

## ОСОБЕННОСТИ АЛЛОГЕННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В КРАТКОСРОЧНОЙ КУЛЬТУРЕ ЛИМФОЦИТОВ СУПРУГОВ, ИМЕЮЩИХ ДЕТЕЙ С ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ СЕРДЦА ИЛИ РАННИЕ РЕПРОДУКТИВНЫЕ ПОТЕРИ

Шабалдин А.В.<sup>1</sup>, Шмулевич С.А.<sup>2</sup>, Чистякова Г.Н.<sup>3</sup>, Ремизова И.И.<sup>3</sup>,  
Лукоянычева Е.Б.<sup>4</sup>, Горшкова С.В.<sup>1</sup>, Шабалдина Е.В.<sup>5</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

<sup>2</sup> ГБУЗ Кемеровской области «Кемеровский областной клинический кардиологический диспансер имени академика Л.С. Барбараша», г. Кемерово, Россия

<sup>3</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

<sup>4</sup> ГБУЗ Кемеровской области «Кемеровская областная клиническая больница», г. Кемерово, Россия

<sup>5</sup> ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Кемерово, Россия

**Резюме.** Проведено изучение аллогенных по HLA взаимодействий в краткосрочной культуре лимфоцитов супругов, имеющих детей с врожденными пороками сердца или ранние репродуктивные потери. Обследованы: 21 семейная пара (основная группа), имеющая детей со спорадическими врожденными пороками сердца (дефект межжелудочковой перегородки) без хромосомных заболеваний (ВПС); 50 семейных пар (группа сравнения), имеющих две и более репродуктивные потери (выкидыши, замершие беременности, привычное невынашивание беременности – ПНБ) в ранние сроки гестации (до 9 недель); и 41 семья, имеющая трех и более здоровых детей (контрольная группа). Оценка иммунного ответа в СКЛ оценивалась по увеличению экспрессии HLA-DR в смешанной культуре по отношению к спонтанным культурам лимфоцитов. Первичная окраска женских и мужских лимфоцитов моноклональными антителами к CD45, конъюгированными с различными флуоресцентными красителями (PC-5 и PC-7), позволила оценить иммунный ответ женских лимфоцитов на мужские и наоборот. Проведена оценка супрессорного эффекта женской аутосыыворотки на смешанную культуру лимфоцитов супругов. Результаты исследования показали различие в аллогенных по HLA взаимодействиях в краткосрочной культуре лимфоцитов супругов, имеющих репродуктивные потери и детей с врожденными пороками сердца. Репродуктивные потери были ассоциированы с низким блокирующим эффектом женской аутосыыворотки на аллогенные по HLA взаимодействия в краткосрочной культуре лимфоцитов супругов. Врожденные пороки сердца были ассоциированы с высокой активностью женских В-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>) в краткосрочной смешанной культуре лимфоцитов супругов.

**Ключевые слова:** смешанная культура лимфоцитов, репродуктивные потери, врожденные пороки сердца, HLA-DR

### Адрес для переписки:

Шабалдин Андрей Владимирович  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт  
комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»  
652002, Россия, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6.  
Тел.: 8 (3842) 64-56-50.  
E-mail: weit2007@yandex.ru

### Address for correspondence:

Shabaldin Andrey V.  
Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular  
Diseases  
652002, Russian Federation, Kemerovo, Sosnovy blvrd, 6.  
Phone: 7 (3842) 64-56-50.  
E-mail: weit2007@yandex.ru

### Образец цитирования:

А.В. Шабалдин, С.А. Шмулевич, Г.Н. Чистякова,  
И.И. Ремизова, Е.Б. Лукоянычева, С.В. Горшкова,  
Е.В. Шабалдина «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.  
doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-279-292

© Шабалдин А.В. и соавт., 2019

### For citation:

A.V. Shabaldin, S.A. Shmulevich, G.N. Chistyakova,  
I.I. Remizova, E.B. Lukoyanycheva, S.V. Gorshkova,  
E.V. Shabaldina "Characteristics of allogeneic interactions  
in the short-term cultures of lymphocytes from the parents of  
children with congenital heart disease or early reproductive  
loss", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya  
Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 2, pp. 279-292.  
doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-279-292

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-2-279-292

## CHARACTERISTICS OF ALLOGENEIC INTERACTIONS IN THE SHORT-TERM CULTURES OF LYMPHOCYTES FROM THE PARENTS OF CHILDREN WITH CONGENITAL HEART DISEASE OR EARLY REPRODUCTIVE LOSS

Shabaldin A.V.<sup>a</sup>, Shmulevich S.A.<sup>b</sup>, Chistyakova G.N.<sup>c</sup>, Remizova I.I.<sup>c</sup>, Lukoyanycheva E.B.<sup>d</sup>, Gorshkova S.V.<sup>a</sup>, Shabaldina E.V.<sup>e</sup>

<sup>a</sup> Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

<sup>b</sup> Kemerovo L. Barbarash Cardiological Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

<sup>c</sup> Research Institute of Maternity and Infancy Care, Ekaterinburg, Russian Federation

<sup>d</sup> Regional Hospital, Kemerovo, Russian Federation

<sup>e</sup> Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

**Abstract.** We have studied HLA allogeneic interactions in short-term cultures of lymphocytes from the parents having children with congenital heart defects (CHD), or subject to early reproductive losses. Twenty-one married couples (CHD as the main group) who had children with sporadic CHD (interventricular septal defect) without chromosomal diseases were observed. Fifty married couples (a comparison group) had two or more reproductive losses in early gestation (up to 9 weeks), denoted as PNPs (miscarriages, missed abortions, habitual miscarriages). Forty-one families with three or more healthy children represented a control group. Immune response in cell cultures was evaluated by increasing expression of HLA-DR in a mixed culture, as compared to spontaneous lymphocyte cultures. Initial labeling of female and male lymphocytes with monoclonal antibodies to CD45 conjugated to different fluorescent dyes (PC-5 and PC-7) allowed us to evaluate the immune response of female lymphocytes to males and *vice versa*. The suppressor effect of autologous female serum upon the mixed culture of the lymphocytes of the spouses was also evaluated. Results of the present study showed a difference in HLA allogeneic interactions in the short-term culture of lymphocytes registered for spouses with reproductive losses and children with congenital heart defects. Reproductive losses were associated with a low blocking effect of female auto-serum upon allogeneic HLA interactions in the short-term culture of the lymphocytes of the spouses. Congenital heart defects were associated with high activity of female B-lymphocytes (CD3<sup>+</sup>/HL-DR<sup>+</sup>) in short-term mixed culture of lymphocytes from the spouses.

*Keywords:* mixed lymphocyte culture, HLA-DR, reproductive loss, congenital heart disease

Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 546-2015-0011 «Патогенетическое обоснование разработки имплантатов для сердечно-сосудистой хирургии на основе биосовместимых материалов, с реализацией пациент-ориентированного подхода с использованием математического моделирования, тканевой инженерии и геномных предикторов».

### Введение

Согласно данным литературы, формирование и вынашивание беременности является иммунологическим феноменом, при котором затрагиваются все звенья иммунной системы на локальном и системном уровнях [1]. Остаются актуальными предположения, высказанные в 80-90-х годах прошлого столетия В.И. Говалло (1989), о раство-

римых специфических супрессорных адаптивных факторах, имеющихся у женщин и тормозящих иммунное отторжение зародыша. К этим факторам могут относиться антитела, направленные на собственные антигены иммунной презентации [2, 3]. Если принять во внимание, что антигенпрезентирующие клетки составляют до 10% пула иммунного микроокружения зародыша [4], то снижение специфической иммунной презентации аллоантигенов плода мужского происхождения будет являться существенным фактором и в ограничении эффекторных функций. Кроме того, через молекулы МНС (для человека – HLA) осуществляются антиген-специфические межклеточные контакты (антигенпрезентирующих, Т-хелперных, Т-регуляторных и Т-эффекторных клеток), обеспечивающие вынашивание беременности через прайминг Т-хелперов [5, 6]. Наличие антител к этим молекулам или особенности цитокиновой регуляции могут быть

важным фактором в вынашивании беременности. До формирования плаценты между материнским микроокружением и делящимся полуаллогенным зародышем всегда имеет место иммунный конфликт по HLA. При выношенной беременности этот конфликт носит компенсированный характер, при репродуктивных потерях — декомпенсированный.

