легкой степени (33–38 недель)	776.1	378.2–1405.5	76.5	263.6	1505.6
Доношенные (39–41 неделя)	723.9	406.1–1133.2	52.2	398.1	1174.0
KREC					
	599.9	210.9–1103.5	34.9	162.8	1584.0

населения. Основная цель большинства работ состояла в оценке изменений функциональной активности «наивного» иммунитета по мере взросления и старения организма [21–23]. Согласно результатам Douek и соавт., количество молекул TREC и KREC в образцах крови детей старшего возраста и взрослых было соответственно в 10 и 100 раз ниже, чем у здоровых доношенных новорожденных. Эти данные указывают на снижение тимической эффективности, опосредованной возрастным уменьшением функционально активной ткани тимуса [24]. Изучение пациентов с комбинированным переменным иммунодефицитом (ОВИИ) и здоровых доноров контрольной группы выявило стабильность уровня KREC, тогда как уровни TREC снижались с увеличением возраста как у пациентов с иммунозависимой патологией, так и у лиц контрольной группы, что доказывает независимость снижения уровня маркеров наивных Т-клеток от заболевания и зависимость от возраста [23, 25–27]. Количество TREC и KREC может также снижаться в результате разбавления. В ходе активного иммунного ответа на этапе клеточной экспансии функционально активных клонов лимфоцитов происходит репликация только внутриядерной ДНК. Так как TREC и KREC являются эпизомными молекулами, они остаются лишь в клетке-основателе, что и приводит к относительному снижению показателей [28]. Несмотря на многочисленные данные о возрастных изменениях Т- и В-клеточного иммунитета, не менее важно исследовать динамику содержания молекул TREC и KREC не только в раннем неонатальном периоде, но и на разных этапах развития плода. Это позволит оценить состояние иммунитета на разных «срезах» эмбрионального развития человека.

Основная цель нашей работы состояла в определении содержания молекул TREC и KREC в крови детей, родившихся в разные гестационные сроки. Однако для большей информативности было решено проанализировать гендерные различия в содержании маркеров наивных иммунокомпетентных клеток. Нами не выявлено значимых различий в содержании молекул TREC и KREC в образцах сухой крови мальчиков и девочек, что соответствует результатам, полученным другими исследователями [29, 30]. С другой стороны, в некоторых работах представлены результаты, указывающие на более высокое содержание TREC в крови лиц женского пола [31–33].

К настоящему времени опубликованы данные о взаимозависимости между весом ребенка и количеством TREC [34–36]. Недавно проведенное исследование образцов сухой крови недоношенных ново-

рожденных выявило положительную связь между количеством копий TREC и KREC и массой тела при рождении [5]. В другой работе изучали зависимость не только между весом, но и сроками гестации на момент рождения. По результатам проведенного анализа новорожденных разделили на три группы – с очень низкой, низкой и нормальной массой тела при рождении [32]. Опубликованы также данные о существовании связи между состоянием иммунитета и ростом взрослых индивидов [36, 37].

Развитие всех внутренних органов, в частности тимуса, происходит в соответствии с гестационным периодом. Тимогенные ткани по мере роста и дифференцировки обогащаются предшественниками лимфоцитов, причем теми, которые уже смогли пройти рубеж двойного отбора – позитивной и негативной селекции. Это выражается в положительной корреляционной зависимости ($\rho = 0.413$ ($p < 0.001$)) между массой ребенка при рождении и количеством молекул TREC, содержащихся в образцах сухой крови новорожденных [21, 26, 27].

Мы также проанализировали зависимость между количественным содержанием маркеров В-лимфоцитов, гестационным возрастом и массой новорожденного, однако связь этих показателей не была статистически значимой. Эти результаты показывают, что количество KREC в сухом пятне крови ребенка с гестационным возрастом не менее 28 недель, соответствующее нормативным значениям, служит показателем правильного прохождения процесса созревания В-клеток в костном мозге. Известно, что пре-В-лимфоциты обнаруживаются в печени плода на 8 неделе беременности, где они уже начинают экспрессировать на своей поверхности молекулы иммуноглобулина класса М. Это свидетельствует о том, что уже на столь ранних этапах развития человека система гуморальных параметров иммунитета функционирует с высокой эффективностью, что, вероятно, проявляется в относительно высоком уровне молекул KREC, обнаруживаемых в сухих пятнах крови у детей, рожденных в разные сроки гестации [23, 27].

