

**ПОЛУЧЕНИЕ ДОНОРСКОГО ГАММАГЛОБУЛИНА ОТ  
МНОГОРОЖАВШИХ ЖЕНЩИН, И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА  
ЭКСПРЕССИЮ МОЛЕКУЛ HLA-G И HLA-DR ЛИМФОЦИТОВ  
ЖЕНЩИН, ИМЕЮЩИХ ДЕТЕЙ С СЕПТАЛЬНЫМИ  
ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ СЕРДЦА**

Шабалдин А. В.<sup>1</sup>,  
Синицкая А. В.<sup>1</sup>,  
Шмулевич С. А.<sup>1</sup>,  
Гришачева Е. О.<sup>1</sup>,  
Шабалдина Е. В.<sup>2</sup>,  
Деева Н. С.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет»  
Министерства Здравоохранения Российской Федерации, Кемерово, Россия.

**OBTAINING DONOR GAMMAGLOBULIN FROM MULTIPAROUS WOMEN, AND ITS EFFECT ON THE EXPRESSION OF HLA-G AND HLA-DR MOLECULES IN LYMPHOCYTES OF WOMEN WITH CHILDREN WITH SEPTAL CONGENITAL HEART DEFECTS**

Shabaldin A. V. <sup>a</sup>,  
Sinitskaya A. V. <sup>a</sup>,  
Shmulevich S. A. <sup>a</sup>,  
Grishacheva E. O. <sup>a</sup>,  
Shabaldina E. V. <sup>b</sup>,  
Deeva N. S. <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002), Russian Federation;

<sup>b</sup> Kemerovo State Medical University (22a, Voroshilova Street, Kemerovo, 650003), Russian Federation.

## Резюме

Общее звено патогенеза репродуктивных потерь и врожденных пороков сердца (ВПС) связано с иммунным воспалением в системе «мать-эмбрион», которое влияет на дифференцировку и пролиферацию прогениторных клеток сердечно-сосудистой системы. Выдвигается гипотеза, что это звено может быть заблокировано регуляторными аутоиммунными и аллоиммунными антителами к молекулам HLA-G и HLA-DR. Кроме того, эти антитела могут быть в достаточном количестве в донорских иммуноглобулинах, особенно, полученных из крови многорожавших женщин. Исходя из этого, была поставлена *цель исследования* – получение очищенной фракции гаммаглобулина из крови многорожавших женщин и оценка ее функциональной активности в отношении молекул HLA-DR и HLA-G. *Материалы и методы:* Выделение фракции гаммаглобулина (ФГГ) из плазмы крови многорожавших женщин выполняли с помощью аффинной хроматографии в несколько сеансов. Чистоту полученного белка анализировали с помощью электрофоретического разделения белковой фракции сыворотки крови и электрофореза в 4,12% полиакриламидном геле с добавлением додецилсульфата натрия (SDS) (ПААГ-электрофорез). ПААГ электрофорез показал, что выделенная ФГГ не отличалась от коммерческого лечебного иммуноглобулина для внутривенного введения (ИГЧ). Для оценки функциональной активности ФГГ в отношении молекул HLA-DR и HLA-G сформированы: основная группа женщин и их детей с ВПС (n=38) и контрольная группа женщин с их условно-здоровыми детьми (n=21). Для определения специфичности ФГГ по отношению к молекулам HLA-G, HLA-DR, а также для сравнения его эффекта с аутогенными и аллогенными сыворотками и ИГЧ разработан протокол иммунологического тестирования с помощью проточной цитофлуориметрии. Получено, что блокирующая активность женской сыворотки по отношению к аутогенным (собственным) и аллогенным (эмбриона/плода/ребенка) молекулам HLA-G и HLA-DR определяет протективный эффект в отношении формирования врожденных пороков сердца в последующем поколении. Фракция гаммаглобулина, полученная из донорской крови многорожавших женщин, обладает более выраженным блокирующим эффектом по отношению к экспрессии молекул HLA-G и HLA-DR. **Выводы:** Полученный иммунобиологический препарат может быть прототипом лечебного и профилактического средства, блокирующего патогенез врожденных пороков сердца.

