

## ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ МОЛЕКУЛ HLA-G И HLA-DR НА ЛИМФОЦИТАХ ЖЕНЩИН И ИХ ДЕТЕЙ С СЕПТАЛЬНЫМИ ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ СЕРДЦА

Шабалдин А.В., Сеницкая А.В., Шмелевич С.А., Гришачева Е.О.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»,  
г. Кемерово, Россия

**Резюме.** Цель исследования — изучение особенностей экспрессии молекул HLA-G и HLA-DR на лимфоцитах женщин и их детей с ВПС под воздействием аллогенных и аутогенных сывороток крови.

Обследовано 38 женщин и их детей со спорадическими септальными врожденными пороками сердца (основная группа). Группами сравнения были: 21 женщина и их дети без ВПС (первая группа сравнения), а также 17 условно здоровых мужчин (вторая группа сравнения). Всего обследовано 115 индивидуумов. Выполнялись исследования по методологии «cross-match» на проточном цитофлуориметре CytoFlex (Beckman Coulter, США). Оценивалось влияние аутогенных и аллогенных сывороток крови на изменение экспрессии молекул HLA-G и HLA-DR на лимфоцитах. Статистическая обработка полученных результатов проводилась в пакетах программ Statistica for WINDOWS фирмы StatSoft Inc. Версия 10.0 и MedCalc 17.5.3. по правилам вариационной статистики.

Выявлено, что под воздействием аутогенной сыворотки экспрессия молекул HLA-G и HLA-DR значительно не меняется на лимфоцитах мужчин и женщин, имеющих детей с врожденными пороками сердца. В то же время у женщин, имеющих более двух родов и всех условно здоровых детей, аутогенная сыворотка значительно подавляет экспрессию молекул HLA-G и HLA-DR на лимфоцитах. Особо выраженное и значимое подавление под воздействием аутогенной сыворотки отмечено для молекулы HLA-DR на CD3 положительных лимфоцитах. Другие значимые различия касались влияния аутогенной и аллогенной (материнской) сывороток на экспрессию молекул HLA-G и HLA-DR на лимфоцитах детей. Показано, что в группе детей с септальным ВПС, аутогенные и аллогенные сыворотки не подавляли экспрессию HLA-G и HLA-DR на лимфоцитах. В то же время в группе условно здоровых детей аутогенные и аллогенные (материнские) сыворотки подавляли экспрессию HLA-G и HLA-DR на лимфоцитах. Причем эффект подавления экспрессии как HLA-G, так и HLA-DR был значительно выше аллогенной сыворотки (материнской), чем аутогенной ( $p < 0,01$ ). Данный эффект, вполне вероятно, определяется наличием ауто- и аллоиммунных антител к молекулам HLA-G и HLA-DR в сыворотке крови многоплодных женщин.

### Адрес для переписки:

Сеницкая Анна Викторовна  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт  
комплексных проблем сердечно-сосудистых  
заболеваний»  
650002, Россия, г. Кемерово, Сосновый б-р, 6.  
Тел.: 8 (950) 586-33-97.  
E-mail: cepoav1991@gmail.com

### Address for correspondence:

Anna V. Sinitskaya  
Research Institute for Complex Issues  
of Cardiovascular Diseases  
6 Sosnovy Blvd  
Kemerovo  
650002 Russian Federation  
Phone: +7 (950) 586-33-97.  
E-mail: cepoav1991@gmail.com

### Образец цитирования:

А.В. Шабалдин, А.В. Сеницкая, С.А. Шмелевич,  
Е.О. Гришачева «Особенности экспрессии молекул  
HLA-G и HLA-DR на лимфоцитах женщин и их детей  
с септальными врожденными пороками сердца»  
// Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 1. С. 89–106.  
doi: 10.15789/1563-0625-EPO-2614

© Шабалдин А.В. и соавт., 2023

Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### For citation:

A.V. Shabaldin, A.V. Sinitskaya, S.A. Shmulevich,  
E.O. Grishacheva "Expression pattern of HLA-G and  
HLA-DR molecules on lymphocytes of women and their  
children with septal congenital heart defects", *Medical  
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024,  
Vol. 26, no. 1, pp. 89–106.  
doi: 10.15789/1563-0625-EPO-2614

© Shabaldin A.V. et al., 2023

The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-EPO-2614

Супрессорная активность женской сыворотки по отношению к аллогенным (эмбриона/плода/ребенка) и аутогенным (собственным) молекулам HLA-G и HLA-DR определяет протективный эффект в отношении формирования септальных врожденных пороков сердца у потомства.

*Ключевые слова:* врожденные пороки сердца, HLA-G, HLA-DR, аутосыворотка, лимфоциты, экспрессия

## EXPRESSION PATTERN OF HLA-G AND HLA-DR MOLECULES ON LYMPHOCYTES OF WOMEN AND THEIR CHILDREN WITH SEPTAL CONGENITAL HEART DEFECTS

Shabaldin A.V., Sinitskaya A.V., Shmulevich S.A., Grishacheva E.O.

*Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation*

**Abstract.** The aim of our study was to evaluate the features of HLA-G and HLA-DR expression on lymphocytes of women and their children with congenital heart defects (CHD) under the influence of allogeneic and autologous blood sera.

38 women and their children with sporadic septal congenital heart defects (main group) were examined. The comparison groups included 21 women and their children without congenital heart disease (comparison group 1), as well as 17 apparently healthy men (comparison group 2). A total of 115 individuals were examined. The cross-match studies were carried out using a CytoFlex flow cytometer (Beckman Coulter, USA). The effects of autologous and allogeneic blood sera on HLA-G and HLA-DR expression on lymphocytes were evaluated. Statistical processing of the obtained results was carried out using Statistica for WINDOWS software packages from StatSoft Inc. Version 10.0 and MedCalc 17.5.3. by the rules of variation statistics.

The expression of HLA-G and HLA-DR molecules on the lymphocytes did not significantly change under the influence of autologous serum from men and women of children with CHD. At the same time, in women with more than two births of apparently healthy children, autologous serum significantly suppressed expression of HLA-G and HLA-DR on their lymphocytes. In particular, a pronounced and significant suppression was noted with autologous serum for HLA-DR molecules on CD3-positive lymphocytes. One may suggest that inflammation in the mother-embryo system is limited by this mechanism. Other significant differences concerned the effect of autologous and allogeneic (maternal) sera on the expression of HLA-G and HLA-DR molecules on the children's lymphocytes. We have shown that in the group of children with septal CHD, autologous and allogeneic sera did not suppress the expression of HLA-G and HLA-DR on lymphocytes. At the same time, in the group of apparently healthy children, autologous and allogeneic (maternal) sera suppressed the expression of HLA-G and HLA-DR on lymphocytes. Moreover, the suppressive effect upon expression of both HLA-G and HLA-DR was significantly higher in allogeneic (maternal) sera than in autologous serum ( $p < 0.01$ ). This effect seems to be determined by the presence of auto- and alloimmune antibodies to HLA-G and HLA-DR molecules in blood serum of multiparous women.

The suppressor activity of female sera against allogeneic (embryo / fetus / child) and autologous (intrinsic) HLA-G and HLA-DR antigenic molecules may determine a protective effect related to development of septal congenital heart defects in offspring.

*Keywords:* congenital heart defects, HLA-DR, HLA-G, autologous serum, lymphocytes, expression

Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0419-2022-0001

### Введение

Эпидемиологические исследования показали, что врожденные пороки сердца (ВПС) доминируют среди всей врожденной и наследственной патологии плода и новорожденного ребенка [10]. Частота значимых ВПС достигает 1%, а это зна-

чит, что каждый сотый ребенок рождается с пороком сердца, который необходимо лечить, в том числе хирургическими методами [14]. Особое значение имеют критические ВПС, определяющие уровень перинатальной и младенческой смертности в мире, а хирургическое лечение которых не приводит к полному выздоровлению ребенка [1].

Одной из важных проблем современной медицины является прегравидарное прогнозирование и специфическая профилактика врожденной па-

тологии плода и новорожденного ребенка, в том числе значимых и критических ВПС. Это может быть достигнуто при достаточном уровне знаний этиологии и патогенеза спорадических ВПС.

Современные исследования, в том числе с помощью OMICs технологий (исследования протеома, экзома, транскриптома и метаболома), спорадических (не имеющих семейной истории) ВПС показали значимые отклонения в регуляторных сетях, через которые контролируется пролиферация прогениторных клеток сердечно-сосудистой системы. Были получены схожие данные как для отдельных септальных ВПС, так и для комбинированных (например, тетрада Фалло) [12]. Показана ассоциативная значимость с ВПС генов цитокинов и мембранных рецепторов межклеточных контактов [12].

С другой стороны, продолжаются исследования роли внешних факторов (макро- и микро-экологии) в индукции ВПС, а также иммунных нарушений в системе «мать — плод» [5, 7].

Спорадические ВПС являются мультифакториальными заболеваниями, при которых имеют место конституциональные (наследуемые от родителей) нарушения регуляции пролиферации и дифференцировки клеток эмбриобласта и прогениторных клеток сердечно-сосудистой системы. В то же время триггерными факторами для индукции этих сетей являются иммунные нарушения в системе «мать — плод». Они сами по себе могут активировать «патологические» регуляторные сети и могут усиливать индуцибельное действие ксено- и эндобиотиков с тератогенным эффектом.