Эмбриогенез сердца и связанный с ним тератогенез приходится на 3-6 неделю эмбрионального периода онтогенеза, когда из утолщенного сосуда с сократительной функцией формируется четырехкамерный сложноорганизованный орган с автономной сократительной системой [7]. Влияние различных тератогенов, мутагенов в этот временной промежуток приводит к развитию большого количества (более 140 нозологических форм) комбинированных и изолированных врожденных пороков сердца (ВПС). Модель формирования врожденных пороков сердца включает множественные причины, как правило, не имеющие специфического действия. Речь идет об ассоциативном влиянии комплекса повреждающих экзо- и эндогенных факторов в критические периоды развития эмбриона или отдельных его органов [8], что можно представить через эпигенетическое влияние различных ксенобиотиков и метаболитов на процессы эмбриогенеза. Широко обсуждается вопрос о посттрансляционных модификациях в белках, участвующих в регуляции эмбриогенеза сердца [9, 10]. В то же время именно иммунная система матери поддерживает гомеостаз эмбриона и плода, обеспечивая анти-тератогенную защиту [11]. Тем самым декомпенсированный иммунный конфликт между матерью и эмбрионом по HLA в этот период может активировать тератогенез в сердце.

Поиск материнских и отцовских иммунологических критериев, определяющих иммунные нарушения в системе «мать—эмбрион», как факторов индукции иммунного стресса и альтернативного компонента воспаления, является наиболее перспективным, так как дает возможность разработки методов иммунопрофилактики репродуктивных потерь и рождения детей с ВПС на этапе планирования беременности.

Исходя из этого, **целью настоящей работы** было изучение особенностей аллогенных взаимодействий в краткосрочной культуре лимфоцитов супругов, имеющих детей с врожденными пороками сердца или репродуктивные потери.

## Материалы и методы

Данное исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИ КПССЗ. У всех ро-

дителей до момента включения в исследование было получено информированное согласие на использование биологического материала в научном исследовании по теме «Разработка инновационных подходов в прогнозе, диагностике, лечении и реабилитации врожденных пороков сердца у детей в Кузбасском регионе».

Для выполнения поставленной цели были сформированы три группы семей (основная, сравнения и контрольная группы). Проведено обследование 21 семейной пары (основная группа — ВПС), имеющей детей со спорадическими ВПС (дефект межжелудочковой перегородки) без хромосомных заболеваний. Группу сравнения составили 50 семейных пар, имеющих две и более репродуктивные потери (выкидыши, замершие беременности, привычное невынашивание беременности — ПНБ) в ранние сроки гестации (до 9 недель). Контрольную группу — семьи, имеющие трех и более здоровых детей ( $n = 41$ ).

Обследование всех групп проводили с помощью разработанных и запатентованных методов определения иммунного ответа женских лимфоцитов на мужские лимфоциты, через оценку экспрессии молекулы HLA-DR на их мембране [13, 14].

Все действия по подготовке краткосрочной смешанной культуры лимфоцитов супругов выполняли в боксированном помещении для культуральных работ, в ламинарном шкафу, предназначенном для работ с микроорганизмами 3-4 групп патогенности. Лимфоцитарную взвесь каждого из супругов получали на градиенте плотности 1,077. После двукратной отмывки женские и мужские лимфоциты окрашивали моноклональными антителами к CD45. Для женских лимфоцитов использовали антитела, конъюгированные с флуоресцентным красителем перидин-хлорофиллом (PC-5), а для мужских — PC-7 (BioLegend, США). Далее пробирки с женскими и мужскими лимфоцитами и с соответствующими конъюгатами моноклональных антител с флуоресцентными красителями инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре в темноте. После однократной отмывки в пробирки женских и мужских лимфоцитов вносили по 1000 мкл полной среды (RPMI-1640 с эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС) из расчета 15%, L-глутамина из расчета 2 ммоль, 10 ммоль Нерес-буфера,  $5 \times 10^{-5}$  моль 2-меркаптоэтанол и 50 мкг/мл раствора гентамицина-сульфата). 500 мкл клеточной взвеси в полной ростовой среде переносили в отдельные пробирки, куда добавляли женскую ауто-сыворотку из расчета 10%. Таким образом, получали по две пробирки с женскими и мужскими лимфоцитами: лимфоциты первой пробирки со-

держали в полной ростовой среде, а лимфоциты второй пробирки – с добавлением 10% женской аутосыворотки. Далее в двенадцать пластиковых пробирок для проточной цитофлуориметрии (Beckman Coulter или Becton Dickinson, США) вносили лимфоциты (в концентрации 2000 клеток в 1 мкл) как в полной среде, так и с добавлением 10% аутосыворотки в объеме 200 мкл. Все постановки дублировали, поэтому для каждого этапа использовали две пробирки. Первые две пробирки (№ 1 и № 2) были предназначены для смешанной культуры лимфоцитов (СКЛ), поэтому в каждую пробирку (№ 1 и № 2) вносили и смешивали лимфоциты мужчины и женщины в общем объеме по 100 мкл (конечный объем 200 мкл). В пробирки № 3 и № 4 вносили лимфоциты (200 мкл) женщины, и это была монокультура лимфоцитов женщин. В пробирки № 5 и № 6 вносили лимфоциты (200 мкл) мужчины (супруга), и это – монокультура лимфоцитов мужчины. Аналогичную процедуру проводили для лимфоцитов с добавлением 10% аутосыворотки. Пробирки № 7, 8 – СКЛ с добавлением 10% аутосыворотки; № 9-10 – женская монокультура с 10% женской аутосывороткой и № 11-12 – мужская монокультура с 10% женской аутосывороткой. Далее, закрыв, пробирки помещали в CO<sub>2</sub> инкубатор на 2 часа при 37 °С. После окончания инкубации проводили однократную отмывку лимфоцитов каждой пробирки. На окончательном этапе выполняли окрашивание лимфоцитов (смешанной культуры и отдельных монокультур) с помощью конъюгатов флуоресцентных красителей (флуоресцеин изотиоцианат – FITC и фикоэритрин – PE) с моноклональными антителами к CD3 и HLA-DR, добавляли в каждую пробирку по 5 мкл (Beckman Coulter, США). Соотношение объема 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. После окончательной отмывки в каждую пробирку вносили раствор фиксатора OptiLyse (Beckman Coulter, США) в объеме 300 мкл.

Оценку экспрессии поверхностных маркеров лимфоцитов CD45, CD3, HLA-DR в краткосрочной смешанной культуре лимфоцитов супругов проводили на проточном цитофлуориметре Cytomics FC 500 с программным обеспечением СХР (Beckman Coulter, США).

Для снятия результатов был разработан протокол проточной цитофлуориметрии, представленный на рисунках 1, 2, 3 (см. 2-ю стр. обложки). Использовали пять гистограмм. В первой гистограмме выделяли популяцию лимфоцитов по их

размерам (прямое (малоугловое) светорассеяние – forward scatter – FSL) и по внутриклеточной организации (боковое светорассеяние – side scatter – SSL). В следующих двух гистограммах лимфоциты разделяли на женские, меченные CD45-PC7 (против SSL), и мужские, окрашенные CD45-PC5 (против SSL). Далее в двух следующих гистограммах анализировали, соответственно, мужские и женские субпопуляции лимфоцитов CD3<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> и CD45<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>. Анализ этих субпопуляций проводили как в смешанной культуре лимфоцитов, так и в монокультурах. Для каждой женской и мужской субпопуляции лимфоцитов рассчитывали коэффициент прироста (КП) – удельный вес анализируемой субпопуляции лимфоцитов в смешанной культуре по отношению к ее удельному весу в соответствующей монокультуре:

$$КП_{CD3^+HLA-DR^+} = \frac{((CD3^+HLA-DR^+_{скл.} - CD3^+HLA-DR^+_{кон.}) \times 100}{CD3^+HLA-DR^+_{кон.}}$$

где CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup><sub>скл.</sub> – относительное число субпопуляции CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> в смешанной культуре лимфоцитов, %; CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup><sub>кон.</sub> – относительное число субпопуляции CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> в монокультуре анализируемого донора, %.

$$КП_{CD3^-HLA-DR^+} = \frac{((CD3^-HLA-DR^+_{скл.} - CD3^-HLA-DR^+_{кон.}) \times 100}{CD3^-HLA-DR^+_{кон.}}$$

где CD3<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup><sub>скл.</sub> – относительное число субпопуляции CD3<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup> в смешанной культуре лимфоцитов, %; CD3<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup><sub>кон.</sub> – относительное число субпопуляции CD3<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup> в монокультуре анализируемого донора, %.

$$КП_{CD45^+HLA-DR^+} = \frac{((CD45^+HLA-DR^+_{скл.} - CD45^+HLA-DR^+_{кон.}) \times 100}{CD45^+HLA-DR^+_{кон.}}$$

где CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup><sub>скл.</sub> – относительное число субпопуляции CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> в смешанной культуре лимфоцитов, %; CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup><sub>кон.</sub> – относительное число субпопуляции CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> в монокультуре анализируемого донора, %.