**Ключевые слова:** фракции гаммаглобулина, врожденные пороки сердца, HLA-G, HLA-DR, антитела.

## Abstract

The common link in the pathogenesis of reproductive losses and congenital heart disease (CHD) is associated with immune inflammation in the "mother-embryo" system, which affects the differentiation and proliferation of progenitor cells of the cardiovascular system. It is hypothesized that this link can be blocked by regulatory autoimmune and alloimmune antibodies to HLA-G and HLA-DR molecules. In addition, these antibodies may be present in sufficient amounts in donor immunoglobulins, especially those obtained from the blood of multiparous women. Based on this, *the aim of the study* was to obtain a purified gammaglobulin fraction from the blood of multiparous women and evaluate its functional activity in relation to HLA-DR and HLA-G molecules.

**Results.** Isolation of the gammaglobulin fraction (GGG) from the blood plasma of multiparous women was performed using affinity chromatography in several sessions. The purity of the resulting protein was analyzed by immunoelectrophoresis, electrophoretic separation of the protein fraction of blood serum and electrophoresis in 4.12% polyacrylamide gel with the addition of SDS (PAGE electrophoresis). PAAG electrophoresis showed that FHG did not differ from commercial therapeutic intravenous immunoglobulin (HIG).

An assessment of the functional activity of FHG in relation to HLA-DR and HLA-G molecules was formed: the main group of women and their children with congenital heart disease (n=38) and the control group of women with their conditionally healthy children (n=21). To determine the specificity of FHG with respect to HLA-G, HLA-DR molecules, as well as to compare its effect with autologous and allogeneic sera and HIG, an immunological testing protocol using flow cytometry was developed. The protocol was developed on the basis of the methodological approach - "cross-match", as well as the patent of the Russian Federation "Method for determining antibodies to HLA-G". It was found that the blocking activity of female serum in relation to autogenous (intrinsic) and allogeneic (embryo/fetus/child) HLA-G and HLA-DR molecules determines the protective effect on the formation of congenital heart defects in the next generation. Donor human immunoglobulin has similar blocking effects to these molecules, possibly due to the presence of alloimmune antibodies to HLA classes I and II. The gammaglobulin fraction obtained from the donor blood of multiparous women has a more pronounced blocking effect on the expression of HLA-G and HLA-DR molecules. Thus, this immunobiological preparation can be a prototype of a therapeutic and prophylactic agent blocking the pathogenesis of congenital heart defects.

**Keywords:** congenital heart defects, HLA-DR, HLA-G, antibody.

## 1 Введение

Иммунные механизмы, лежащие в основе репродуктивных потерь и врожденных пороков, аномалий развития плода, продолжают активно изучаться [16]. Взаимосвязь между этими двумя патологическими состояниями не всегда очевидна, но она имеет место. Так эмбриональный период с 3 по 8 неделю гестации является наиболее критичным. Именно в этот временной отрезок наиболее часто происходит прерывание беременности, и в этот же период формируются врожденные пороки развития плода, в том числе и сердечно-сосудистой системы. С позиции репродуктивной морфологии и физиологии происходит иммунная адаптация материнского микроокружения к аллогенным антигенам эмбриона, механизмы которой также продолжают активно изучаться [3]. В тоже время в самом эмбрионе идет органогенез, регулируемый огромным количеством внутриклеточных и межклеточных мессенджеров. Эти регуляторные сети обеспечивают, с одной стороны, эффективный органогенез, а, с другой стороны, они подвержены влиянию внешнего микроокружения, в том числе иммунным взаимодействиям в системе «мать-эмбрион/плод». Последние определяют провоспалительный потенциал, распространяющийся на эмбриобласт. Неоднократно формулировалась гипотеза о триггерах, запускающих патологические регуляторные сети при эмбриогенезе сердечно-сосудистой системы, и являющихся продуктами иммунных взаимодействий в системе «мать-эмбрион/плод» [8].