Иммунология репродукции является важным разделом современной медицины, в котором можно выделить направление, посвященное иммунной регуляции эмбриогенеза. В этом ключе, были проведены исследования роли иммунных нарушений в системе «мать — эмбрион/плод» в детерминировании ВПС [7]. Особое значение было показано для модулирующей активности женской аутогенной сыворотки, высокая активность которой, по отношению к аллогенным взаимодействиям лимфоцитов супругов, является предиктором ВПС у их потомства. Оценка аллогенных взаимодействий лимфоцитов супругов проводилась по изменению экспрессии HLA-DR на лимфоцитах [6]. Кроме того, изучалась и роль генов кодирующих молекулу HLA-G и HLA-DR в детерминировании ВПС [2, 8]. Именно через межклеточные контакты посредством HLA-G и HLA-DR контролируется иммунное воспаление в системе «мать — плод», а также пролиферация и дифференцировка стволовых и прогениторных клеток эмбриона [2]. Ранее уже выдвигалась гипотеза, что декомпенсация воспалительного процесса в «системе мать — плод» может быть основой

индукции ВПС [9, 11]. В частности, провоспалительные цитокины могут сдвигать процессы пролиферации, дифференцировки и апоптоза в прогениторных клетках сердечно-сосудистой системы в сторону последнего (пироптоза) [2].

Вполне вероятно, что одним из ключевых гуморальных факторов экспрессии и функциональной активности молекул HLA-G и HLA-DR являются антитела к ним. Причем женские (материнские) антитела могут быть направлены как к собственным молекулам главного комплекса тканевой совместимости, так и к антигенам эмбриона/плода/новорожденного ребенка. Соответственно от аутогенной или аллогенной направленности антитела могут оказывать различное регуляторное влияние на иммунное обеспечение беременности и регуляцию эмбриогенеза.

Исходя из этого, была поставлена **цель исследования** — изучить особенности экспрессии молекул HLA-G и HLA-DR на лимфоцитах женщин и их детей с ВПС под воздействие аутогенных и аллогенных сывороток крови.

## Материалы и методы

Для достижения поставленной цели исследования было обследовано 38 женщин и их детей со спорадическими септальными ВПС (основная группа). Распределение нозологических форм ВПС представлено в таблице 1.

Основная группа была сформирована на базе хирургического отделения «Научно-исследовательского института комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», где они проходили лечения. Дети находились в отделении вместе с матерями, которые подписывали информированное согласие на их участие, а также на участие их детей, иммунологических исследований. Все диагнозы ВПС у детей был подтверждены с помощью ЭхоКГ и других инструментальных методов обследования. У всех детей с ВПС отсутствовали хромосомные болезни и синдромы, а также в семьях не было других случаев рождения или пренатального обнаружения ВПС.

Были сформированы две группы сравнения. Первая группа сравнения была представлена 21 женщиной и их условно здоровыми детьми без ВПС, а также с отсутствием в семье родов или пренатального обнаружения ВПС. Группа была сформирована на поликлинических базах ФГБОУ ВО «Кемеровского государственного медицинского университета». У всех матерей первой группы сравнения было получено информированное согласие на их участие, а также их детей, в иммунологическом исследовании. Вторая группа сравнения состояла из 17 условно здоровых мужчин. Группа сформирована из сотрудников «Научно-исследовательского института комплексных проблем сердечно-сосудистых

ТАБЛИЦА 1. НОЗОЛОГИЧЕСКИЕ ФОРМЫ СПОРАДИЧЕСКИХ ВРОЖДЕННЫХ ПОРОКОВ СЕРДЦА У ДЕТЕЙ ОСНОВНОЙ ГРУППЫ

TABLE 1. NOSOLOGICAL FORMS OF SPORADIC CONGENITAL HEART DEFECTS IN CHILDREN OF THE MAIN GROUP

Септальный ВПС Septal CHD	Абсолютное Absolute	в %
Дефект межжелудочковой перегородки (ДМЖП) Ventricular septal defect (VSD)	8	21,06
Дефект межпредсердной перегородки (ДМПП) Atrial septal defect (ASD)	28	73,68
ДМЖП и ДМПП VSD and ASD	2	5,26

заболеваний». Все мужчины подписывали информированное согласие на участие в иммунологическом исследовании. Всего обследовано 115 индивидуумов.

Возраст матерей основной группы (Ме ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )) был 25,3 (21,7-29,6) года, детей — 2,9 (0,5-4,8) года, а в группе сравнения — матерей 26,9 (22,5-30,8) года и детей 4,1 (3,6-5,9). Значимых различий не получено ( $p < 0,05$ ). Половые различия в сравниваемых группах детей были сопоставимы.

Исследование первичной экспрессии молекул HLA-G и HLA-DR на лимфоцитах матерей, их детей и мужчин, а также вторичной, после инкубации с аутогенной и аллогенной сывороткой проводили по методологии «cross-match» на проточном цитофлуориметре CytoFlex (Beckman Coulter, США).

Исследование экспрессии HLA-G и HLA-DR в различных субпопуляциях лимфоцитов проводилось на женских, детских и мужских монокультурах. Лимфоциты выделялись из периферической крови на градиенте плотности 1,077 («Фиколл-1077», «Диаэм», Москва, Россия). Полученные взвеси женских, детских и мужских лимфоцитов двукратно отмывались раствором Хэнкса («Диаэм», Москва, Россия). Для этого по 1000 мкл раствора Хэнкса добавлялось в пробирки с женскими, детскими и мужскими лимфоцитами и центрифугировалось 10 минут при 1500 g. После центрифугирования надосадочная жидкость убиралась. Далее во все монокультуры с минимальным количеством раствора Хэнкса (среднее содержание лимфоцитов было 1 млн женских или мужских клеток и 1,5 млн детских клеток в 25 мкл раствора Хэнкса) для первичного окрашивания лимфоцитов добавлялись 5 мкл с моноклональными антителами к молекуле CD45, конъюгированными с флуоресцентным красителем перидинин-хлорофиллом 7 (PC-7, BioLegend, США). Инкубация проводилась в течение 15 минут при комнатной температуре в темноте, после которой выполнялась однократная отмывка лимфоцитов раствором Хэнкса от несвязанных антител. После отмывки в пробирки с детскими мо-

нокультурами добавлялось 600 мкл полной среды (RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США), с 2 ммольями L-глутамином (Panreac, Испания), с 10 ммольями Непес-буфера (Sigma-Aldrich, США), с  $5 \times 10^{-5}$  ммольями 2-меркаптоэтанола (Biochem, Франция) и с 50 мкг/мл раствора гентамицина-сульфата («Ветинтерфарм», Россия)), а с женскими и мужскими — 400 мкл полной среды. Далее выполнялся подход «cross-match». Для каждой детской монокультуры готовилось 3 пробирки для оценки экспрессии HLA-G и 3 пробирки — для HLA-DR, в которые вносилось по 100 мкл клеточной взвеси (250 тысяч клеток в полной среде). Далее, в первую пробирку добавлялись 100 мкл полной среды (контрольная пробирка), во вторую пробирку вносились 100 мкл аутогенной сыворотки крови ребенка, а в третью пробирку 100 мкл аллогенной сыворотки крови матери. Для женских и мужских лимфоцитов исследование выполнялось в двух пробирках (с контрольной и с аутогенной сывороткой) для HLA-G и в двух — для HLA-DR. Всего 4 пробирки (250 тысяч клеток в каждой пробирке). Все пробирки помещались термостат на 0,5 часа при 37 °С. После окончания инкубации проводилась однократная отмывка лимфоцитов каждой пробирки раствором Хэнкса по вышеописанной методике. После однократной отмывки выполнялось окрашивание лимфоцитов в каждой монокультуре как в полной среде, так и в среде с добавлением аллогенных и аутогенных сывороток с помощью конъюгированных моноклональных антител (МКАТ). В пробирки, где оценивалась экспрессия HLA-G, добавлялись 3 мкл с МКАТ к молекуле CD3 конъюгированные с флуорисцеин изотиоцианат (FITC) и 3 мкл с МКАТ к молекуле HLA-G конъюгированные с алофикоцианин (APC) (BioLegend, США). Соответственно в пробирки, где оценивалась экспрессия HLA-DR, добавлялись МКАТ в тех же соотношения, но вместо МКАТ к HLA-G добавлялся МКАТ к HLA-DR, также конъюгированный с APC (BioLegend, США). Объем антител к количеству лимфоцитов, время и температура инкубаций соответствовали прилагаемым инструкциям к каждому конъюгированному моноклональному



антителу. Инкубирование проводилось в течение 15 минут при комнатной температуре в темноте.

С учетом перекрестного реагирования с молекулами HLA-G и HLA-DR антител-содержащих в аллогенных и аутогенных сыворотках оценили концентрацию гаммаглобулинов в растворах моноклональных антител и в добавляемой сыворотки крови. Так, из раствора специфических МКАТ добавлялось на 250 тысяч клеток 1,5 мкг антител; а из сыворотки крови на это же количество клеток добавлялось около 1000 мкг гаммаглобулина, что могло быть достаточным для частичного закрытия антигенных детерминант анализируемых молекул на лимфоцитах.

После окончания инкубации с МКАТ проводилась отмывка лимфоцитов раствором Хенкса по описанной выше методике. Раствор 1X OptiLyse (Beckman Coulter, США) добавлялся по 200 мкл в каждую пробирку для фиксации антител на лимфоцитах в монокультурах.