Фактически в СКЛ оценивали краткосрочное увеличение или уменьшение мембранной экспрессии HLA-DR на различных субпопуляциях лимфоцитов по отношению к базовой экспрессии этой молекулы в спонтанных культурах. Следует отметить, что мембранная краткосрочная экспрессия молекул HLA-DR не связана с экспрессией соответствующих генов. Для рецепторов межклеточных контактов показаны их краткосрочные мембранные реаранжировки [15]. Следовательно, изменение экспрессии HLA-DR может также свидетельствовать о краткосрочных

мембранных реаранжировках HLA-DR под воздействием аллогенных межклеточных контактов.

Блокирующий эффект (коэффициент блокирования – КБ) женской аутосыыворотки клеточных взаимодействий в СКЛ рассчитывался по разнице КП соответствующих субпопуляций в СКЛ в полной ростовой среде (с ЭТС) и в ростовой среде с добавлением 10% женской аутосыыворотки. Общая формула:

$$КБ = ((КП_{СКЛ\alpha} - КП_{СКЛ\beta}) \times 100) / |КП_{СКЛ\beta}|,$$

где  $КП_{СКЛ\alpha}$  – коэффициент прироста в СКЛ с 10% женской аутосыывороткой,  $КП_{СКЛ\beta}$  – коэффициент прироста в СКЛ в полной ростовой среде с ЭТС;  $|КП_{СКЛ\beta}|$  – модуль коэффициента прироста в СКЛ в полной ростовой среде с ЭТС.

Отрицательное значение показателя КБ демонстрировало блокирующий эффект женской аутосыыворотки на клеточные реакции в СКЛ, а положительное – стимулирующий.

Кроме того, проводили сравнения КП и КБ в клеточных реакциях женских лимфоцитов против мужских лимфоцитов и мужских против женских. Учитывая современные представления об иммунологии репродукции, признавали, что мужские лимфоциты не могут быть сенсibilизированы к женским молекулам тканевой совместимости, а женские растворимые сыывороточные факторы не имеют тропизма к клеточным реакциям мужских лимфоцитов к женским, и, соответственно, принимали реакции мужских лимфоцитов к женским контрольными для данной семейной пары. Соответствующие коэффициенты обозначали как эффективный коэффициент прироста (ЭКП) и эффективный коэффициент блокирования (ЭКБ). Общая формула эффективных коэффициентов выглядела следующим образом:

$$ЭКП(Б) = ((КП(Б)_{ж} - КП(Б)_{м}) \times 100) / |КП(Б)_{м}|,$$

где  $КП(Б)_{ж}$  – коэффициент прироста или блокирования в клеточных реакциях «женщина против мужчины»;  $КП(Б)_{м}$  – коэффициент прироста или блокирования в клеточных реакциях «мужчина против женщины»;  $|КП(Б)_{м}|$  – модуль коэффициента прироста или блокирования в клеточных реакциях «мужчина против женщины».

В целом в контрольной группе, группе сравнения и основной группе оценивали 52 иммунологических показателя, полученных в процессе иммунных взаимодействий лимфоцитов супругов в краткосрочной СКЛ, в полной ростовой среде и с добавлением 10% женской аутосыыворотки.

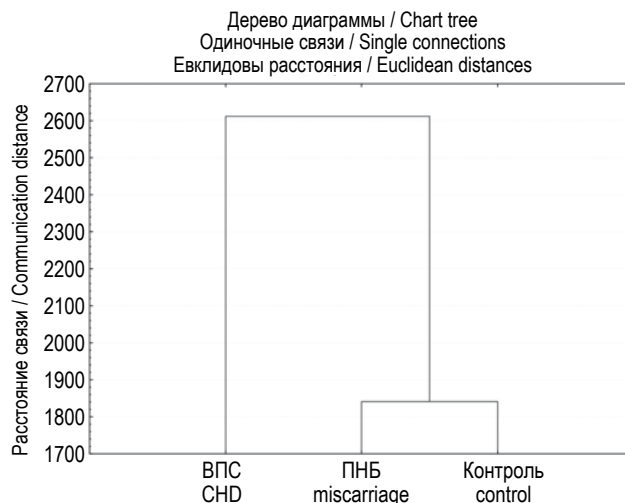
Статистическую обработку результатов исследования проводили при помощи пакета программ Statistica 10.0. Для выявления основных имму-

нологических факторов риска формирования репродуктивных потерь и врожденных пороков сердца использовали кластерный и факторный анализ. Проверку статистических гипотез об отсутствии межгрупповых различий количественных признаков осуществляли с помощью непараметрического критерия Краскела–Уоллиса (Kruskal–Wallis), при отклонении нулевой гипотезы в ходе анализа проводили попарное сравнение групп. Данные представляли в виде медианы (Me), 25-го и 75-го перцентилей ( $Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$ ). Результаты считали статистически значимыми при ошибке менее 5%.

## Результаты

Проведенное исследование показало следующее. По иммунным показателям, отражающим взаимодействия по HLA в системе «мать–эмбрион», группа семей с ВПС имела отдельный кластер по отношению как к контрольной группе, так и к группе с репродуктивными потерями (ПНБ). Эти данные указывают на особые иммунные взаимодействия в системе «мать–эмбрион/плод» при формировании ВПС (рис. 4).

С помощью факторного анализа по иммунологическим показателям, отражающим иммунные взаимодействия по HLA в системе «мать–эмбрион», выделены основные переменные первого и второго факторов для привычного невынашивания беременности и врожденных пороков сердца. Принимая во внимание, что пер-



**Рисунок 4. Кластерный анализ семейных пар контрольной группы (имеют более двух здоровых детей), группы сравнения (привычное невынашивание беременности – ПНБ) и основной группы (имеют детей с врожденными пороками сердца – ВПС)**

Figure 4. Cluster analysis of the couples of the control group (have more than two healthy children), comparison groups (habitual abortion, HA) and the main group (have children with congenital heart disease, CHD)

вый и второй фактор отражали значимую связь с анализируемой патологией, то отрицательный знак перед выявленными переменными отражал отрицательную корреляцию с патологией.

Анализ результатов факторного анализа в группе ПНБ показал, что с неизвестной переменной первого фактора, положительно ассоциированной с невынашиванием беременности, отрицательно коррелировали коэффициенты прироста (КП) экспрессии HLA-DR на CD3<sup>+</sup> лимфоцитах в СКЛ в полной среде с ЭТС, на CD3<sup>-</sup> лимфоцитах в полной среде с ЭТС и в целом HLA-DR, а также КП экспрессии HLA-DR на женских лимфоцитах в СКЛ с добавлением женской аутосыворотки. Для первого фактора была также получена отрицательная корреляция с коэффициентом блокирования (КБ) женской аутосывороткой экспрессии HLA-DR на женских CD3<sup>+</sup> лимфоцитах.

Для второго фактора была получена одна отрицательная корреляция с эффективным коэффициентом прироста (ЭКП) экспрессии HLA-DR на женских CD3<sup>+</sup> лимфоцитах по отношению к соответствующей экспрессии HLA-DR на мужских CD3<sup>+</sup> лимфоцитах в СКЛ в полной среде с добавлением ЭТС.

Полученные нами данные указывают, что главными иммунными компонентами, ассоциированными с репродуктивными потерями, являются вышеперечисленные КП, КБ и ЭКП, а отрицательное значение показателей отражает обратное действие этих переменных: чем они меньше, тем выше неизвестная переменная, ассоциированная с ПНБ.

Факторный анализ для основной группы ВПС выявил, что с первым фактором были отрицательно ассоциированы КП экспрессии HLA-DR на всех лимфоцитах женщин в СКЛ с ЭТС, КП экспрессии HLA-DR на CD3<sup>+</sup> лимфоцитах женщин в СКЛ с добавлением 10% женской аутосыворотки и КП экспрессии HLA-DR на всех лимфоцитах женщин в СКЛ с добавлением 10% женской аутосыворотки, а также ЭКП экспрессии HLA-DR на женских лимфоцитах CD3<sup>-</sup> и в целом на всех женских лимфоцитах в СКЛ с добавлением 10% женской аутосыворотки по отношению к соответствующим мужским СКЛ.

Со вторым фактором были положительно ассоциированы КП экспрессии HLA-DR на CD3<sup>-</sup> лимфоцитах женщин в СКЛ с добавлением 10% женской аутосыворотки и КБ женской аутосыворотки экспрессии HLA-DR на женских CD3<sup>-</sup> лимфоцитах, а также на всех женских лимфоцитах.

Более детально особенности материнско-отцовских иммунных взаимодействий по HLA изу-

чены при попарном сравнении показателей СКЛ контрольной группы, группы сравнения ПНБ и основной группы ВПС. Данные представлены в таблицах 1 и 2.