Именно на это общее звено патогенеза репродуктивных потерь и врожденных пороков и аномалий развития плода, в том числе врожденных пороков сердца (ВПС), может быть направлена прегравидарная иммунная терапия.

Одним из иммунных препаратов является иммуноглобулин для внутривенного введения, который применяется при лечении аллогенной формы репродуктивных потерь [12]. Данный препарат может содержать антитела, блокирующие материнские молекулы презентации аллоантигенов (HLA-DR) или модулирующие экспрессию эмбриональных HLA, в том числе и HLA-G. Именно через эти механизмы, может быть ограничено воспаление в системе «мать-эмбрион» и, ассоциированный с ним, тератогенез в сердечно-сосудистой системе. Иммуноглобулины для внутривенного введения применяются в лечебных целях как до беременности, так и вовремя нее [4].

Исходя из высказанной концепции, что ВПС это воспалительные эмбриопатии, формирующиеся при нарушении иммунных взаимодействиях в системе «мать-эмбрион/плод», вполне обосновано применение иммуноглобулина для профилактики риска формирования спорадических (без семейной истории и без хромосомной патологии) ВПС на прегравидарном этапе, а также лечения во время беременности. Лечебный эффект будет

42 заключаться в блокировании материнских HLA и свободных для  
43 распознавания HLA молекул эмбриобласта. Тот факт, что наибольшее  
44 количество антител к антигенам HLA различных классов, выявляется у  
45 женщин репродуктивного периода, и имеющих несколько детей, доказывает  
46 их физиологическую роль [2]. Соответственно можно предположить, что  
47 иммуноглобулин полученный из крови многорожавших женщин будет иметь  
48 больший протективный эффект в отношении блокирования иммунного  
49 воспаления в системе «мать-эмбрион/плод», и лежащего в основе патогенеза  
50 как репродуктивных потерь, так и ВПС.

51 Исходя из этого, была поставлена цель исследования – получение  
52 очищенной фракции гамма глобулина из крови многорожавших женщин и  
53 оценка ее функциональной активности в отношении молекул HLA-DR и HLA-  
54 G.

## 55 2 Материалы и методы

56 Для получения, очищенной фракции гаммаглобулина (ФГГ) из крови  
57 многорожавших женщин, выполнен забор периферической крови в объеме 10  
58 мл у 60 женщин, имеющих в анамнезе более четырех родов (все дети были  
59 условно-здоровыми). Периферическая донорская кровь набиралась в течение  
60 2020-2021 года. Сбор крови проводился в родильном доме Областной детской  
61 клинической больницы имени Ю.А. Атаманова г. Кемерово в пробирки,  
62 содержащие натриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА).

63 Выделение ФГГ из плазмы крови многорожавших женщин выполняли с  
64 помощью аффинной хроматографии в несколько сеансов (по 85 мл плазмы на  
65 один сеанс).

66 Чистоту полученного белка анализировали с помощью  
67 электрофоретического разделения белковой фракции сыворотки крови и  
68 электрофореза в 4-12% полиакриламидном геле с добавлением  
69 додецилсульфата натрия (SDS).

70 Для оценки функциональной активности ФГГ в отношении молекул  
71 HLA-DR и HLA-G сформировано несколько групп: основная группа включала  
72 38 женщин и их детей со спорадическими септальными ВПС (дефект  
73 межжелудочковой перегородки – ДМЖП и дефект межпредсердной  
74 перегородки – ДМПП). Группа сформирована на базе отделения  
75 кардиохирургии №2 Научно-исследовательского института комплексных  
76 проблем сердечно-сосудистых заболеваний (НИИ КПССЗ). Группа сравнения  
77 представлена 21 женщиной и их условно-здоровыми детьми без ВПС, которая  
78 собрана на поликлинических базах ФГБОУ ВО Кемеровского  
79 государственного медицинского университета. У всех матерей получено  
80 информированное согласие на их участие, а также их детей, в

81 иммунологическом исследовании. Группы были сопоставимы по полу и  
82 возрасту.