Особенности экспрессии HLA-G и HLA-DR на различных субпопуляциях лимфоцитов женщин, детей и мужчин и влияние на этот процесс аутогенных и аллогенных сывороток крови были оценены с помощью протокола проточной ци-

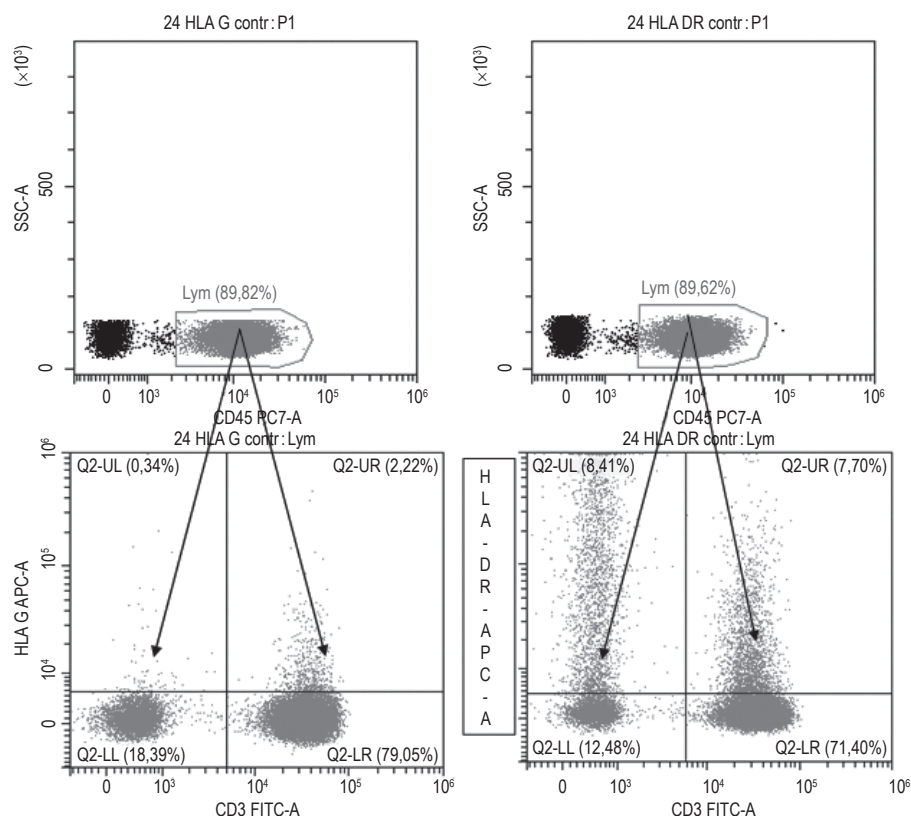
тофлуориметрии для CytoFlex (Beckman Coulter, США).

Протокол включал несколько последовательных этапов для каждой монокультуры инкубированных в полной среде и в среде с добавлением аллогенных и аутогенных сывороток крови.

Первый этап был связан с выделением в первой гистограмме популяции лимфоцитов по их размерным характеристикам (прямое (малоугловое) светорассеяние — forward scatter — FSL) и по внутриклеточной плотности (боковое светорассеяние — side scatter — SSL).

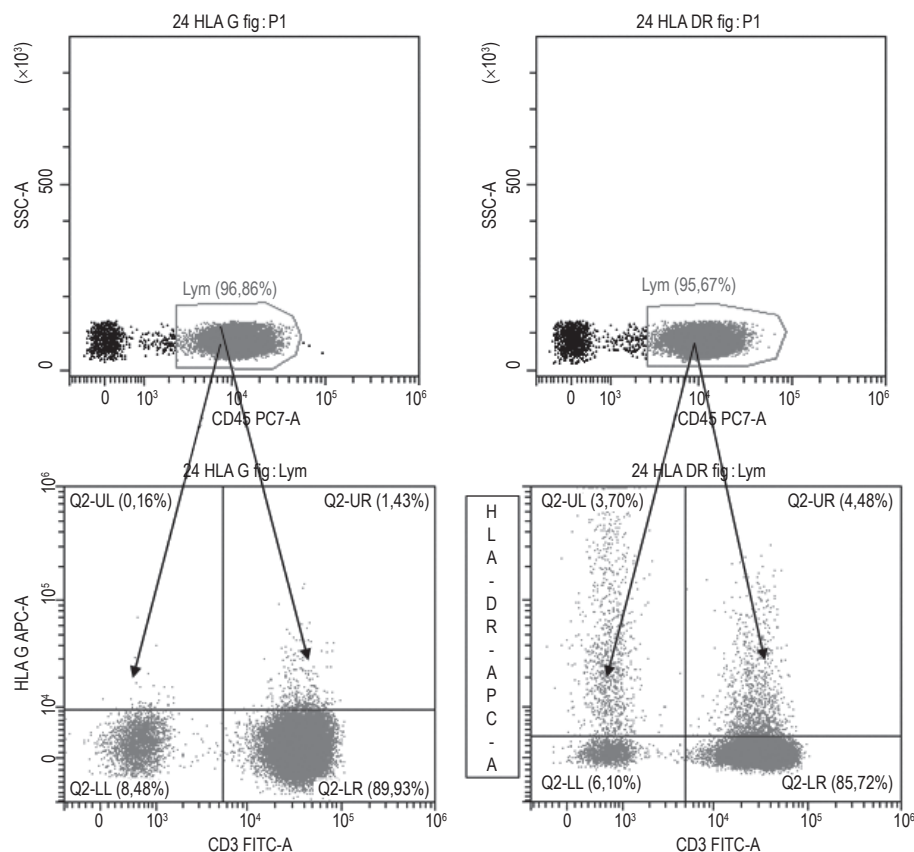
В следующей гистограмме пул лимфоцитов был дополнительно кластеризован по общему лейкоцитарному маркеру CD45 (CD45-PC7) и внутриклеточной плотности (SSL).

Третья гистограмма была для этого исследования основной. Именно в ней анализировались выделенные лимфоциты по фенотипам: CD3<sup>+</sup>/HLA-G<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/HLA-G<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>, а также CD45<sup>+</sup>/HLA-G<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>. Анализ этих субпопуляций проводился во всех монокультурах как в полной среде, так и с добавлением аутогенных и аллогенных сывороток крови (рис. 1, 2).



**Рисунок 1. Протокол проточной цитофлуориметрии для анализа экспрессии молекул HLA-G и HLA-DR на лимфоцитах женщин, детей и мужчин в полной среде (сбор клеток прекращался при достижении 10 000 лимфоцитов по гейту SSC-A/CD45 PC-7A)**

Figure 1. Flow cytometry protocol for the analysis of the expression of HLA-G and HLA-DR molecules on lymphocytes of women, children and men in complete medium (cell collection was stopped when reaching 10,000 lymphocytes by the SSC-A/CD45 PC-7A gate)



**Рисунок 2. Протокол проточной цитофлуометрии для анализа экспрессии молекул HLA-G и HLA-DR на лимфоцитах женщин, детей и мужчин в среде с добавлением сыворотки крови (сбор клеток прекращался при достижении 10 000 лимфоцитов по гейту SSC-A/CD45 PC-7A)**

Figure 2. Flow cytometry protocol for the analysis of the expression of HLA-G and HLA-DR molecules on lymphocytes of women, children and men in a medium with the addition of blood serum (cell collection was stopped when 10,000 lymphocytes were reached according to the SSC-A/CD45 PC-7A gate)

По различию экспрессии HLA-G и HLA-DR на различных субпопуляциях женских, детских и мужских лимфоцитов в полной среде и в среде с добавлением аллогенных и аутогенных сывороток крови соответственно определяли их эффект. Если в среде с той или иной сывороткой крови экспрессия HLA-G и HLA-DR на соответствующей субпопуляции лимфоцитов была ниже, чем в полной среде, то эффект данной сыворотки крови считался блокирующим. В том случае, если в среде с сывороткой крови экспрессия молекул HLA-G и HLA-DR на соответствующей субпопуляции лимфоцитов была выше, чем в полной среде, то эффект данной сыворотки считался активирующим. Для количественной оценки эффектов сывороток крови использовали формулу:

Изменение экспрессии HLA-G или HLA-DR в % = ((количество клеток с молекулами HLA-G или HLA-DR в среде с сывороткой крови – количество клеток с молекулами HLA-G или HLA-DR в полной среде) / количество клеток с молекулами HLA-G или HLA-DR в полной среде) × 100%.

Статистическая обработка данных проводилась в пакетах программ Statistica for WINDOWS фирмы StatSoft Inc. Версия 10.0 и MedCalc 17.5.3. по правилам вариационной статистики.

Нормальность распределения выборок оценивали с помощью W-теста Шапиро–Уилка. Проверка на нормальность распределения показала, что данные в исследовании не имеют нормального распределения. Поэтому в дальнейшем расчеты производились методами непараметрической статистики. Номинальные данные описывались с указанием абсолютных значений, процентных долей (%). Количественные данные представляли в виде медианы (Me), 25-го и 75-го перцентилей ( $Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$ ). Сравнение значений уровней метрических показателей в несвязанных выборках проводили с помощью непараметрического Манна–Уитни, а в связанных – Вилкоксона.

Уровень статистической значимости различий принимали при  $p < 0,05$ , что соответствует медико-биологическим исследованиям [4].

## Результаты

Проведенное исследование показало, что по экспрессии HLA-G на различных субпопуляциях лимфоцитов как в полной среде, так и с добавлением аутогенной сыворотки сравниваемые группы (женщины основной группы, женщины первой группы сравнения и мужчины второй группы сравнения) не различались. Тем самым можно говорить о том, что экспрессия этих молекул является достаточно стабильным свойством лимфоцитов периферической крови человека. Как видно из таблицы 1, количество лимфоцитов CD3<sup>-</sup> (В-лимфоциты и натуральные киллерные лимфоциты), экспрессирующих данную молекулу, не превышал 1%, а лимфоцитов CD3<sup>+</sup> (Т-лимфоцитов) с этой молекулой достигало 7%. Эти данные указывают, что молекула HLA-G может также быть экспрессированной на активированных Т-лимфоцитах.