Как видно из таблицы 1, КП в СКЛ в полной среде с ЭТС различались между группами. В контрольной группе семей, имеющих двух и более детей, положительный КП экспрессии HLA-DR в СКЛ в полной среде с ЭТС регистрировался на женских CD3<sup>-</sup> лимфоцитах, а отрицательный КП экспрессии HLA-DR в тех же условиях – на женских CD3<sup>+</sup> лимфоцитах. Известно, что фенотип CD3<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> присущ активным Т-лимфоцитам, а фенотип CD3<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> – В-лимфоцитам. Краткосрочное взаимодействие аллогенных лимфоцитов в СКЛ в полной питательной среде с ЭТС приводит к угнетению экспрессии HLA-DR на активных Т-лимфоцитах. Возможно, феномен угнетения мембранной экспрессии связан с клеточными взаимодействиями различных субпопуляций женских Т-лимфоцитов при их контакте с аллогенными HLA. На В-лимфоцитах молекула HLA-DR является основной молекулой презентации растворимых антигенов, и увеличение ее экспрессии может отражать межклеточные кооперации женских лимфоцитов.

В то же время в группе ПНБ в СКЛ в полной среде с ЭТС имело место повышение экспрессии HLA-DR на активных женских Т-лимфоцитах, по отношению к спонтанной культуре ( $p < 0,01$ ). Повышение экспрессии HLA-DR на В-лимфоцитах не имело достоверных отличий от контрольной группы.

Группа ВПС имела схожий с контрольной группой показатель КП экспрессии HLA-DR на Т-лимфоцитах и значительно более высокий, чем в контрольной группе, показатель КП экспрессии HLA-DR на В-лимфоцитах ( $p < 0,05$ ).

Кроме того, по КП экспрессии HLA-DR в СКЛ в полной среде с ЭТС на женских активных Т-лимфоцитах и женских В-лимфоцитах группа ПНБ достоверно значимо отличалась от основной группы с ВПС ( $p < 0,01$ ).

Достоверно значимое отличие между группой ВПС и контрольной группой получено по КП экспрессии HLA-DR в СКЛ с добавлением женской аутосыворотки на В-лимфоцитах (фенотип CD3<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>) ( $p < 0,01$ ). При сравнении КП экспрессии HLA-DR в СКЛ с добавлением женской аутосыворотки на В-лимфоцитах (фенотип CD3<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>) положительное значение данного показателя выявлено в группах контроля и ВПС, причем в группе ВПС значение КП было на порядок выше ( $p < 0,01$ ), а в группе сравнения данный КП был отрицательным ( $p_{1-2, 2-3} < 0,01$ ).

**ТАБЛИЦА 1. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ (ПО ОТНОШЕНИЮ К КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЕ) ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ, ПОЛУЧЕННЫХ В СКЛ СЕМЕЙНЫХ ПАР, В ГРУППАХ С РЕПРОДУКТИВНЫМИ ПОТЕРЯМИ (ПНБ) И С ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ СЕРДЦА (ВПС), Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)**

TABLE 1. COMPARATIVE ANALYSIS (IN RELATION TO THE CONTROL GROUP) OF IMMUNOLOGICAL PARAMETERS OBTAINED IN MLC OF MARRIED COUPLES, IN GROUPS WITH REPRODUCTIVE LOSSES AND CONGENITAL HEART DEFECTS (CHD), Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

Иммунные предикторы Immune predictors	Контроль Control	Сравнение, ПНБ Comparison, HA	Основная, ВПС Main, CHD	p <sub>1-2</sub>	p <sub>1-3</sub>	p <sub>2-3</sub>
КП СКЛ ЭТС HLA-DR <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> GF MLC FBS HLA-DR <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup>	-16,6 (-30,9 – -2,3)	29,1 (-8,6-66,6)	-12,8 (-28,5-2,9)	p < 0,01		p < 0,01
КП СКЛ ЭТС HLA-DR <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> GF MLC FBS HLA-DR <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup>	23,4 (5,5-41,2)	2,8 (-11,1-16,6)	71,8 (6,5-137,2)		p < 0,05	p < 0,01
КП СКЛ ауто HLA-DR <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> GF MLC auto HLA-DR <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup>	14,2 (4,52-23,81)	-1,7 (-17,2-13,7)	114,3 (6,6-222,1)		p < 0,01	p < 0,01
КБ СКЛ ауто/ ЭТС HLA-DR <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CB MLC auto/FBS HLA-DR <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup>	133,9 (77,8-189,9)	-133,5 (-248,9 – -18,1)	36,1 (-44,4-116,6)	p < 0,001	p < 0,01	p < 0,001
КБ СКЛ ауто/ ЭТС HLA-DR <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> CB MLC auto/FBS HLA-DR <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup>	-12,7 (-76,9-51,4)	-45,2 (-99,2-8,65)	1651,6 (-603,3-3906,7)		p < 0,001	p < 0,001
КБ СКЛ ауто/ ЭТС HLA-DR <sup>+</sup> CB MLC auto/FBS HLA-DR <sup>+</sup>	16,7 (-53,9-87,4)	-59,9 (-118,9 – -1,1)	104,2 (4,6-203,7)	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,001

**Примечание.** Представлены только достоверно значимые показатели. КП СКЛ ЭТС HLA-DR<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> – коэффициенты прироста экспрессии HLA-DR на CD3<sup>+</sup> лимфоцитах в СКЛ в полной среде с ЭТС; КП СКЛ ЭТС HLA-DR<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> – коэффициенты прироста экспрессии HLA-DR на CD3<sup>-</sup> лимфоцитах в СКЛ в полной среде с ЭТС; КП СКЛ ауто HLA-DR<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> – коэффициенты прироста экспрессии HLA-DR на CD3<sup>-</sup> лимфоцитах в СКЛ с добавлением 10% женской аутосыворотки; КБ СКЛ ауто/ЭТС HLA-DR<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> – коэффициенты блокирования экспрессии HLA-DR женской аутосывороткой на женских CD3<sup>+</sup> лимфоцитах в СКЛ с добавлением 10% женской аутосыворотки по отношению к СКЛ с ЭТС; КБ СКЛ ауто/ЭТС HLA-DR<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> – коэффициенты блокирования экспрессии HLA-DR женской аутосывороткой на женских CD3<sup>-</sup> лимфоцитах в СКЛ с добавлением 10% женской аутосыворотки по отношению к СКЛ с ЭТС; КБ СКЛ ауто/ЭТС HLA-DR<sup>+</sup> – коэффициенты блокирования экспрессии HLA-DR женской аутосывороткой на женских лимфоцитах в СКЛ с добавлением 10% женской аутосыворотки по отношению к СКЛ с ЭТС.

Note. Represented only significant indicators. GF MLC FBS HLA-DR<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>, growth factors of HLA-DR expression on CD3<sup>+</sup> lymphocytes in MLC in complete medium with FBS; GF MLC FBS HLA-DR<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>, growth factors of HLA-DR expression on CD3<sup>-</sup> lymphocytes in MLC in complete medium with FBS; GF MLC auto HLA-DR<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>, growth factors of HLA-DR expression on CD3<sup>-</sup> lymphocytes in MLC with the addition of 10% of the female auto-serum; CB MLC auto/FBS HLA-DR<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>, coefficients of blocking the expression of HLA-DR by female auto-serum on female CD3<sup>+</sup> lymphocytes in MLC with the addition of 10% of female auto-serum to MLC with FBS; CB MLC auto/FBS HLA-DR<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>, coefficients of blocking the expression of HLA-DR by female auto-serum on female CD3<sup>-</sup> lymphocytes in MLC with the addition of 10% of female auto-serum to MLC with FBS; CB MLC auto/FBS HLA-DR<sup>+</sup>, coefficients of blocking the expression of HLA-DR by female auto-serum serum on female lymphocytes in MLC with the addition of 10% of female auto-serum to MLC with FBS.

Важные отличия между группами выявлены при анализе блокирующей активности женской сыворотки на краткосрочную СКЛ, отраженной в блокирующем коэффициенте (КБ).

В контрольной группе присутствие женской ауто сыворотки увеличивало КП в сравниваемых СКЛ на женских активных Т-лимфоцитах (фенотип  $CD3^+/HLA-DR^+$ ). КБ для данной субпопуляции лимфоцитов был положительным. Напротив, в контрольной группе для В-лимфоцитов (фенотип  $CD3^-/HLA-DR^+$ ) КБ был отрицательным. В целом, без деления на субпопуляции, экспрессия HLA-DR на женских лимфоцитах под воздействием женской ауто сыворотки в СКЛ увеличивалась. КБ для всех HLA-DR был положительным.