83 На выделенных лимфоцитах (далее обозначались как донорские)  
84 оценивалась функциональная активность очищенной и сконцентрированной  
85 ФГГ. Выбор групп исследования был обусловлен тем, что функциональная  
86 оценка ФГГ проводилась как по отношению к эффекту аутосыворотки  
87 женщин, имеющих детей с ВПС, так и к таковому у женщин, родивших  
88 исключительно условно-здоровых детей.

89 Статистическую обработку полученного материала проводили с  
90 использованием пакета прикладных программ STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc.,  
91 USA). Нормальность распределения выборок оценивали с помощью W-теста  
92 Шапиро-Уилка. Номинальные данные описывались с указанием абсолютных  
93 значений, процентных долей (%). Количественные данные представляли в  
94 виде медианы (Me), 25-го и 75-го перцентилей (P25 и P75). Сравнение  
95 значений уровней метрических показателей в несвязанных выборках  
96 проводили с помощью непараметрического Манна-Уитни, а в связанных –  
97 Вилкоксона. Вероятность ошибки первого рода была принята за 5%,  
98 соответственно уровень статистической значимости выявлялся при  $p < 0,05$ ,  
99 что соответствует стандартным требованиям.

### 100 3 Результаты и обсуждение

#### 101 *Получение фракции гаммаглобулина из плазмы многорожавших* 102 *женщин*

103 Выделение ФГГ (с высокой концентрацией иммуноглобулина G, IgG)  
104 осуществлялось при помощи системы DEAE Affi-Gel Blue (BioRad, USA).  
105 Получение и десорбцию ФГГ осуществляли с применением подвижной фазы  
106 буферов (20 мм  $K_2HPO_4$ /  $KH_2PO_4$ , pH 8,0, 0,02%). Значение pH регулировали  
107 с помощью добавления 0,1М KOH. Работу осуществляли на хроматографе  
108 низкого давления BioLogic (BioRad, USA). Подготовка сорбента включала  
109 рекомендованные производителем этапы, в том числе предварительную  
110 отмывку сорбента от остаточного красителя на стеклянном фильтре с  
111 последующим перенесением сорбента в фосфатный буфер и упаковку  
112 сорбента.

113 Фракции (рисунок 1) собиралась с помощью коллектора фракций  
114 BioFrac. Регенерацию сорбента после анализа осуществляли 0,5М раствором  
115 NaCl.

116 За все сеансы суммарно получено 80 мл ФГГ с концентрацией белка 5,1  
117 г/л и остаточным альбумином менее 0,2 г/л. Анализ общего белка и альбумина  
118 проводился на анализаторе Architect C8000 (Abbott, USA). Концентрация  
119 белка в ФГГ соответствовала нижней границе концентрации

120 иммуноглобулина G в сыворотке крови человека. Данная фракция была  
121 обозначена как ФГГ1.

122 Далее был выполнен электрофорез белков хроматографического смыва  
123 в 1,5% агарозном геле на 0,05М веронал-мединаловом буфере (pH=8,6) в три  
124 этапа. Первый этап связан с проведением электрофореза белков  
125 хроматографического смыва в агарозном геле. На втором этапе в агарозный  
126 гель была добавлена моноспецифическая сыворотка против иммуноглобулина  
127 G человека (Моно-РИД-G, МикроГен, Россия), антитела которой при  
128 диффузии в геле преципитировали со специфическими молекулами. Третий  
129 этап был связан с высушиванием и окрашиванием пластины с гелем для  
130 верификации линий преципитации.

131 Иммуноэлектрофорез показал, что в хроматографическом смыве  
132 имеется фракция иммуноглобулина G человека (рисунок 2).