В то же время для изменения экспрессии молекул HLA-G под воздействием аутогенной сыворотки крови получены значимые различия между группами. Прежде всего, необходимо отметить, что в первой группе сравнения (женщины, имеющие условно здоровых детей) аутогенная сыворотка преимущественно оказывала блокирующий эффект (табл. 2), и это, возможно, связано с наличием в ней регуляторных блокирующих антител к собственной молекуле HLA-G. В то же время в основной группе доминировал эффект активации экспрессии или отсутствие такового. Во второй группе сравнения (мужчины) аутогенная сыворотка крови была преимущественно нейтральной по отношению к экспрессии молекул HLA-G. По данному показателю получены значимые различия не только между основной группой и группами сравнения, но и внутри групп сравнения. Надо отметить, что женщины основной группы имели более высокий активирующий эффект аутогенной сыворотки на экспрессию молекул HLA-G в анализируемых субпопуляциях лимфоцитов, чем в группе мужчин (вторая группа сравнения). Если принять во внимание, что HLA-G на Т-лимфоцитах отражает их активацию, то можно предположить о повышении провоспалительного потенциала в женском микроокружении эмбриона в основной группе.

Исследования экспрессии HLA-DR на различных субпопуляциях лимфоцитов в сравниваемые группы (женщины основной группы, женщины первой группы сравнения и мужчины второй группы сравнения) показали единственное значимое различие (табл. 3). Это различие касалось основной группы и первой группы сравнения (женщины, имеющие здоровых детей). Так, в основной группе CD3<sup>+</sup> лимфоцитов (Т-лимфоциты) с молекулой HLA-DR на их мем-

бране было значимо больше в среде с аутогенной сывороткой крови, чем в этих условиях в первой группе сравнения ( $p < 0,05$ ). Эти данные указывают, что уровень активированных Т-лимфоцитов под воздействием аутогенной сыворотки возрастает в группе женщин, имеющих детей со спорадическими септальными ВПС.

Наглядно этот эффект продемонстрирован при оценке изменения экспрессии молекулы HLA-DR под воздействием аутогенной сыворотки крови. По аналогии с изменением экспрессии молекулы HLA-G под воздействием аутогенной сыворотки, в первой группе сравнения (женщины, имеющие условно здоровых детей) аутогенная сыворотка преимущественно блокировала экспрессию HLA-DR на анализируемых субпопуляциях лимфоцитов (табл. 3). Вполне вероятно, что этот эффект был связан с наличием в ней регуляторных блокирующих антител к собственной молекуле HLA-DR. В основной группе также доминировал активирующий эффект на экспрессию HLA-DR. В группе мужчин (вторая группа сравнения) аутогенная сыворотка крови была преимущественно нейтральной по отношению к экспрессии молекул HLA-DR. По этим показателям получены значимые различия между основной группой и группами сравнения, а также и внутри групп сравнения. Соответственно, женщины основной группы имели высокий активирующий эффект аутогенной сыворотки на экспрессию молекул HLA-DR, в том числе по отношению к группе мужчин (вторая группа сравнения). Этот эффект был особенно представлен для субпопуляции CD3<sup>-</sup> лимфоцитов (В-лимфоциты и натуральные киллерные лимфоциты – NK-лимфоциты). Можно предположить о дополнительном негативном влиянии женских гуморальных факторов на активацию NK-лимфоцитов в группе женщин, имеющих детей со спорадическими септальными ВПС.

На следующем этапе исследования провели сравнение эффекта аутогенной и аллогенной сывороток на экспрессию молекул HLA-G и HLA-DR на лимфоцитах детей. В таблице 4 представлены данные об экспрессии молекулы HLA-G на субпопуляциях детских лимфоцитов под воздействием аутогенной (детской сыворотки крови) и аллогенной (материнской). Получены значимые различия. Так, в первой группе сравнения (условно здоровые дети) CD3<sup>+</sup> лимфоцитов (Т-лимфоцитов) с молекулой HLA-G в среде без добавления сывороток крови было значимо больше, чем в основной группе (дети со спорадическими септальными ВПС). Анализ изменения экспрессии молекул HLA-G на детских лимфоцитах под воздействием аутогенной и аллогенной сывороток крови в сравниваемых

**ТАБЛИЦА 2. ЭКСПРЕССИЯ МОЛЕКУЛ HLA-G НА ЛИМФОЦИТАХ СРАВНИВАЕМЫХ ГРУПП И ИЗМЕНЕНИЯ ИХ ЭКСПРЕССИИ ПРИ ДОБАВЛЕНИИ АУТОГЕННОЙ СЫВОРОТКИ (АУТОСЫВОРОТКА)**

TABLE 2. EXPRESSION OF HLA-G MOLECULES ON LYMPHOCYTES OF THE COMPARED GROUPS AND CHANGES IN THEIR EXPRESSION UPON ADDITION OF AUTOGENOUS SERUM (AUTOSERUM)

Аналиты Analytes	1. Женщины, основная группа 1. Female, main group n = 38			2. Женщины, первая группа сравнения 2. Female, first comparison group n = 21			3. Мужчины, вторая группа сравнения 3. Male, second comparison group n = 17			$p_{1,2}$	$p_{1,3}$	$p_{2,3}$
	Me	$Q_{0,75}$	$Q_{0,25}$	Me	$Q_{0,75}$	$Q_{0,25}$	Me	$Q_{0,75}$	$Q_{0,25}$			
<b>HLA-G на CD3<sup>-</sup> без аутосыыворотки (контроль), в %</b> HLA-G on CD3 <sup>-</sup> without autoserum (control), in %	0,30	0,53	0,08	0,65	1,39	0,01	0,83	1,67	0,01	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$
<b>HLA-G на CD3<sup>-</sup> с аутосыывороткой (опыт), в %</b> HLA-G on CD3 <sup>-</sup> with autoserum (experiment), in %	0,38	0,65	0,11	0,13	0,24	0,03	0,28	0,42	0,14	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$
<b>HLA-G на CD3<sup>+</sup> без аутосыыворотки (контроль), %</b> HLA-G on CD3 <sup>+</sup> without autoserum (control), %	1,05	1,83	0,27	3,93	6,87	0,02	3,80	7,97	0,37	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$
<b>HLA-G на CD3<sup>+</sup> с аутосыывороткой (опыт), в %</b> HLA-G on CD3 <sup>+</sup> with autoserum (experiment), in %	1,15	2,21	0,10	1,08	2,19	0,04	0,97	1,65	0,28	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$
<b>Изменение в % HLA-G на CD3<sup>-</sup> (контроль/опыт)</b> Change in % HLA-G to CD3 <sup>-</sup> (control/experiment)	78,18	253,41	-97,04	-34,24	56,23	-124,71	38,65	74,94	-67,63	$p < 0,001^*$	$p < 0,05^*$	$p < 0,01^*$
<b>Изменение в % HLA-G на CD3<sup>+</sup> (контроль/опыт)</b> Change in % HLA-G on CD3 <sup>+</sup> (control/experiment)	45,72	168,75	-77,32	-35,59	7,18	-78,38	22,55	150,84	-85,74	$p < 0,001^*$	$p < 0,05^*$	$p < 0,01^*$

Примечание. \* – значимые различия показателей.

Note. \*, significant differences in indicators.



ТАБЛИЦА 3. ЭКСПРЕССИЯ МОЛЕКУЛ HLA-DR НА ЛИМФОЦИТАХ СРАВНИВАЕМЫХ ГРУПП И ИЗМЕНЕНИЯ ИХ ЭКСПРЕССИИ ПРИ ДОБАВЛЕНИИ АУТОГЕННОЙ СЫВОРОТКИ (АУТОСЫВОРОТКА)

TABLE 3. EXPRESSION OF HLA-DR MOLECULES ON LYMPHOCYTES OF THE COMPARED GROUPS AND CHANGES IN THEIR EXPRESSION UPON THE ADDITION OF AUTOGENOUS SERUM (AUTOSERUM)

Аналиты Analytes	1. Женщины, основная группа 1. Female, main group n = 38				2. Женщины, первая группа сравнения 2. Female, first comparison group n = 21				3. Мужчины, вторая группа сравнения 3. Male, second comparison group n = 17				p <sub>1,2</sub>	p <sub>1,3</sub>	p <sub>2,3</sub>
	Me	Q <sub>0,75</sub>	Q <sub>0,25</sub>		Me	Q <sub>0,75</sub>	Q <sub>0,25</sub>		Me	Q <sub>0,75</sub>	Q <sub>0,25</sub>				
HLA-DR на CD3- без аутосыыворотки (контроль), в % HLA-DR on CD3- without autoserum (control), in %	6,65	9,79	3,51		9,93	17,22	2,64		8,41	10,09	6,74		p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
HLA-DR на CD3- с аутосыывороткой (опыт), в % HLA-DR on CD3- with autoserum (experiment), in %	7,73	11,72	3,74		10,71	22,92	-1,51		6,54	7,29	5,78		p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
HLA-DR на CD3+ без аутосыыворотки (контроль), в % HLA-DR on CD3+ without autoserum (control), in %	10,31	18,93	1,68		11,44	20,55	2,32		9,05	11,98	6,13		p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
HLA-DR на CD3+ с аутосыывороткой (опыт), в % HLA-DR on CD3+ with autoserum (experiment), in %	8,19	12,46	3,91		4,87	7,99	1,74		7,06	8,83	5,29		p < 0,05*	p > 0,05	p > 0,05
Изменение в % HLA-DR на CD3- (контроль/опыт) Change in % HLA-DR per CD3- (control / experiment)	30,89	104,85	-43,08		-15,21	47,62	-58,03		1,51	12,53	-25,49		p < 0,01*	p < 0,05*	p < 0,05*
Изменение в % HLA-DR на CD3+ (контроль/опыт) Change in % HLA-DR on CD3+ (control / experiment)	10,68	90,63	-73,26		-46,95	-26,60	-67,31		2,38	14,78	-27,99		p < 0,001*	p < 0,05*	p < 0,01*

Примечание. \* – значимые различия показателей.  
Note. \*, significant differences in indicators.