Врожденные ошибки иммунитета обычно не диагностируются до тех пор, пока не появятся клинические признаки, в основном такие, как хронические и рецидивирующие инфекции. Для постановки диагноза первичный иммунодефицит используют общий анализ крови, фенотипирование лимфоцитов, определение различных классов иммуноглобулинов, функциональные тесты иммунокомпетентных клеток и генетический анализ как возможность подтверждающей диагностики. Наиболее перспективными и важными в настоящее время являются функциональные тесты иммунокомпетент-

ных клеток и генетический анализ. Анализ TREC и KREC – это быстрый и чувствительный инструмент для скрининга ТКИН и диагностики других ВОИ, особенно потому, что для выделения ДНК требуется лишь небольшой объем образца, что снижает риск причинения вреда младенцам. Зачастую непреодолимым барьером в лабораторной диагностике является невозможность взятия необходимого количества биологического материала. Свой вклад в разброс пороговых значений при осуществлении программ скрининга новорожденных в разных странах вносит использование разных протоколов анализа TREC и KREC в разных лабораториях. Свою роль могут играть также популяционные генетические различия. Поэтому полученные нами результаты определения интервалов TREC и KREC, учитывающих половозрастные характеристики пациентов, имеют немаловажное значение для диагностики ВОИ у детей.

Первичные иммунодефициты все еще продолжают рассматриваться как редкие болезни, хотя они и не относятся к орфанным. В 2019 году в России было зарегистрировано 2798 пациентов с врожденными ошибками иммунитета, из которых 60% – дети [38]. Внедрение программ массового скрининга новорожденных на основе определения TREC и KREC позволит значительно увеличить группу риска по ТКИН и другим тяжелым первичным иммунодефицитам, приводящим к летальным исходам в раннем возрасте. Ранняя диагностика обеспечит возможность своевременного применения патогенетически обоснованной терапии, включая радикальные трансплантационные технологии, в период окна возможностей до появления тяжелых клинических проявлений, что приведет не только к улучшению качества жизни пациентов с такой патологией и сохранению их жизни, но и позволит сократить фи-

нансово-экономические затраты на лечение и жизнеобеспечение пациентов [39–45].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты наших исследований позволяют утверждать, что срок беременности следует рассматривать как немаловажный фактор, влияющий на количественное содержание молекул TREC и KREC. Для интерпретации результатов скрининга новорожденных мы рассчитали референсные диапазоны этих параметров для разных гестационных групп. Кроме того, это позволит осуществлять мониторинг иммунных изменений Т- и В-клеток при проведении иммуноотропной терапии, включая посттрансплантационное наблюдение после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

Ранняя диагностика и лечение важны при всех формах ВОИ. Использование метода количественной оценки маркеров Т- и В-клеточного иммунитета (TREC и KREC) сделало возможным разработку скрининговых программ по выявлению ТКИН и агаммаглобулинемии во многих странах мира. Однако остаются неохваченными другие группы ПИД, такие, как иммунодефициты с нормальным количеством периферических Т- и В-клеток, дефекты количества и функции фагоцитов, дефицит комплемента и заболевания, связанные с иммунной дисрегуляцией. Необходим дальнейший поиск эффективных маркеров патологии, разработка стратегий клеточной, генетической и функциональной диагностики, адаптация их к массовым программам диагностики различных первичных иммунодефицитов. ●