133 Кроме того, выполнен электрофорез белков сыворотки крови на  
134 коммерческих наборах для электрофоретического разделения белковой  
135 фракции сыворотки крови на мембранах ацетилцеллюлоза (КлиниТест-ЭФ,  
136 Россия). Снятие результатов электрофореза проводилось на отечественном  
137 аппарате для электрофореза белков сыворотки крови УЭФ-01-«Астра»  
138 (Россия), данные представлены на рисунке 3. Как видно из рисунка (дорожка  
139 №6, ФГГ1) в полученном образце выявлялась, преимущественно, фракция  
140 гаммаглобулинов в невысокой концентрации. Эти данные наглядно  
141 показывают, что была выделена именно фракция гаммаглобулинов.  
142 Необходимо отметить, что концентрация гаммаглобулинов в лечебных  
143 препаратах иммуноглобулинов для внутривенного введения равна 50 г/л. То  
144 для оценки эффектов коммерческих иммуноглобулинов для внутривенного  
145 введения и полученной ФГГ1, необходимо последнюю сконцентрировать как  
146 минимум в 5 раз.

147 Для концентрации ФГГ1 была использована установка FreeZone 2.5 Plus  
148 (Labconco, США). Замороженные образцы в объеме по 40 мл  
149 лиофилизировали с использованием установки FreeZone 2.5 Plus (Labconco,  
150 США) в течение суток при вакууме 0,04 мБар и температуре от -50 С.  
151 Выполнено 2 сеанса лиофилизации. Каждый из полученных лиофилизатов  
152 разводили в 4 мл 0,5М раствором NaCl. Объединенный общий объем составил  
153 8 мл. Тем самым, проведено концентрирование по объему в 10 раз. Повторное  
154 исследование общего белка и альбумина на анализаторе Architect C8000  
155 (Abbott, USA) показало концентрацию белка 30,6 г/л, а остаточный альбумин  
156 - 0,2 г/л. Данная фракция обозначалась ФГГ2, и она была сконцентрирована по  
157 отношению к ФГГ1 в 6 раз. Кроме того, ФГГ2 может быть прототипом  
158 иммуноглобулина человека для внутривенного введения, полученного от  
159 многорожавших женщин.

160 Для верификации белков, входящих в ФГГ2, и сравнения ее со  
161 стандартным иммуноглобулином человека для внутривенного введения был  
162 проведен электрофорез в 4-12% полиакриламидном геле в присутствии  
163 додецилсульфата натрия (SDS-PAGE). Для SDS-PAGE использовали фракции  
164 ФГГ1, ФГГ2 и иммуноглобулины человека для внутривенного введения  
165 (ИГЧ1 – иммуновенин 5%, НПО Микроген, Россия; ИГЧ2 – иммуноглобулин  
166 человека нормальный для внутривенного введения 5%, НПО Микроген,  
167 Россия). Белки разделяли путем электрофореза в 4-12% полиакриламидном  
168 геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) при напряжении 150  
169 В в течение 2 часов с использованием буфера для разделения белков NuPAGE  
170 MES SDS (NP0002, Thermo Fisher Scientific), антиоксиданта NuPAGE (NP0005,  
171 Thermo Fisher Scientific) и камеры для вертикального электрофореза XCell  
172 SureLock Mini-Cell (EI0001, Thermo Fisher Scientific). В качестве маркера  
173 молекулярных масс использовали смесь белковых стандартов Novex Sharp Pre-  
174 Stained (LC5800, Thermo Fisher Scientific). Гель окрашивали красителем  
175 Кумасси (Coomassie Brilliant Blue G-250) (Рисунок 4).

176 Как видно из рисунка 4, основные бенды ФГГ1, ФГГ2, ИГЧ1 и ИГЧ2  
177 полностью совпадали между собой. Концентрация белков от ФГГ1 к ФГГ2  
178 значительно увеличилась, но даже в последней была ниже чем в стандартных  
179 лечебных иммуноглобулинах для внутривенного введения (ИГЧ1 и ИГЧ2).  
180 Так в ФГГ2 концентрация общего белка составляла 29 г/л, а в ИГЧ1 и ИГЧ2 -  
181 50 г/л, что в 1,7 раз больше. Молекулярная масса основных белков в ФГГ2,  
182 ИГЧ1 и ИГЧ2 была в пределах 110-150 г/л, что соответствует молекулярной  
183 массе гаммаглобулинов.