В группе ПНБ как для активных женских Т-лимфоцитов, так и для В-лимфоцитов и в целом для HLA-DR КБ были отрицательными, что обусловлено подавлением женской ауто сывороткой экспрессии HLA-DR на всех субпопуляциях женских лимфоцитов в СКЛ. Значения КБ были достоверно ниже в группе сравнения, чем в контроле, для активных женских Т-лимфоцитов (фенотип  $CD3^+/HLA-DR^+$ ) и в целом для HLA-DR ( $p < 0,001$  и  $p < 0,01$  соответственно).

Для группы ВПС КБ был положительным для всех анализируемых субпопуляций лимфоцитов. Это означало, что добавление в СКЛ женской ауто сыворотки усиливало экспрессию HLA-DR на мембране лимфоцитов. Достоверно значимые различия между основной группой и группой контроля были достигнуты для всех КБ (табл. 3). Для активных женских Т-лимфоцитов (фенотип  $CD3^+/HLA-DR^+$ ) КБ в основной группе был достоверно ниже, чем в контрольной ( $p < 0,01$ ), а для женских В-лимфоцитов и всех лимфоцитов — достоверно выше ( $p < 0,001$  и  $p < 0,01$  соответственно).

Все три показателя КБ были достоверно выше в основной группе, чем в группе сравнения (ПНБ) ( $p < 0,001$ ). Эти результаты показывают принципиальные различия между иммунными нарушениями в системе «мать—эмбрион/плод», ассоциированными с репродуктивными потерями и с врожденными пороками развития сердца эмбриона/плода/новорожденного.

Как уже говорилось выше, разработанная и запатентованная система оценки аллогенных взаимодействий по HLA в краткосрочной смешанной культуре лимфоцитов супругов позволяет оценивать как особенности иммунного ответа (экспрессия HLA-DR) женских лимфоцитов на мужские, так и наоборот, и, принимая во внимание возможности дополнительного вну-

треннего контроля через несенсибилизированные женскими HLA мужские лимфоциты, ввели дополнительные эффективные коэффициенты прироста (ЭКП) или блокирования (ЭКБ), формула которых представлена в материалах и методах. Суть этих коэффициентов сводится к оценке прироста (положительный знак перед значением) или подавления (отрицательный знак перед значением) того или иного иммунного эффекта в женских СКЛ по отношению к соответствующим мужским СКЛ. Именно эти ЭКП и ЭКБ могут быть основой для рутинной оценки иммунных нарушений по HLA в системе «мать—эмбрион/плод» (табл. 2).

Из таблицы 2 видно, что для контрольной группы ЭКП экспрессии HLA-DR в СКЛ с ЭТС был отрицательным как для активных женских Т-лимфоцитов, так и для В-лимфоцитов и в целом для всех лимфоцитов, экспрессирующих HLA-DR. Эти данные указывают на то, что при выношенной (без патологии плода) беременности уровень КП экспрессии HLA-DR в различных субпопуляциях женских лимфоцитов в СКЛ с ЭТС всегда ниже, чем тот же самый КП на мужских лимфоцитах. По отношению к контрольной мужской СКЛ соответствующая женская СКЛ всегда ниже, возможно, из-за ограничивающих клеточных взаимодействий внутри женских лимфоцитов.

В группе ПНБ эти же показатели имели отрицательное значение, что указывает на общую тенденцию более низких КП экспрессии HLA-DR на лимфоцитах в женских СКЛ по отношению к мужским. В то же время такие показатели, как ЭКП СКЛ ЭТС женщ./муж.  $HLA-DR^+CD3^-$  и ЭКП СКЛ ЭТС женщ./муж.  $HLA-DR^+$ , были достоверно выше в группе ПНБ, чем в контрольной группе ( $p < 0,05$ ). Эти данные показывают, что у женщин с репродуктивными потерями имело место снижение межклеточного ограничения регуляции мембранной экспрессии молекул HLA-DR при аллогенных взаимодействиях.

В семейных парах, имеющих детей с ВПС, КП экспрессии HLA-DR на женских В-лимфоцитах (фенотип  $CD3^-/HLA-DR^+$ ) в СКЛ с ЭТС был выше, чем соответствующий КП в мужской СКЛ. Таким образом, в основной группе с ВПС клеточного ограничения регуляции экспрессии HLA-DR на женских В-лимфоцитах в СКЛ с ЭТС нет. В то же время по субпопуляции активных Т-лимфоцитов (фенотип  $CD3^+/HLA-DR^+$ ) имело место выраженное снижение ЭКП в СКЛ с ЭТС как по отношению к контрольной группе ( $p < 0,01$ ), так и к группе сравнения ( $p < 0,01$ ). Такие значимые изменения клеточных ЭКП в ос-



**ТАБЛИЦА 2. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ (ПО ОТНОШЕНИЮ К КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЕ) ЭФФЕКТИВНЫХ КОЭФФИЦИЕНТОВ ПРИРОСТА ЖЕНСКИХ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПО ОТНОШЕНИЮ К МУЖСКИМ В ГРУППАХ С РЕПРОДУКТИВНЫМИ ПОТЕРЯМИ (ПНБ) И С ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ СЕРДЦА (ВПС), Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)**

TABLE 2. COMPARATIVE ANALYSIS (IN RELATION TO THE CONTROL GROUP) OF EFFECTIVE COEFFICIENTS OF GROWTH OF FEMALE IMMUNOLOGICAL PARAMETERS IN RELATION TO MALES IN GROUPS WITH REPRODUCTIVE LOSSES AND CONGENITAL HEART DISEASES (CHD), Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

Иммунные предикторы Immune predictors	Контроль Control	Сравнение, ПНБ Comparison, HA	Основная, ВПС Main, CHD	p <sub>1-2</sub>	p <sub>1-3</sub>	p <sub>2-3</sub>
<b>ЭКП СКЛ ЭТС женщ./муж.</b> <b>HLA-DR<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup></b> EGF MLS FBS female/male HLA-DR <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup>	-103,6 (-169,6 – -37,6)	-47,5 (-227,3-132,4)	-555,1 (-1175,8-65,7)		p < 0,01	p < 0,01
<b>ЭКП СКЛ ЭТС женщ./муж.</b> <b>HLA-DR<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup></b> EGF MLC FBS female/male HLA-DR <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup>	-275,6 (-500,4 – -50,8)	-34,1 (-142,6-74,5)	53,2 (-40,4-146,5)	p < 0,05	p < 0,01	
<b>ЭКП СКЛ ЭТС женщ./муж.</b> <b>HLA-DR<sup>-</sup></b> EGF MLC FBS female/male HLA-DR <sup>-</sup>	-251,5 (-459,9 – -43,1)	-15,3 (-90,3-59,6)	-121,1 (-269,8-27,7)	p < 0,05		
<b>ЭКБ аутоcыв. женщ./муж.</b> <b>HLA-DR<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup></b> ECB auto female/male HLA-DR <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup>	-99,8 (-306,1-106,4)	-886,7 (-2255,3-481,9)	1988,7 (-2041,3-6018,7)	p < 0,01	p < 0,001	p < 0,001
<b>ЭКБ аутоcыв. женщ./муж.</b> <b>HLA-DR<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup></b> ECB auto female/male HLA-DR <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup>	-81,2 (-283,4-121,1)	246,1 (-18,5-510,7)	175,3 (-55,5-406,2)	p < 0,01	p < 0,05	
<b>ЭКБ аутоcыв. женщ./муж.</b> <b>HLA-DR<sup>-</sup></b> ECB auto female/male HLA-DR <sup>-</sup>	-120,6 (-281,6-40,4)	95,1 (-247,4-437,6)	981,7 (-411,5-2374,8)	p < 0,05	p < 0,001	p < 0,01

**Примечание.** Представлены только достоверно значимые показатели. ЭКП СКЛ ЭТС женщ./муж. HLA-DR<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> – эффективный коэффициент прироста экспрессии HLA-DR на активных женских Т-лимфоцитах в женской СКЛ с ЭТС по отношению к соответствующей мужской; ЭКП СКЛ ЭТС женщ./муж. HLA-DR<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> – эффективный коэффициент прироста экспрессии HLA-DR на женских В-лимфоцитах в женской СКЛ с ЭТС по отношению к соответствующей мужской; ЭКП СКЛ ЭТС женщ./муж. HLA-DR<sup>-</sup> – эффективный коэффициент прироста экспрессии HLA-DR на женских лимфоцитах в женской СКЛ с ЭТС по отношению к соответствующей мужской; ЭКБ аутоcыв. женщ./муж. HLA-DR<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> – эффективный коэффициент блокирования женской аутоcывороткой экспрессии HLA-DR на активных женских Т-лимфоцитах в женской паре СКЛ с аутоcывороткой и СКЛ с ЭТС по отношению к соответствующей мужской паре СКЛ; ЭКБ аутоcыв. женщ./муж. HLA-DR<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> – эффективный коэффициент блокирования женской аутоcывороткой экспрессии HLA-DR на женских В-лимфоцитах в женской паре СКЛ с аутоcывороткой и СКЛ с ЭТС по отношению к соответствующей мужской паре СКЛ; ЭКБ аутоcыв. женщ./муж. HLA-DR<sup>-</sup> – эффективный коэффициент блокирования женской аутоcывороткой экспрессии HLA-DR на женских лимфоцитах в женской паре СКЛ с аутоcывороткой и СКЛ с ЭТС по отношению к соответствующей мужской паре СКЛ.