**ТАБЛИЦА 4. ЭКСПРЕССИЯ МОЛЕКУЛ HLA-G НА ЛИМФОЦИТАХ ДЕТЕЙ СРАВНИВАЕМЫХ ГРУПП И ИЗМЕНЕНИЯ ИХ ЭКСПРЕССИИ ПРИ ДОБАВЛЕНИИ АУТОГЕННОЙ (ДЕТСКОЙ) И АЛЛОГЕННОЙ (МАТЕРИНСКОЙ) СЫВОРОТОК КРОВИ**

TABLE 4. EXPRESSION OF HLA-G MOLECULES ON LYMPHOCYTES OF CHILDREN OF THE COMPARED GROUPS AND CHANGES IN THEIR EXPRESSION WITH THE ADDITION OF AUTOGENOUS (CHILDREN'S) AND ALLOGENEIC (MATERNAL) BLOOD SERA

Аналиты Analytes	Дети, основная группа Children, main group n = 38			Дети, первая группа сравнения Children, first comparison group n = 21			p
	Me	Q <sub>0,75</sub>	Q <sub>0,25</sub>	Me	Q <sub>0,75</sub>	Q <sub>0,25</sub>	
<b>HLA-G на CD3<sup>-</sup> без сывороток</b> HLA-G on CD3 <sup>-</sup> without serum	0,37	0,54	0,19	1,29	2,07	0,51	p > 0,05
<b>HLA-G на CD3<sup>-</sup> с аутосывороткой</b> HLA-G on CD3 <sup>-</sup> with autoserum	0,75	1,29	0,20	0,46	0,48	0,44	p > 0,05
<b>HLA-G на CD3<sup>-</sup> с аллосывороткой</b> HLA-G on CD3 <sup>-</sup> with alloserum	0,33	0,50	0,16	0,19	0,31	0,06	p > 0,05
<b>HLA-G на CD3<sup>+</sup> без сывороток</b> HLA-G on CD3 <sup>+</sup> without serum	0,58	1,06	0,10	2,99	4,65	1,33	p < 0,05*
<b>HLA-G на CD3<sup>+</sup> с аутосывороткой</b> HLA-G on CD3 <sup>+</sup> with autoserum	0,80	1,49	0,11	0,90	1,49	0,30	p > 0,05
<b>HLA-G на CD3<sup>+</sup> с аллосывороткой</b> HLA-G on CD3 <sup>+</sup> with alloserum	0,58	0,95	0,21	0,58	0,72	0,45	p > 0,05
<b>Изменение в % HLA-G на CD3<sup>-</sup> (контроль/ауто)</b> Change in % HLA-G to CD3 <sup>-</sup> (control / auto)	143,72	324,87	-37,42	4,19	25,18	-13,57	p < 0,01*
<b>Изменение в % HLA-G на CD3<sup>-</sup> (контроль/алло)</b> Change in % HLA-G to CD3 <sup>-</sup> (control / allo)	17,71	114,66	-79,23	-86,62	-83,83	-89,40	p < 0,001*
<b>Изменение в % HLA-G на CD3<sup>+</sup> (контроль/ауто)</b> Change in % HLA-G on CD3 <sup>+</sup> (control / auto)	44,03	140,98	-52,92	1,42	35,73	-18,53	p < 0,01*
<b>Изменение в % HLA-G на CD3<sup>+</sup> (контроль/алло)</b> Change in % HLA-G on CD3 <sup>+</sup> (control / allo)	30,39	130,23	-69,45	-75,45	-61,88	-89,01	p < 0,001*

Примечание. \* – значимые различия показателей; ауто – аутогенная сыворотка, алло – аллогенная сыворотка.

Note. \*, significant differences in indicators. Abbreviations: auto, autogenous serum; allo, allogeneic serum.

группах показал значимые различия по всем показателям (табл. 4).

Так, показатели изменения экспрессии в основной группе все были значимо выше, чем в первой группе сравнения. Надо отметить, что материнская аллогенная сыворотка имела эффект активации экспрессии молекул HLA-G на CD3<sup>-</sup> и CD3<sup>+</sup> в группе детей со спорадическими септальными ВПС, в то время как в первой группе

сравнения материнская сыворотка обладала блокирующим эффектом по отношению к HLA-G. Детская аутогенная сыворотка преимущественно обладала нейтральным эффектом в первой группе сравнения (эффект схож с влиянием аутосыворотки на мужские лимфоциты) и активирующим эффектом в основной группе. Различия по этим показателям были значимыми.

**ТАБЛИЦА 5. ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ МОЛЕКУЛ HLA-G НА ЛИМФОЦИТАХ ДЕТЕЙ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ АУТОГЕННОЙ (ДЕТСКОЙ) И АЛЛОГЕННОЙ (МАТЕРИНСКОЙ) СЫВОРОТОК КРОВИ**

TABLE 5. CHANGES IN THE EXPRESSION OF HLA-G MOLECULES ON LYMPHOCYTES OF CHILDREN UNDER THE INFLUENCE OF AUTOGENOUS (CHILDREN'S) AND ALLOGENEIC (MATERNAL) BLOOD SERA

Аналиты Analytes	Аутосыворотка Autoserum			Аллосыворотка Alloserum			p
	Me	Q <sub>0,75</sub>	Q <sub>0,25</sub>	Me	Q <sub>0,75</sub>	Q <sub>0,25</sub>	
<b>Основная группа, изменение в % HLA-G на CD3<sup>-</sup> (контроль/сыворотка)</b> Main group, change in % HLA-G to CD3 <sup>-</sup> (control / serum)	143,72	324,87	-37,42	17,71	114,66	-79,23	p < 0,001*
<b>Сравнения группа, изменение в % HLA-G на CD3<sup>-</sup> (контроль/сыворотка)</b> Comparison group, change in % HLA-G to CD3 <sup>-</sup> (control / serum)	4,19	25,18	-13,57	-86,62	-83,83	-89,40	p < 0,01*
<b>Основная группа, изменение в % HLA-G на CD3<sup>+</sup> (контроль/сыворотка)</b> Main group, change in % HLA-G to CD3 <sup>+</sup> (control / serum)	44,03	140,98	-52,92	30,39	130,23	-69,45	p > 0,05
<b>Сравнения группа, изменение в % HLA-G на CD3<sup>+</sup> (контроль/сыворотка)</b> Comparison group, change in % HLA-G on CD3 <sup>+</sup> (control / serum)	1,42	35,73	-18,53	-75,45	-61,88	-89,01	p < 0,01*

Примечание. \* – значимые различия показателей; аутосыворотка – аутогенная сыворотка, аллосыворотка – аллогенная сыворотка.

Note. \*, significant differences in indicators. Abbreviations: autoserum, autogenous serum; alloserum, allogeneic serum.

Дополнительно проведено сравнение экспрессии молекул HLA-G на лимфоцитах детей под воздействием аутогенной (детской) и аллогенной (материнской) сывороток крови (табл. 5). Как видно из таблицы 5 аллогенная сыворотка крови обладала более выраженным блокирующим эффектом по отношению к экспрессии молекулы HLA-G в основной и группе сравнения при сопоставлении с аутогенной сывороткой. Отсутствие значимых различий между аллогенной и аутогенной сывороткам было в основной группе на популяции CD3<sup>+</sup> лимфоцитах (Т-лимфоцитах). Обе сыворотки обладали активирующим эффектом в отношении этих лимфоцитов. Возможно, что этот эффект стимуляции Т-лимфоцитов детей сывороточными факторами определяет высокий провоспалительный потенциал в основной группе.

По аналогии с молекулой HLA-G выполнены исследования и по оценки экспрессии молекул HLA-DR на лимфоцитах детей (табл. 6 и 7). Как видно из таблицы 6, значимые различия по количеству лимфоцитов с HLA-DR были выявлены для детей основной и первой группы сравнения.

Так, в основной группе количество CD3<sup>-</sup> лимфоцитов (В-лимфоцитов и НК-лимфоцитов) с HLA-DR было значимо выше как в среде без сывороток крови, так и во всех средах с добавлением аутогенной и аллогенной сывороток крови. Кроме того, значимо больше было CD3<sup>+</sup> лимфоцитов (Т-лимфоцитов) с молекулой HLA-DR в основной группе при добавлении в среде аллогенной материнской сыворотки крови. Это также указывает на высокую провоспалительную активность у детей основной группы, особенно под воздействием аллогенной (материнской) сыворотки крови.