184 На данном этапе работы из крови многорожавших женщин была  
185 получена очищенная и сконцентрирована фракция гаммаглобулина  
186 (ФГГ1/ФГГ2), что документировано в иммуноэлектрофорезе, в электрофорезе  
187 белков сыворотки крови и в ДНС-ПААГ электрофорезе, и именно эта фракция  
188 оценивалась в последующих иммунологических исследованиях.

#### 189 **4 Влияние ФГГ на экспрессию молекул HLA-G и HLA-DR лимфоцитов** 190 **матерей и детей с септальными врожденными пороками сердца и** 191 **контрольных групп**

192 *Протокол проточной цитофлуориметрии.* Для определения  
193 специфичности сконцентрированной ФГГ2 по отношению к молекулам HLA-  
194 G, HLA-DR, а также для сравнения его эффекта с аутогенными и аллогенными  
195 сыворотками и стандартным лечебным 5% иммуноглобулином для  
196 внутривенного введения (ИГЧ1) был разработан протокол иммунологического  
197 тестирования с помощью проточной цитофлуориметрии. Протокол был  
198 разработан на основе методического подхода - «cross-match», а также  
199 использован метод определения антител к HLA-G, для которого был получен  
200 патент Российской Федерации [5].

201 Для тестирования ФГГ2 были выделены у всех обследованных  
202 лимфоциты из 4 мл периферической крови на градиенте плотности фиколл-  
203 верографина  $1,077 \text{ г/см}^3$  (Фиколл-1077, Диа-М, Москва, Россия) по  
204 стандартной методике. Полученные взвеси лимфоцитов женщин и детей  
205 двукратно отмывались раствором Хэнкса (Диа-М, Москва, Россия). Для этого  
206 по 1000 мкл раствора Хэнкса добавлялось в пробирки с лимфоцитами женщин  
207 и детей, и центрифугировались 10 минут при 1500 g. После  
208 центрифугирования надосадочная жидкость убиралась. Далее во все  
209 монокультуры с минимальным количеством раствора Хэнкса (среднее  
210 содержание лимфоцитов было 3 млн клеток в 25 мкл раствора Хэнкса) для  
211 первичного окрашивания лимфоцитов добавлялись 5 мкл раствора  
212 моноклональных антител к молекуле CD45, конъюгированными с  
213 флуоресцентным красителем перидинин-хлорофиллом 7 (PC-7, Biolegend,  
214 США). Инкубация проводилась в течение 15 минут при комнатной  
215 температуре в темноте, после которой выполнялась однократная отмывка  
216 лимфоцитов раствором Хэнкса от несвязанных антител. После отмывки в  
217 пробирки с детскими и женские монокультурами добавлялось 800 мкл полной  
218 среды (RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, USA), с 2 ммольями L-глутамином (Panreac,  
219 Испания), с 10 ммольями Нерес-буфера (Sigma-Aldrich, США), с  $5 \cdot 10^{-5}$  ммольями  
220 2-меркаптоэтанола (Biochem, Франция) и с 50 мкг/мл раствором гентамицина-  
221 сульфата (Ветинтерфарм, Россия)).

222 Далее выполнялся подход «cross-match», согласно патенту Российской  
223 Федерации «Способ определения антител к HLA-G» [5].