Note. Represented only significant indicators. EGF MLS FBS female/male HLA-DR<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>, effective growth factor of HLA-DR expression in active female T lymphocytes in female MLC with FBS relative to the corresponding male; EGF MLC FBS female/male HLA-DR<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>, effective growth factor of HLA-DR expression in female B lymphocytes in female MLC with FBS relative to the corresponding male; EGF MLC FBS female/male HLA-DR<sup>-</sup>, effective growth factor of HLA-DR expression in female lymphocytes in female MLC with FBS relative to the corresponding male; ECB autos female/male HLA-DR<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>, effective coefficient of blocking the expression of HLA-DR by female auto-serum on active female T lymphocytes in female MLC with auto-serum and MLC with FBS in relation to the corresponding male MLC pair; ECB auto female/male HLA-DR<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>, effective coefficient of blocking the expression of HLA-DR by female auto-serum on female B lymphocytes in female MLC with autogyotic and MLC with FBS in relation to the corresponding male MLC pair; ECB auto female/male HLA-DR<sup>-</sup>, effective coefficient of blocking the expression of HLA-DR by female auto-serum on female lymphocytes in female MLC with auto-serum and MLC with FBS in relation to the corresponding male MLC pair.

новой группе, возможно, и определяют ее в отдельный кластер по характеру иммунных взаимодействий в системе «мать—эмбрион/плод».

Оценивая блокирующий эффект женской сыворотки с позиции соответствующих контрольных показателей в мужских СКЛ, были выявлены принципиальные различия между сравниваемыми группами.

Как видно из таблицы 2, ЭКБ экспрессии HLA-DR на всех субпопуляциях лимфоцитов были отрицательными. Это означает, что при нормально выношенных беременностях КБ в женских СКЛ был намного выше, чем в мужских СКЛ. То есть присутствие женской ауто-сыворотки подавляет экспрессию HLA-DR только на женских лимфоцитах. Соответственно, с учетом внутреннего контроля по мужским СКЛ и КБ в них, можно считать, что женская ауто-сыворотка оказывает блокирующий эффект на аллогенные иммунные реакции при наличии соответствующей аллогенной сенсibilизации, что реализуется при физиологической беременности.

Группа ПНБ достоверно отличалась от контрольной по всем трем показателям ЭКБ. Так, ЭКБ ауто-сыв. женщ./муж. HLA-DR<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> и ЭКБ ауто-сыв. женщ./муж. HLA-DR<sup>+</sup> были положительными и достоверно выше, чем в группе контроля ( $p < 0,01$  и  $p < 0,05$  соответственно). Показатель ЭКБ ауто-сыв. женщ./муж. HLA-DR<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> был отрицательным и достоверно ниже, чем в контрольной группе ( $p < 0,01$ ). Разбалансированность блокирующих эффектов женской ауто-сыворотки на клеточные реакции (с учетом контроля по мужским СКЛ) может быть основой для формирования репродуктивных потерь.

В группе ВПС все анализируемые ЭКБ женской ауто-сыворотки были положительными. По этим показателям достигнуты достоверно значимые различия между основной и контрольной группами (табл. 2). Кроме того, по ЭКБ ауто-сыв. женщ./муж. HLA-DR<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> и ЭКБ ауто-сыв. женщ./муж. HLA-DR<sup>+</sup> были получены достоверно значимые различия между основной группой и группой сравнения ( $p < 0,001$  и  $p < 0,01$  соответственно). Таким образом, в группе семей, имеющих детей с ВПС, женская ауто-сыворотка не ограничивает аллогенные по HLA-DR клеточные реакции женских лимфоцитов на мужские лимфоциты с учетом контрольных мужских СКЛ. С учетом клеточных ЭКП можно говорить об особенностях иммунных нарушений в системе «мать—эмбрион/плод» при формировании ВПС, которые выражаются в отсутствии клеточного ограничения регуляции экспрессии HLA-DR на женских В-лимфоцитах и отсутствии блокирующего эффекта женской ауто-сыворотки на аллогенные реакции лимфоцитов женщины в отношении мужских HLA-DR.

Для выявления иммунологических предикторов репродуктивных потерь и ВПС был проведен линейный регрессионный анализ по анализируемым показателям (табл. 3 и 4). В таблицах 3 и 4 представлены только достоверно значимые  $\beta$ -коэффициенты (отражают относительное влияние предиктора на зависимую переменную) и В-коэффициенты (отражают прогностическую значимость предиктора).

Выявлено, что в группе репродуктивных потерь с ПНБ имелся единственный достоверно значимый предиктор. Им оказался КБ женской

**ТАБЛИЦА 3. МНОЖЕСТВЕННЫЙ ЛИНЕЙНЫЙ РЕГРЕССИОННЫЙ АНАЛИЗ ПРЕДИКТОРОВ РЕПРОДУКТИВНЫХ ПОТЕРЬ (ПРИВЫЧНОГО НЕВЫНАШИВАНИЯ БЕРЕМЕННОСТИ – ПНБ)**

TABLE 3. MULTIPLE LINEAR REGRESSION ANALYSIS OF PREDICTORS OF REPRODUCTIVE LOSSES (HABITUAL ABORTION, HA)

Контроль/ПНБ Control/HA	$\beta$ -коэффициент $\beta$ coefficient	Стандартная ошибка $\beta$ -коэффициента Standard error $\beta$ coefficient	В-коэффициент B coefficient	Стандартная ошибка В-коэффициента Standard error B coefficient	р-уровень значимости p value
Свободный член Free member			0,824	0,147	0,002
КБ СКЛ ауто/ЭТС HLA-DR <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CB MLC auto/FBS HLA-DR <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup>	-1,005	0,367	-0,004	0,001	0,041

**Примечание.** Представлены только достоверно значимые показатели. КБ СКЛ ауто/ЭТС HLA-DR<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> – коэффициенты блокирования экспрессии HLA-DR женской ауто-сывороткой на женских CD3<sup>+</sup> лимфоцитах в СКЛ с добавлением 10% женской ауто-сыворотки по отношению к СКЛ с ЭТС.

Note. Only significant figures are presented. CB MLC auto/FBS HLA-DR<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>, coefficients of blocking of HLA-DR expression by female auto-serum on female CD3<sup>+</sup> lymphocytes in MCL with the addition of 10% of female auto-serum to MCL with FBS.

**ТАБЛИЦА 4. МНОЖЕСТВЕННЫЙ ЛИНЕЙНЫЙ РЕГРЕССИОННЫЙ АНАЛИЗ ПРЕДИКТОРОВ ВРОЖДЕННЫХ ПОРОКОВ СЕРДЦА (ВПС)**

TABLE 4. MULTIPLE LINEAR REGRESSION ANALYSIS OF PREDICTORS OF CONGENITAL HEART DISEASE (CHD)

Контроль/ВПС Control/HA	$\beta$ -коэффициент $\beta$ coefficient	Стандартная ошибка $\beta$ -коэффициента Standard error $\beta$ coefficient	$B$ -коэффициент B coefficient	Стандартная ошибка $B$ -коэффициента Standard error B coefficient	$p$ -уровень значимости p value
Свободный член Free member			0,718	0,264	0,030
ЭКП СКЛ ЭТС женщ/муж HLA-DR <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> ECG MLC FBS female/male HLA-DR <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup>	1,119	0,609	0,001	0,001	0,039

**Примечание.** Представлены только достоверно значимые показатели. ЭКП СКЛ ЭТС женщ/муж HLA-DR<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> – эффективный коэффициент прироста экспрессии HLA-DR на женских В-лимфоцитах в женской СКЛ с ЭТС по отношению к соответствующей мужской.

Note. Only significant figures are presented. ECG MLC FBS female/male HLA-DR<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>; effective growth factor of HLA-DR expression in female B lymphocytes in female MLC with FBS relative to the corresponding male.