Данное исследование проведено в рамках проекта АААА-А21-121012090091-6 на базе Института иммунологии и физиологии УрО РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tangye S.G., Al-Herz W., Bousfiha A., Chatila T., Cunningham-Rundles C., Etzioni A., Franco J.L., Holland S.M., Klein C., Morio T., et al. // *J. Clin. Immunol.* 2020. V. 40. P. 24–64.
2. Rubin Z., Pappalardo A., Schwartz A., Antoon J.W. // *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 2018. V. 6. P. 1705–1710.
3. Modell V., Knaus M., Modell F., Roifman C., Orange J., Notarangelo L.D. // *Immunol. Res.* 2014. V. 60. P. 132–144.
4. Jung D., Alt F.W. // *Cell.* 2004. V. 116. P. 299–311.
5. Ye P., Kirschner D.E. // *Crit. Rev. Immunol.* 2002. V. 22. № 5–6. P. 483–497.
6. Nourizadeh M., Borte S., Fazlollahi M.R., Hammarstrom L., Pourpak Z. // *Iran J. Allergy Asthma Immunol.* 2015. V. 14. № 4. P. 457–461.
7. Ye P., Kirschner D.E. // *J. Immunol.* 2002. V. 168. P. 4968–4979.
8. Hazenberg M.D., Verschuren M.C., Hamann D., Miedema F., van Dongen J.J. // *J. Mol. Med.* 2001. V. 79. P. 631–640.
9. Barbaro M., Ohlsson A., Borte S., Jonsson S., Zetterstrom R.H., King J., Winiarski J., von Döbeln U., Hammarström L. // *J. Clin. Immunol.* 2017. V. 37. P. 51–60.
10. Siminovitsh K.A., Bakhshi A., Goldman P., Korsmeyer S.J. // *Nature.* 1985. V. 316. P. 260–262.
11. van Zelm M.C., van der Burg M., Langerak A.W., van Dongen J.J. // *Front. Immunol.* 2011. V. 2. P. 12.
12. van Zelm M.C., Szczepanski T., van der Burg M., van Dongen J.J. // *J. Exp. Med.* 2007. V. 204. P. 645–655.
13. Kong F.K., Chen C.L., Six A., Hockett R.D., Cooper M.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. P. 1536–1540.
14. Livak F., Schatz D.G. // *Mol. Cell. Biol.* 1996. V. 16. P. 609–618.
15. Borte S., von Döbeln U., Fasth A., Wang N., Janzi M., Winiarski J. // *Blood.* 2012. V. 119. № 11. P. 2552–2555.
16. Puck J.M., Group SNSW. // *J. Clin. Immunol.* 2007. V. 120. № 4. P. 760–768.