Показатели изменения экспрессии в основной группе все были значимо выше, чем в первой группе сравнения для всех показателей. Надо отметить, что по отношению к экспрессии молекул HLA-DR на CD3<sup>-</sup> и CD3<sup>+</sup> лимфоцитах в группе условно здоровых детей как аллогенная (материнская), так и аутогенная (детская) сыворотки крови обладали блокирующим эффектом. Механизм такого действия аутогенной сыворотки не

**ТАБЛИЦА 6. ЭКСПРЕССИЯ МОЛЕКУЛ HLA-DR НА ЛИМФОЦИТАХ ДЕТЕЙ СРАВНИВАЕМЫХ ГРУПП И ИЗМЕНЕНИЯ ИХ ЭКСПРЕССИИ ПРИ ДОБАВЛЕНИИ АУТОГЕННОЙ (ДЕТСКОЙ) И АЛЛОГЕННОЙ (МАТЕРИНСКОЙ) СЫВОРОТОК КРОВИ**

TABLE 6. EXPRESSION OF HLA-DR MOLECULES ON LYMPHOCYTES OF CHILDREN OF THE COMPARED GROUPS AND CHANGES IN THEIR EXPRESSION WITH THE ADDITION OF AUTOGENOUS (CHILDREN'S) AND ALLOGENEIC (MATERNAL) BLOOD SERA

Аналиты Analytes	Дети, основная группа Children, main group n = 38			Дети, первая группа сравнения Children, first comparison group n = 21			p
	Me	Q <sub>0,75</sub>	Q <sub>0,25</sub>	Me	Q <sub>0,75</sub>	Q <sub>0,25</sub>	
<b>HLA-DR на CD3<sup>-</sup> без сывороток</b> HLA-DR on CD3 <sup>-</sup> no serum	13,08	23,17	3,00	8,41	10,09	6,74	p < 0,05*
<b>HLA-DR на CD3<sup>-</sup> с аутосывороткой</b> HLA-DR on CD3 <sup>-</sup> with autoserum	16,61	31,37	1,85	6,54	7,29	5,78	p < 0,05*
<b>HLA-DR на CD3<sup>-</sup> с аллосывороткой</b> HLA-DR on CD3 <sup>-</sup> with alloserum	13,55	26,11	0,99	7,04	7,84	6,24	p < 0,05*
<b>HLA-DR на CD3<sup>+</sup> без сывороток</b> HLA-DR on CD3 <sup>+</sup> without serum	8,70	14,73	2,68	9,05	11,97	6,13	p > 0,05
<b>HLA-DR на CD3<sup>+</sup> с аутосывороткой</b> HLA-DR on CD3 <sup>+</sup> with autoserum	7,67	13,89	1,45	7,06	8,83	5,29	p > 0,05
<b>HLA-DR на CD3<sup>+</sup> с аллосывороткой</b> HLA-DR on CD3 <sup>+</sup> with alloserum	8,13	14,96	1,29	4,57	4,78	4,35	p < 0,05*
<b>Изменение в % HLA-DR на CD3<sup>-</sup> (контроль/ауто)</b> Change in % HLA-DR per CD3 <sup>-</sup> (control / auto)	36,44	113,19	-40,30	-21,51	-15,53	-27,49	p < 0,001*
<b>Изменение в % HLA-DR на CD3<sup>-</sup> (контроль/алло)</b> Change in % HLA-DR per CD3 <sup>-</sup> (control / allo)	2,30	46,60	-42,00	-15,49	-8,90	-22,08	p < 0,05*
<b>Изменение в % HLA-DR на CD3<sup>+</sup> (контроль/ауто)</b> Change in % HLA-DR per CD3 <sup>+</sup> (control / auto)	-5,67	33,22	-44,55	-20,38	-12,78	-27,99	p < 0,05*
<b>Изменение в % HLA-DR на CD3<sup>+</sup> (контроль/алло)</b> Change in % HLA-DR on CD3 <sup>+</sup> (control / allo)	-8,00	17,43	-33,42	-45,53	-26,83	-64,24	p < 0,01*

Примечание. \* – значимые различия показателей; ауто – аутогенная сыворотка, алло – аллогенная сыворотка.

Note. \*, significant differences in indicators. Abbreviations: auto, autogenous serum; allo, allogeneic serum.



**ТАБЛИЦА 7. ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ МОЛЕКУЛ HLA-DR НА ЛИМФОЦИТАХ ДЕТЕЙ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ АУТОГЕННОЙ (ДЕТСКОЙ) И АЛЛОГЕННОЙ (МАТЕРИНСКОЙ) СЫВОРОТОК КРОВИ**

TABLE 7. CHANGES IN THE EXPRESSION OF HLA-DR MOLECULES ON CHILDREN'S LYMPHOCYTES UNDER THE INFLUENCE OF AUTOGENOUS (CHILDREN'S) AND ALLOGENEIC (MATERNAL) BLOOD SERA

Аналит Analyte	Аутосыворотка Autoserum			Аллосыворотка Alloserum			p
	Me	Q <sub>0,75</sub>	Q <sub>0,25</sub>	Me	Q <sub>0,75</sub>	Q <sub>0,25</sub>	
<b>Основная группа, изменение в % HLA-DR на CD3<sup>-</sup> (контроль/сыворотка)</b> Main group, change in % HLA-DR to CD3 <sup>-</sup> (control / serum)	36,44	113,19	-40,30	2,30	46,60	-42,00	p < 0,01*
<b>Сравнения группа, изменение в % HLA-DR на CD3<sup>-</sup> (контроль/сыворотка)</b> Comparison group, change in % HLA-DR per CD3 <sup>-</sup> (control / serum)	-21,51	-15,53	-27,49	-15,49	-8,90	-22,08	p < 0,05*
<b>Основная группа, изменение в % HLA-DR на CD3<sup>+</sup> (контроль/сыворотка)</b> Main group, change in % HLA-DR on CD3 <sup>+</sup> (control / serum)	-5,67	33,22	-44,55	-7,81	17,43	-33,42	p > 0,05
<b>Сравнения группа, изменение в % HLA-DR на CD3<sup>+</sup> (контроль/сыворотка)</b> Comparison group, change in % HLA-DR for CD3 <sup>+</sup> (control / serum)	-20,38	-12,78	-27,99	-45,53	-26,83	-64,24	p < 0,01*

Примечание. \* – значимые различия показателей; аутосыворотка – аутогенная сыворотка, аллосыворотка – аллогенная сыворотка.

Note. \*, significant differences in indicators. Abbreviations: autoserum, autogenous serum; alloserum, allogeneic serum.

совсем понятен, возможно, это эффект материнских антител.

Также дополнительно проведено сравнение экспрессии молекул HLA-DR на лимфоцитах детей под воздействием аутогенной (детской) и аллогенной (материнской) сывороток крови (табл. 7). Как видно из таблицы 7, аллогенная сыворотка крови обладала более выраженным блокирующим эффектом по отношению к экспрессии молекулы HLA-DR в основной и группе сравнения, при сопоставлении с аутогенной сывороткой. Единственное отличие касалось группы сравнения и субпопуляции CD3<sup>-</sup> лимфоцитов (В-лимфоциты и NK-лимфоциты). В этом сравнении аутогенная сыворотка обладала более выраженным блокирующим эффектом, чем аллогенная. Так же как и для молекулы

HLA-G, выявлено отсутствие значимых различий между аллогенной и аутогенной сывороткам в основной группе на популяции CD3<sup>+</sup> лимфоцитов (Т-лимфоцитов). Обе сыворотки обладали блокирующим эффектом в отношении этих лимфоцитов. Блокирующий эффект аутогенной детской сыворотки по отношению к молекуле HLA-DR требует дальнейшего изучения и, возможно, определяется материнскими антителами.

## Обсуждение

Вопрос о регуляции иммунных взаимодействий в системе «мать – эмбрион» при физиологической беременности и при нарушениях в этом процессе активно изучается в мировой литературе, в том числе на примере критических

клинических проявлений, таких как идиопатические репродуктивные потери [3]. Одним из ключевых является вопрос об иммунных механизмах толерантности к полуаллогенному зародышу. Соответственно, при патологических состояниях исследуются пути ее отмены. Была показана роль эмбриональных HLA (HLA Ib), в том числе HLA-G, в моделировании иммунного ответа на аллогенные антигены в норме и при патологии. Доказано, что молекула HLA-G, инактивирует киллинг-индуцируемый рецептор (KIR2DL4 и ILT-2) NK-лимфоцитов [17]. Доказано, что молекула HLA-G экспрессируется не только на клетках вневорсинчатого цитотрофобласта, но и в половых путях, в крови небеременных женщин, в семенной жидкости, а также в предимплантированных эмбрионах [16]. Необходимо учесть, что ген *HLA-G* имеет низкий полиморфизм, поэтому практически у всех людей экспрессируется почти один и тот же белок. Именно эти уникальные особенности отличают HLA-G от его высокополиморфных аналогов HLA класса Ia, молекул HLA-A, HLA-B и HLA-C. С учетом выше сказанного, растворимые и мембранные формы HLA-G материнского, эмбрионального и отцовского происхождения, являясь фактически одной молекулой, моделируют клеточный эффекторный реакции в системе «мать — эмбрион/плод» [16]. Роль молекулы HLA-G в вынашивании беременности, в репродуктивных потерях и в детерминировании ВПС была показана на молекулярно-генетическом уровне [19, 20]. Исследования в этом направлении были нацелены на полиморфный участок гена, кодирующий HLA-G и расположенный в 3'UTR области (*HLA-G3'UTR 14-bp \*ins/del*). Этот участок гена детерминирует устойчивость транскрипта к действию РНКаз. Многочисленные исследования показали, что наличие гомозиготности по инсерции (*ins/ins*) приводит к значимому снижению матричной РНК, кодируемой с этого гена, а это, в свою очередь, приводит к дефициту экспрессии самой молекулы HLA-G [19]. Именно дефицитом HLA-G, а не его полиморфизмом, на клетках эмбриона и цитотрофобласта объясняются идиопатические репродуктивные потери, ассоциированные с гомозиготным генотипом *HLA-G 3'UTR\*ins/ins* [16, 19, 20]. Собственные исследования показали, что данный материнский и детский генотипы были ассоциированы с ВПС у детей [2]. Тем самым особенности экспрессии HLA-G в материнском микроокружении и в клетках эмбриона могут быть значимыми не только в ограничении иммунного отторжения полуаллогенного эмбриона, но и в развитии, вытекающих из первичного эффекторного иммунного ответа, вторичных провоспалительных реакций. Именно альтерирую-

щий компонент воспаления и является основой для формирования ВПС.