аутосывороткой экспрессии HLA-DR в СКЛ на женских Т-активированных лимфоцитах. Этот показатель имел отрицательное значение, что указывает на то, что чем ниже КБ для данной субпопуляции лимфоцитов, тем вероятнее развитие ПНБ в данной семейной паре. КБ для женских Т-активированных лимфоцитов, как и ЭКП для данной субпопуляции лимфоцитов, был достоверно ниже в группе с ПНБ, чем в контрольной группе.

Эффект выраженного подавления супрессорными факторами женской аутосыворотки аллогенной реактивности Т-активированных лимфоцитов может быть связан не только с эффекторными Т-лимфоцитами, но и с регуляторными субпопуляциями, что может лежать в основе патогенеза репродуктивных потерь.

Линейная регрессия по анализируемым иммунологическим показателям в группе ВПС выявила также единственный предиктор. Им оказался ЭКП экспрессии HLA-DR в женской СКЛ с ЭТС по отношению к соответствующей мужской СКЛ на женских В-лимфоцитах. Показатель был положительным, и это указывало, что чем выше данный ЭКП, тем больше вероятность формирования ВПС в данной семейной паре. Следует отметить, что выше было показано достоверно значимое увеличение экспрессии HLA-DR на В-лимфоцитах в основной группе по сравнению с контрольной и увеличение этой экспрессии женской аутосывороткой.

Следовательно, полученные нами результаты указывают на то, что иммунологическое звено патогенеза ВПС связано с активацией гумораль-

ного иммунитета и развитием экссудативного воспаления.

## Обсуждение

Иммунные нарушения в системе «мать-эмбрион/плод» являются важным звеном патогенеза репродуктивных потерь. Ключевыми клетками, определяющими вынашивание беременности, являются Т3-хелперные лимфоциты (Treg cell). Активация Treg cell в ранние сроки беременности объясняется влиянием на них прогестерона через соответствующий рецептор [16]. Доказана высокая экспрессия рецептора к прогестерону на мембране маточных Treg cell [16]. Кроме того, активация данных клеток связана со способностью распознавать эмбриональные HLA, экспрессируемые на полуаллогенном зародыше и эмбрионе [17]. Таким образом, ограничение цитотоксических и киллерных эффекторных иммунных ответов по отношению к полуаллогенному зародышу связано с клеточной регуляцией через сенсублизированные Treg cell. Несмотря на то, что в настоящем исследовании напрямую не была определена роль этих лимфоцитов в торможении клеточных реакций материнских лимфоцитов против аллогенных по HLA супружеских лимфоцитов, тем не менее продемонстрировано, что уровень КП экспрессии HLA-DR в различных субпопуляциях женских лимфоцитов в СКЛ с ЭТС всегда ниже, чем тот же самый КП на мужских лимфоцитах. Как уже говорилось выше, именно аллогенный по HLA иммунный ответ мужских несенсиблизированных лимфоцитов на женские учитывали

как контроль, где, по-видимому, нет сенсibilизированных Treg cell. Проведенные исследования показали, что ЭКП по клеточным реакциям для всех субпопуляций лимфоцитов, экспрессирующих HLA-DR в контрольной группе, имели всегда отрицательные значения и достигали минус 500%. При невынашивании ранних сроков беременности средние значения ЭКП клеточных реакций достоверно превышали показатели контрольной группы и находились как в отрицательных, так и в положительных интервалах. Эти данные демонстрировали нарушения клеточной регуляции при репродуктивных потерях, в частности ограничение иммунных реакций на аллогенные HLA, в том числе и через Treg cell.

Другой часто обсуждаемый вопрос в сфере иммунологии репродукции связан с ролью женских гуморальных факторов, ограничивающих отторжение плода [2, 3]. С 80-х годов прошлого столетия активно изучалась роль материнских антител к HLA в вынашивании и невынашивании беременности. Было неоднократно показано, что многорожавшие женщины имеют высокий титр этих антител. Однако рядом авторов выявлены положительные ассоциативные связи между уровнями материнских антител к HLA супруга и репродуктивными потерями [3]. С этих позиций остается открытым вопрос о роли антител к HLA в поддержании беременности.

Проведенное исследование показало, что в контрольной группе в женской сыворотке отсутствуют факторы, блокирующие аллогенные по HLA-DR иммунные реакции мужских лимфоцитов на женские лимфоциты. Это было продемонстрировано при сравнении мужских СКЛ с 10% женской ауто-сывороткой и СКЛ с ЭТС. В то же время при сравнении соответствующих СКЛ «женщина против мужчины» в контрольной группе для разных субпопуляций лимфоцитов обнаруживался как блокирующий, так и активирующий эффекты. В представленной модели маловероятно, что эффекты изменения экспрессии HLA-DR на различных субпопуляциях лимфоцитов в СКЛ связаны с антителами к ауто-HLA-DR. Не исключено, что подавление экспрессии HLA-DR на В-лимфоцитах женской ауто-сывороткой обусловлено наличием в ней аутоиммунных антител с собственным HLA-DR. Эффект женской ауто-сыворотки на экспрессию HLA-DR в женских субпопуляциях лимфоцитов, предположительно, связан с преимущественным праймингом Т2- и Т3-хелперных лимфоцитов и секретируемых ими интерлейкинов. Ранее было показано, что в первый триместр беременности в системном и локальном иммунитете домини-

руют медиаторные маркеры Т2- и Т3-хелперного иммунного ответа (IL-4, IL-3, IL-8, IL-10, IL-13, IL-14, TGF-β), что позволяет выносить беременность на данном сроке [18]. Именно IL-10 подавляет экспрессию HLA-DR на всех субпопуляциях лимфоцитов, в том числе и на В-лимфоцитах, супрессорной функцией обладает и TGF-β [5]. Стимулировать экспрессию HLA-DR на активированных Т-лимфоцитах за счет аутокринного эффекта может IL-3 [5, 19]. Соответственно, у женщин, выносивших две и более беременности, этот клеточный сдвиг в регуляторных лимфоцитах с секрецией соответствующих интерлейкинов сохраняется. При репродуктивных потерях изменяется вектор клеточной регуляции и интерлейкиновый статус. Как видно из исследования, не обнаружено эффекта активации экспрессии HLA-DR на активированных Т-лимфоцитах, а подавление этой экспрессии на В-лимфоцитах носило выраженный характер. Отсутствие блокирующего эффекта и, напротив, присутствие активирующего действия гуморальных сывороточных женских факторов на активированные женские Т-лимфоциты стало важным интегральным значением для диагностики иммунных причин репродуктивных потерь, которое также было ранее продемонстрировано в краткосрочной СКЛ [12, 20]. Именно для этого иммунного показателя была выявлена достоверно значимая отрицательная ассоциативная связь с невынашиванием беременности.

Формирование спорадических врожденных пороков сердца без хромосомных заболеваний связывают с нарушенными иммунными взаимодействиями в системе «мать—эмбрион». Эмбриогенез сердца приходится на 3-7 неделю гестации, когда сохраняется контакт материнского иммунного микроокружения с тканями эмбриона, а выраженность аллогенных иммунных реакций может индуцировать дисэмбриогенез. Было продемонстрировано, что у женщин, родивших детей с ВПС, имело место нарушение клеточной регуляции В-лимфоцитов при аллоиммунных взаимодействиях. Это проявлялось в том, что в основной группе ЭКП экспрессия HLA-DR на В-лимфоцитах в сравниваемых СКЛ была положительной, в то время как в контрольной группе имела отрицательное значение. Исследование активности женской ауто-сыворотки в группе с ВПС показало ее активирующее значение на все субпопуляции женских лимфоцитов, участвующих в аллогенных реакциях по HLA. Рассматривая эту ситуацию с позиции особенностей сдвига в регуляторных лимфоцитах, можно предположить, что у женщин, родивших детей с ВПС, до-

минируют не Т3-хелперные лимфоциты, способные вырабатывать IL-10 и TGF- $\beta$ , а Т2-хелперные лимфоциты, синтезирующие IL-13, IL-4, IL-14 и IL-3. Именно эти цитокины могут увеличивать экспрессию HLA-DR на В-лимфоцитах и активированных Т-лимфоцитах. Одним из клинических эффектов этой стимуляции будет нарастание гуморальных факторов, вмешивающихся в эмбриогенез сердца и нарушающих его.

## Заключение

В краткосрочной смешанной культуре лимфоцитов могут отражаться как клеточные, так и гуморальные регуляторные эффекты, индуцированные аллогенным взаимодействием лим-

фоцитов супругов. С этих позиций использование краткосрочной СКЛ с оценкой экспрессии HLA-DR на различных субпопуляциях лимфоцитов совместно с исследованием продуцируемых ими цитокинов может дать новые знания о патогенезе репродуктивных потерь и спорадических врожденных пороках сердца без хромосомных заболеваний. Кроме того, краткосрочная смешанная культура лимфоцитов супруга может быть эффективной заменой классической СКЛ, используемой для выявления иммунных причин репродуктивных потерь. Исследование ЭКП и ЭКБ позволит выявлять нарушения в клеточной и гуморальной регуляции иммунных взаимодействий матери и полуаллогенного по HLA эмбриона/плода.