17. Puck J.M. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2012. V. 129. № 3. P. 607–616.
18. Корсунский И.А., Кудлай Д.А., Продеус А.П., Щербина А.Ю., Румянцев А.Г. // *Педиатрия.* 2020. Т. 99. № 2. С. 8–15.
19. King J.R., Hammarstrom L. // *J. Clin. Immunol.* 2018. V. 38. № 1. P. 56–66.
20. Claustres M., Kozich V., Dequeker E., Fowler B., Hehir-Kwa J.Y., Miller K. // *Eur. J. Hum. Genet.* 2014. V. 22. № 2. P. 160–170.
21. de Felipe B., Olbrich P., Lucenas J.M., Delgado-Pecellin C., Pavon-Delgado A., Marquez J. // *Pediatr. Allergy Immunol.* 2016. V. 27. № 1. P. 70–77.
22. Castermans E., Morrhaye G., Marchand S., Martens H., Moutschen M., Geenen V. // *Revue Med. de Liege.* 2007. V. 62. № 12. P. 725–729.
23. Geenen V., Poulin J.F., Dion M.L., Martens H., Castermans E., Hansenne I. // *J. Endocrinol.* 2003. V. 176. № 3. P. 305–311.
24. Sempowski G.D., Gooding M.E., Liao H.X., Le P.T., Haynes B.F. // *Mol. Immunol.* 2002. V. 38. № 11. P. 841–848.
25. Douek D.C., McFarland R.D., Keiser P.H., Gage E.A., Massey J.M., Haynes B.F. // *Nature.* 1998. V. 396. № 6712. P. 690–695.
26. Olbrich P., de Felipe B., Delgado-Pecellin C., Rodero R., Rojas P., Aguayo J. // *Ann. Pediatr. (Barc.).* 2014. V. 81. № 5. P. 310–317.
27. Moro-Garcia M.A., Alonso-Arias R., Lopez-Larrea C. // *Curr. Genomics.* 2012. V. 13. № 8. P. 589–602.
28. Palmer S., Albergante L., Blackburn C.C., Newman T.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018. V. 115. № 8. P. 1883–1888.
29. Goronzy J.J., Shao L., Weyand C.M. // *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 2010. V. 36. № 2. P. 297–310.
30. Sottini A., Serana F., Bertoli D., Chiarini M., Valotti M., Vaglio Tessoro M. // *J. Vis. Exp.* 2016. V. 6. P. 94.
31. Shakerian L., Pourpak Z., Shamlou S. // *Iran J. Allergy Asthma Immunol.* 2019. V. 18. № 2. P. 143–152.
32. Yoshida K., Nakashima E., Kubo Y., Yamaoka M., Kajimura J., Kyoizumi S. // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 3. e91985.
33. Rechavi E., Lev A., Simon A.J., Stauber T., Daas S., Saraf-Levy T. // *Front. Immunol.* 2017. V. 8. P. 1448.
34. Serana F., Chiarini M., Zanotti C., Sottini A., Bertoli D., Bosio A. // *J. Transl. Med.* 2013. V. 11. P. 119.
35. Raqib R., Alam D.S., Sarker P., Ahmad S.M., Ara G., Yunus M. // *Am. J. Clin. Nutr.* 2007. V. 85. № 3. P. 845–852.
36. Pawlowski B., Nowak J., Borkowska B., Augustyniak D., Drulis-Kawa Z. // *Proc. Biol. Sci.* 2017. V. 284. P. 1859.
37. Krams I.A., Skrinda I., Kecko S., Moore F.R., Krama T., Kaasik A. // *Sci. Rep.* 2014. V. 4. P. 6223.
38. Mukhina A.A., Kuzmenko N., Rodina Y.A., Kondratenko I.V., Bologov A.A., Latysheva T.V., Prodeus A.P., Pampura A.N., Balashov D.N., Ilyina N.I., et al. // *Front. Immunol.* 2020. V. 11. P. 1491.
39. Buckley R.H., Schiff S.E., Schiff R.I., Markert L., Williams L.W., Roberts J.L. // *N. Engl. J. Med.* 1999. V. 340. P. 508–516.
40. Castagnoli R., Delmonte O.M., Calzoni E., Notarangelo L.D. // *Front. Pediatr.* 2019. V. 7. P. 295.
41. Pai S.Y., Logan B.R., Griffith L.M., Buckley R.H., Parrott R.E., Dvorak C.C. // *N. Engl. J. Med.* 2014. V. 371. P. 434–446.
42. Gardulf A., Winiarski J., Thorin M., Heibert Arnlin M., von Döbeln U., Hammarstrom L. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2017. V. 139. P. 1713–1716.
43. Bessey A., Chilcott J., Leaviss J., de la Cruz C., Wong R. // *Int. J. Neonat. Screen.* 2019. V. 5. P. 28.
44. Thomas C., Durand-Zaleski I., Frenkiel J., Mirallie S., Leger A., Cheillan D. // *Clin. Immunol.* 2019. V. 202. P. 33–39.
45. Козлов В.А., Тихонова Е.П., Савченко А.А., Кудрявцев И.В., Андропова Н.В., Анисимова Е.Н., Головкин А.С., Демина Д.В., Здзитовецкий Д.Э., Калинина Ю.С. и др. *Клиническая иммунология. Практическое пособие для инфекционистов.* Красноярск: Поликор, 2021. 563 с.