Соответственно, изменять особенности экспрессии HLA-G в материнском микроокружении и в клетках эмбриобласта могут специфические аллогенные и аутогенные антитела. Причем их индивидуальная антигенная специфичность может быть низкой. Интерес к аллогенным антителам против HLA, индуцируемых во время беременности, не стихает с 80-х годов прошлого столетия [13]. Современные исследования на диагностических платформах LUMINEX подтверждают, что более 40% повторнородящих женщин имеют антитела против HLA I и II классов. Причем доказано, что удельный вес женщин, имеющих специфические антитела против отцовских HLA не превышает 20% из всей популяции. Соответственно, из когорты женщин, имеющих антитела к HLA, это будет 50% [18]. При репродуктивных потерях снижается как количество женщин имеющих антитела к HLA I и II классов, так и их специфичность по отношению к отцовским HLA [18]. Неспецифические в отношении отцовских, а значит, и аллогенных эмбриональных HLA антитела не обладают блокирующим эффектом. Они могут быть триггерами в развитии воспалительных реакций в системе «мать — эмбрион/плод» и через это усиливать экспрессию молекул HLA I и II классов.

Надо отметить, что платформа LUMINEX является золотым стандартом для исследований HLA и антител к ним при трансплантации. Гены локуса HLA Ib, как уже говорилось выше, имеют низкий аллельный и антигенный полиморфизм, их продукты фактически не экспрессируются на соматических и иммунокомпетентных клетках организма и поэтому фактически не влияют на трансплантацию. В то же время вполне вероятно, что специфические и/или перекрестно-реагирующие антитела к HLA-G могут вырабатываться и влиять на экспрессию данной молекулы на материнских и эмбриональных клетках, а также связывать растворимые формы sHLA-G.

Настоящее исследование не претендует на изучение ауто- и аллоантител к HLA-DR и HLA-G, так как отсутствует контроль с очищенными антителами и исследование проводилось в прямой иммунофлуоресценции. Для исследования антител в данном формате необходимо проведение непрямой иммунофлуоресценции. Т. е. после первичной инкубации лимфоцитов с сывороткой крови и отмывки их от не связавшихся антител необходима вторичная инкубация с конъюгированными моноклональными антителами к Fc-фрагменту иммуноглобулина G. Именно сопоставление изменений количества клеток (на-

пример, CD3<sup>+</sup>) с флюорисцирующим комплексом HLA-DR<sup>+</sup> сывороточные антитела к HLA-DR<sup>+</sup> моноклональное антитело к Fc-фрагменту иммуноглобулина G, конъюгированное с алофикианином, в образцах с контрольной (с известной концентрацией анти-HLA-DR антител) и исследуемой сыворотками могло дать полуколичественную характеристику антител к HLA-DR и по аналогии к HLA-G. В настоящем исследовании оценивались блокирующий и стимулирующий эффект аллогенных и аутогенных сывороток. Причем наибольший интерес представляли сыворотки женщин и их эффект в отношении собственных молекул HLA-DR и HLA-G, а также этих молекул на лимфоцитах детей, которых они выносили. Сравнивались эффекты сывороток женщин, имеющих двух и более здоровых детей, а также имеющих детей с ВПС. Оценивались эффекты мужских сывороток по отношению к собственным HLA и эти же эффекты сывороток условно здоровых детей и пациентов с ВПС. Как видно из исследования, блокирующий эффект в отношении ауто-HLA-G, расположенных на мембране как CD3<sup>+</sup>, так и CD3<sup>-</sup> лимфоцитах, был наиболее выраженный в женской группе сравнения. В группе мужчин этот эффект на исследуемых популяциях лимфоцитов стремился к нулю, а в группе женщин, имеющих детей с ВПС, напротив, был стимулирующим. Между всеми группами получены значимые различия. Блокирования экспрессии собственных HLA-G на CD3<sup>+</sup> и CD3<sup>-</sup> лимфоцитах многорожавших женщин вполне вероятно обусловлено аутоантителами к данной молекуле. Стимулирующий эффект по отношению к HLA-G на CD3<sup>+</sup> и CD3<sup>-</sup> лимфоцитах женщин, имеющих детей с ВПС, может быть обусловлен, с одной стороны, отсутствием блокирующих аутоантител к данной молекуле, а с другой — наличием в сыворотке крови этих женщин высоко активных липидов [13, 15].

Абсолютно такая же направленность блокирования и стимулирования экспрессии ауто-HLA-DR на CD3<sup>+</sup> и CD3<sup>-</sup> лимфоцитах была выявлена для группы сравнения женщин, основной группы и группы мужчин. Причем стремление к нулевому эффекту у мужчин было наиболее наглядным. Исходя из этого, можно констатировать, что в мужской сыворотке нет аутоантител к HLA-DR. Соответственно, у многорожавших женщин эти антитела присутствуют. Механизм их появления не совсем понятен, возможно, что при индукции антиотцовских антител к HLA-DR, образуются и перекрестно-реагирующие антитела к собственным молекулам. Хотя биологический смысл этих перекрестно-реагирующих антител вполне понятен, они, с одной стороны, блокиру-

ют HLA-DR на эмбриональных клетках, а с другой — на клетках материнского микроокружения. Тем самым может иметь место контролируемое ограничение презентации аллоантигенов эмбриона плода. В исследовании показано, что у женщин, имеющих детей с ВПС, аутоантитела к HLA-DR отсутствуют, возможно, из-за ограниченной стимуляции аллогенными HLA-DR. Помимо этого, в сыворотке крови женщин, имеющих детей с ВПС, имеются биологически активные гуморальные факторы, стимулирующие экспрессию HLA-DR на CD3<sup>+</sup> и CD3<sup>-</sup> лимфоцитах.

Эффекты аутосывороток условно здоровых детей были схожи с действием мужских аутосывороток. Изменения экспрессии HLA-G на CD3<sup>+</sup> и CD3<sup>-</sup> лимфоцитах под воздействием детских сывороток стремились к нулю, что указывает на отсутствие аутоантител к HLA-G. В основной группе детей выраженный стимулирующий эффект аутогенной сыворотки был показан в отношении экспрессии HLA-G на CD3<sup>-</sup> лимфоцитах. Феномен чувствительности В-лимфоцитов к стимуляции экспрессии HLA-DR и HLA-G описан и ранее [15]. Возможно, что биологически активные липиды и амины могут присутствовать в крови и самих детей с ВПС.

Аллогенная женская (материнская) сыворотка обладает выраженным блокирующим эффектом в отношении HLA-G на CD3<sup>+</sup> и CD3<sup>-</sup> лимфоцитах условно здоровых детей, и это указывает на наличие в женской сыворотке крови блокирующих антител не только к аутоHLA-G, но и к HLA-G их детей (в пренатальном периоде — эмбриона/плода). Как уже говорилось выше, молекулы HLA-G обладают низким аллогенным полиморфизмом, поэтому алло- и аутоантитела могут иметь общую специфичность. В то же время в основной группе доминировал стимулирующий эффект аллогенной (материнской) сыворотки, механизм которого обсуждался выше.

Антигенный полиморфизм HLA-DR достаточно выраженный, и беременности стимулируют синтез антиотцовских антител, о чем говорилось выше. Это наглядно продемонстрировано в группе условно здоровых детей, на HLA-DR которых женская (материнская) сыворотка крови влияла блокирующим эффектом. Т. е. в ходе физиологической беременности у женщины сформировались антитела к аллогенным (эмбриональным/плодовым/детским) HLA-DR. Роль этих антител, может быть также в блокировании дополнительных антигенных детерминант. Надо отметить, что аутогенная сыворотка условно здоровых детей, также обладала преимущественно блокирующим эффектом в отношении собственных HLA-DR. Этот феномен требует дальнейше-

го изучения, и объективной оценки аутоантител к HLA-DR.

У детей с ВПС эффекты аутогенных и аллогенных сывороток крови по отношению к изменению экспрессии HLA-DR на CD3<sup>+</sup> и CD3<sup>-</sup> лимфоцитах стремился к нулю. Исключением был стимулирующий эффект детской аутогенной сыворотки на CD3<sup>-</sup> лимфоцитах. Этот феномен может также быть связан с наличием в крови детей с ВПС биологически активных веществ, ко-

торые наибольшее влияние оказывают именно на экспрессию HLA-DR на В-лимфоцитах.

## Заключение

Блокирующая активность женской сыворотки по отношению к аллогенным (эмбриона/плода / ребенка) и аутогенным (собственным) молекулам HLA-G и HLA-DR определяет протективный эффект в отношении формирования септальных врожденных пороков сердца у потомства.