## Список литературы / References

1. Беленкова О.В., Мозес В.Г., Шабалдин А.В., Шабалдина Е.В. Характер аллогенных взаимодействий супругов в кратковременной смешанной культуре при иммунных формах репродуктивных потерь // Журнал теоритической и клинической медицины (Узбекистан), 2014. Т. 3, № 1. С. 219-222. [Belenkova O.V., Mozes V.G., Shabaldin A.V., Shabaldina E.V. The nature of allogenic interactions of spouses in a short-term mixed culture with immune forms of reproductive losses. *Zhurnal teoriticheskoy i klinicheskoy meditsiny (Uzbekistan) = Journal of Theoretical and Clinical Medicine (Uzbekistan)*, 2014, Vol. 3, no. 1, pp. 219-222. (In Russ.)]
2. Газиева И.А., Чистякова Г.Н., Ремизова И.И. Роль нарушений продукции цитокинов в генезе плацентарной недостаточности и ранних репродуктивных потерь // Медицинская иммунология, 2014. Т. 16, № 6. С. 539-550. [Gazieva I.A., Chistyakova G.N., Remizova I.I. Role of cytokine production disorders in genesis of placental insufficiency and early reproductive losses. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2014, Vol. 16, no. 6, pp. 539-550. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2014-6-539-550.
3. Самбур М.Б. Способ оценки взаимодействия лимфоцитов *in vitro*, основанный на определении их розеткообразующей способности // Иммунология, 1991. № 2. С. 30-33. [Sambur M.B. A method for evaluating the interaction of lymphocytes *in vitro*, based on the determination of their rosette-forming ability. *Immunologiya = Immunology*, 1991, no. 2, pp. 30-33. (In Russ.)]
4. Сепиашвили Р.И. Функциональная система иммунного гомеостаза // Аллергология и иммунология, 2015. Т. 16, № 1. С. 91-100. [Sepiashvili R.I. The functional system of immune homeostasis. *Allergologiya i immunologiya = Allergology and Immunology*, 2015, Vol. 16, no. 1, pp. 91-100. (In Russ.)]
5. Хаитов Р.М., Алексеев Л.П., Кофиади И.А. Роль иммуногенетики в решении фундаментальных и прикладных задач персонализированной медицины // Медицина экстремальных ситуаций, 2016. Т. 3, № 57. С. 9-24. [Khaitov R.M., Alekseev 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, Vol. 3, no. 57, pp. 9-24. (In Russ.)]
6. Чистякова Г.Н., Шабалдин А.В., Беленкова О.В., Мозес В.Г., Матвеева В.Г., Шабалдина Е.В., Ремизова И.И., Газиева И.А. Патент РФ № 2581925 «Способ определения аллогенного иммунного ответа в кратковременной смешанной культуре лимфоцитов неродственных доноров». [Chistyakova G.N., Shabaldin A.V., Belenkova O.V., Mozes V.G., Matveeva V.G., Shabaldina E.V., Remizova I.I., Gazieva I.A. Patent No. 2581925 "A method for determining the allogeneic immune response in a short-term mixed culture of lymphocytes from unrelated donors"].
7. Шабалдин А.В., Мозес В.Г., Беленкова О.В., Шабалдина Е.В. Патент РФ № 2585091 «Способ определения антител к аллогенным HLA-G». [Shabaldin A.V., Mozes V.G., Belenkova O.V., Shabaldina E.V. Patent No. 2585091 "Method for the determination of antibodies to allogeneic HLA-G"].
8. Ширшев С.В. Гормональные механизмы регуляции иммунной системы в период беременности // Успехи современной биологии, 2005. № 6. С. 555-566. [Shirshev S.V. Hormonal mechanisms of the immune system regulation in pregnancy. *Uspekhi sovremennoy biologii = Biology Bulletin Reviews*, 2005, no. 6, pp. 555-566. (In Russ.)]
9. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 740 с. [Yarilin A.A. Immunology]. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 740 p.

10. Erlebacher A. Immunology of the maternal-fetal interface. *Annu Rev. Immunol.*, 2013, no. 31, pp. 387-411.
11. García-Enguádanos A., Calle M.E., Valero J., Luna S., Dominguez-Rojas V. Risk factors in miscarriage and malformation: a review. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 2002, Vol. 102, no. 2, pp. 111-119.
12. Ganu R.S., Harris R.A., Collins K., Aagaard K.M. Early origins of adult disease: Approaches for investigating the programmable epigenome in humans, nonhuman primates, and rodents. *ILAR J.*, 2012, Vol. 53, no. 3-4, pp. 306-321.
13. Inada K., Shima T., Nakashima A. Characterization of regulatory T cells in decidua of miscarriage cases with abnormal or normal fetal chromosomal content. *J. Reprod. Immunol.*, 2013, Vol. 97, no. 1, pp. 104-111.
14. Liddy K.A., White M.Y., Cordwell S.J. Functional decorations: post-translational modifications and heart disease delineated by targeted proteomics. *Genome Med.*, 2013, Vol. 5, no. 2, p. 20.
15. Koichi I., Tadao T., Norio T. Possible mechanisms of immunotherapy for maintaining pregnancy in recurrent spontaneous aborters: analysis of anti-idiotypic antibodies directed against autologous T-cell receptors. *Hum. Reprod.*, 1999, Vol. 14, no. 3, pp. 650-655.
16. Miranda S., Litwin S., Barrientos G. Dendritic cells therapy confers a protective microenvironment in murine pregnancy. *Scand. J. Immunol.*, 2006, Vol. 64, no. 5, pp. 493-499.
17. Mjosberg J., Berg G., Jenmalm M.C., Ernerudh J. FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells and T helper 1, T helper 2, and T helper 17 cells in human early pregnancy deciduas. *Biol. Reprod.*, 2010, Vol. 82, no. 4, pp. 698-705.
18. Morin-Papunen L., Tiilikainen A., Hartikainen-Sorri A.L. Maternal HLA immunization during pregnancy: presence of anti HLA antibodies in half of multigravidous women. *Med. Biol.*, 1984, Vol. 62, no. 6, pp. 323-325.
19. Oyama K., El-Nachef D., Zhang Y., Sdek P., MacLellan W.R. Epigenetic regulation of cardiac myocyte differentiation. *Frontiers in Genetics*, no. 5, p. 375.
20. Robertson S.A., Prins J.R., Sharkey D.J., Moldenhauer L.M. Seminal fluid and the generation of regulatory T cells for embryo implantation. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2013, Vol. 69, no. 4, pp. 315-303.

**Авторы:**

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

**Шмелевич С.А.** — заведующая детским отделением ГБУЗ Кемеровской области «Кемеровский областной клинический кардиологический диспансер имени академика Л.С. Барбараша», г. Кемерово, Россия

**Чистякова Г.Н.** — д.м.н., профессор, руководитель научного отдела иммунологии клинической микробиологии, врач клинической лабораторной диагностики высшей категории ФГБНУ «Научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

**Ремизова И.И.** — к.б.н., старший научный сотрудник отделения иммунологии и микробиологии, биолог высшей категории ФГБНУ «Научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

**Лукоянычева Е.Б.** — заведующая иммунологической лабораторией ГБУЗ Кемеровской области «Кемеровская областная клиническая больница», г. Кемерово, Россия

**Горшкова С.В.** — лаборант-исследователь лаборатории клеточных технологий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

**Шабалдина Е.В.** — д.м.н., доцент, заведующая кафедрой оториноларингологии и клинической иммунологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Кемерово, Россия

**Authors:**

**Shabal'din A.V.**, PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cell Technologies, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

**Shmulevich S.A.**, Head, Pediatric Department, Kemerovo L. Barbarash Cardiological Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

**Chistyakova G.N.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Research Department of Immunology and Clinical Microbiology, Research Institute of Maternity and Infancy Care, Ekaterinburg, Russian Federation

**Remizova I.I.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Immunology and Microbiology, Research Institute of Maternity and Infancy Care, Ekaterinburg, Russian Federation

**Lukoyanycheva E.B.**, Head, Laboratory of Immunology, Regional Hospital, Kemerovo, Russian Federation

**Gorshkova S.V.**, Laboratory Assistant, Laboratory of Cell Technology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

**Shabal'dina E.V.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Otolaryngology and Clinical Immunology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Поступила 10.04.2018

Отправлена на доработку 11.04.2018

Принята к печати 30.05.2018

Received 10.04.2018

Revision received 11.04.2018

Accepted 30.05.2018