## Список литературы / References

1. Борисенко Д.В., Ивкин А.А., Шукевич Д.Л. Современные методы ограничения системного воспалительного ответа при коррекции врожденных пороков сердца у детей в условиях искусственного кровообращения // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний, 2021. Т. 10, № 2. С. 113-124. [Borisenko D.V., Ivkin A.A., Shukevich D.L. Treatment of systemic inflammatory response syndrome following on-pump pediatric congenital heart surgery. *Kompleksnye problemy serdechno-sosudistykh zabolevaniy = Complex Issues of Cardiovascular Diseases*, 2021, Vol. 10, no. 2, pp. 113-124. (In Russ.)]
2. Деева Н.С., Цепочкина А.В., Шмелевич С.А., Шабалдин А.В. Роль материнских локусов HLA-DR и HLA-G в детерминировании риска формирования спорадических врожденных пороков сердца в последующем поколении // Российский вестник перинатологии и педиатрии, 2021. Т. 66, № 5. С. 42-48. [Deeva N.S., Tsepokina A.V., Shmulevich S.A., Shabaldin A.V. The role of maternal HLA-DR and HLA-G loci in determining the risk of sporadic congenital heart defects in the next generation. *Rossiyskiy Vestnik Perinatologii i Pediatrii = Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*, 2021, Vol. 66, no. 5, pp. 42-48. (In Russ.)]
3. Есина Е.В., Логина Н.Ю., Аляутдина О.С. Роль иммунных взаимодействий в развитии бесплодия: обзор литературы // Русский медицинский журнал. Мать и дитя, 2013. Т. 21, № 1. С. 44-48. [Esina E.V., Logina N.Yu., Alyautdina O.S. The role of immune interactions in the development of infertility: a review of the literature. *Russkiy meditsinskiy zhurnal. Mat i ditya = Russian Medical Journal. Mother and Child*, 2013, Vol. 21, no. 1, pp. 44-48. (In Russ.)]
4. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с. [Lakin G.F. Biometrics]. Moscow: Vysshaya shkola, 1990. 352 p.
5. Хаитов Р.М., Алексеев Л.П., Кофиади И.А. Роль иммуногенетики в решении фундаментальных и прикладных задач персонализированной медицины // Медицина экстремальных ситуаций, 2016. № 3. С. 9-24. [Khaitov R.M., Alexeev L.P., Kofiadi I.A. Role of immunogenetics in addressing fundamental and applied tasks of personalized medicine. *Meditsina ekstremalnykh situatsiy = Medicine of Extreme Situations*, 2016, no. 3, pp. 9-24. (In Russ.)]
6. Шабалдин А.В., Гривцова С.В., Деева Н.С., Шмелевич С.А., Цепочкина А.В., Аникеенко А.А., Шабалдина Е.В., Вавин Г.В. Изменение экспрессии HLA-DR на субпопуляциях лимфоцитов супругов, имеющих детей со спорадическими врожденными пороками сердца без хромосомных заболеваний, под воздействием женской аутосыворотки // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 1. С. 143-148. [Shabaldin A.V., Grivtsova S.V., Deeva N.S., Shmulevich S.A., Tsepokina A.V., Anikeenko A.A., Shabaldina E.V., Vavin G.V. Changes in the expression of HLA-DR on lymphocyte subpopulations of spouses having children with sporadic congenital heart defects without chromosomal diseases, under the influence of female's autoserum. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 1, pp. 143-148. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-CIT-2013.
7. Шабалдин А.В., Шмелевич С.А., Чистякова Г.Н., Ремизова И.И., Лукоянычева Е.Б., Горшкова С.В., Шабалдина Е.В. Особенности аллогенных взаимодействий в краткосрочной культуре лимфоцитов супругов, имеющих детей с врожденными пороками сердца или ранние репродуктивные потери // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 2. С. 279-292. [Shabaldin A.V., Shmulevich S.A., Chistyakova G.N., Remizova I.I., Lukoyanycheva E.B., Gorshkova S.V., Shabaldina E.V. Peculiarities of allogenic interactions in the short-term culture of lymphocytes of spouses who have children with congenital heart diseases or early reproductive losses. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 2, pp. 279-292. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-279-292.
8. Шабалдин А.В., Цепочкина А.В., Долгих О.В., Шабалдина Е.В., Понасенко А.В. Сочетание аллелей HLA-DRB1 как условие реализации риска формирования спорадических врожденных пороков сердца и врожденных пороков развития плода без хромосомных заболеваний // Анализ риска здоровью, 2021. № 1. С. 133-142. [Shabaldin A.V., Tsepokina A.V., Dolgikh O.V., Shabaldina E.V., Ponasenko A.V. Combination of HLA-DRB1 alleles as a factor causing risks of sporadic congenital heart defects and congenital malformations without chromosome diseases. *Analiz riska zdorov'yu = Health Risk Analysis*, 2021, no. 1, pp. 133-142. (In Russ.)]



9. Шабалдин А.В., Деева Н.С., Сухих А.С., Вавин Г.В., Крюков П.М. Изменение экспрессии мембранных молекул HLA-G у женщин, имеющих детей с врожденными пороками сердца, под воздействием фракции гамма-глобулинов, полученной из плазмы крови многопложавших женщин // Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 3. С. 373-376. [Shabaldin A.V., Deeva N.S., Sukhikh A.S., Vavin G.V., Kryukov P.M. Altered expression of cell membrane HLA-G molecules in mothers of children with inborn heart defects upon exposure to plasma gamma-globulin from multiparous women. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2021, Vol. 24, no. 3, pp. 373-376. (In Russ.)]
10. Bradshaw E.A. Screening for critical congenital heart disease: advancing detection in the newborn. *Curr. Opin. Pediatr.*, 2012, Vol. 24, no. 5, pp. 603-608.
11. Chadha S., Behl T., Bungau S., Kumar A., Arora R., Gupta A., Uddin M.S., Zengin G., Aleya L., Setia D., Arora S. Mechanistic insights into the role of pyroptosis in rheumatoid arthritis. *Curr. Res. Transl. Med.*, 2020, Vol. 68, no. 4, pp. 151-158.
12. Chen L., Guan J., Wei Q., Yuan Z., Zhang M. Potential role of "omics" technique in prenatal diagnosis of congenital heart defects. *Clin. Chim. Acta*, 2018, Vol. 482, pp. 185-190.
13. Densmore T.L., Tim Goodnough L., Ali S., Dynis M., Chaplin H. Prevalence of HLA sensitization in female apheresis donors. *Transfusion*, 1999, Vol. 39, no. 1, pp. 103-106.
14. European Platform on Rare Disease Registration. Prevalence charts and tables. Available at: [https://eu-rd-platform.jrc.ec.europa.eu/eurocat/eurocat-data/prevalence\\_en](https://eu-rd-platform.jrc.ec.europa.eu/eurocat/eurocat-data/prevalence_en).
15. Mulder A., Kardol M.J., Kamp J., Uit Het Broek C., Schreuder G.M., Doxiadis I.I., Claas F.H. Determination of the frequency of HLA antibody secreting B-lymphocytes in alloantigen sensitized individuals. *Clin. Exp. Immunol.*, 2021, Vol. 124, no. 1, pp. 9-15.
16. Nilsson L.L., Djuricic S., Hviid T.V.F. Controlling the immunological crosstalk during conception and pregnancy: HLA-G in reproduction. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, 198. doi: 10.3389/fimmu.2014.00198.
17. Persson G., Jørgensen N., Nilsson L.L., Andersen L.H.J., Hviid T.V.F. A role for both HLA-F and HLA-G in reproduction and during pregnancy? *Hum. Immunol.*, 2020, Vol. 81, no. 4, pp. 127-133.
18. Prieto-Casal F., Cabañas-Gadea C., Figueredo-López S., Villagra-Carrón V. Fetomaternal immunization against HLA antigens in women from a Paraguayan population. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud*, 2021, Vol. 19, no. 1, pp. 48-57. [In Spanish]
19. Wang X., Jiang W., Zhang D. Association of 14-bp insertion/deletion polymorphism of HLA-G gene with unexplained recurrent spontaneous abortion: a meta-analysis. *Tissue Antigens*, 2013, Vol. 81, no. 2, pp. 108-115.
20. Xue S., Yang J., Yao F., Xu L., Fan L. Recurrent spontaneous abortions patients have more -14 bp/+14 bp heterozygotes in the 30UT region of the HLA-G gene in a Chinese Han population. *Tissue Antigens*, 2007, Vol. 69, no. 1, pp. 153-155.

---

**Авторы:**

**Шабалдин А.В.** — д.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории пороков сердца ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

**Синицкая А.В.** — к.б.н., научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

---

**Authors:**

**Shabaldin A.V.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Leading Research Associate, Laboratory of Heart Diseases, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

**Sinitckaya A.V.**, PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Genomic Medicine, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

**Шмелевич С.А.** — к.м.н., детский кардиолог  
кардиохирургического отделения ФГБНУ «Научно-  
исследовательский институт комплексных проблем  
сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

**Гришачева Е.О.** — клинический ординатор ФГБНУ  
«Научно-исследовательский институт комплексных  
проблем сердечно-сосудистых заболеваний»,  
г. Кемерово, Россия

**Shmulevich S.A.**, PhD (Medicine), Pediatric Cardiologist,  
Cardiac Surgery Department, Research Institute for Complex  
Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian  
Federation

**Grishacheva E.O.**, Clinical Resident, Research Institute  
for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo,  
Russian Federation

---

Поступила 18.11.2022  
Отправлена на доработку 12.12.2022  
Принята к печати 16.02.2023

---

Received 18.11.2022  
Revision received 12.12.2022  
Accepted 16.02.2023