224 Для каждой детской и женской монокультуры готовилось по восемь  
225 пробирок для проточного цитофлуориметра Beckman Coulter (USA), в четырех  
226 из которых оценивалась экспрессия HLA-G, а в следующих четырех -  
227 экспрессия HLA-DR. В каждую пробирку вносилось по 100 мкл клеточной  
228 взвеси (350 тысяч клеток в полной среде). Далее, в первую и пятую пробирки  
229 добавлялись по 100 мкл полной среды (контрольные пробы), во вторую и  
230 шестую пробирки вносились по 100 мкл аутогенной сыворотки крови для  
231 женских монокультур и аллогенных материнских сывороток для детских  
232 монокультур, в третью и восьмую пробирки добавлялись 50 мкл ФГГ2 и 50  
233 мкл полной среды, тем самым концентрация гаммаглобулина уравнивалась с  
234 сывороткой периферической крови. Соответственно для уравнивания  
235 концентраций гаммаглобулинов с периферической кровью в четвертую и  
236 девятую пробирки вносились по 30 мкл ИГЧ1 и по 70 мкл полной среды. Все  
237 пробирки инкубировались в термостате при 37 градусов Цельсия в течение 30  
238 минут.

239 После окончания инкубации проводилась однократная отмывка  
240 лимфоцитов каждой пробирки раствором Хэнкса, по вышеописанной  
241 методике. После однократной отмывки выполнялось окрашивание  
242 лимфоцитов в каждой монокультуре как в полной среде, так и в среде с

243 добавлением аллогенных, аутогенных сывороток, с ФГГ2 и ИГЧ1 с помощью  
244 конъюгированных моноклональных антител (МКАТ). В пробирки, где  
245 оценивалась экспрессия HLA-G, добавлялись 3 мкл с МКАТ к молекуле CD3  
246 конъюгированные с флуорисцеин изотиоцианат (FITC) и 3 мкл с МКАТ к  
247 молекуле HLA-G конъюгированные с алофикоцианин (APC) (Biolegend,  
248 США). Соответственно, в пробирки, где оценивалась экспрессия HLA-DR,  
249 добавлялись МКАТ в тех же соотношения, но вместо МКАТ к HLA-G  
250 добавлялся МКАТ к HLA-DR, также конъюгированный с APC (Biolegend,  
251 США). Объем антител к количеству лимфоцитов, время и температура  
252 инкубаций соответствовали прилагаемым инструкциям к каждому  
253 конъюгированному моноклональному антителу. Инкубирование проводилось  
254 в течение 15 минут при комнатной температуре в темноте.

255 С учетом перекрестного реагирования с молекулами HLA-G и HLA-DR  
256 антител, содержащих в аллогенных, аутогенных сыворотках, а также в ФГГ2  
257 и ИГЧ1 оценили концентрацию гаммаглобулинов в растворах  
258 моноклональных антител и в добавляемых иммунобиологических материалах.  
259 Так из раствора специфических МКАТ добавлялось на 300 тысяч клеток 1,5  
260 мкг антител; а из сыворотки крови и из препаратов иммуноглобулина на это  
261 же количество клеток добавлялось около 1000 мкг гаммаглобулина, что могло  
262 быть достаточным для частичного закрытия антигенных детерминант  
263 анализируемых молекул на лимфоцитах.

264 После окончания инкубации с МКАТ проводилась отмывка лимфоцитов  
265 раствором Хенкса по описанной выше методике. Однократный раствор  
266 OptiLyse (Beckman coulter, США) добавлялся по 200 мкл в каждую пробирку  
267 для фиксации антител на лимфоцитах в монокультурах.

268 Особенности экспрессии HLA-G и HLA-DR на различных  
269 субпопуляциях лимфоцитов женщин и детей, а также влияние на этот процесс  
270 аутогенных и аллогенных сывороток и гаммаглобулиновых препаратов крови  
271 человека были оценены с помощью протокола проточной цитофлуориметрии  
272 для CytoFlex (Beckman Coulter, США).

273 Протокол включал несколько последовательных этапов для каждой  
274 монокультуры, инкубированных в полной среде и в среде с добавлением  
275 аллогенных, аутогенных сывороток крови, а также с ФГГ2 и ИГЧ1.

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

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

283 Третья гистограмма была для этого исследования основной. Именно в  
284 ней анализировались выделенные лимфоциты по фенотипам: CD3<sup>+</sup>/HLA-G<sup>+</sup>,  
285 CD3<sup>-</sup>/HLA-G<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>, а также CD45<sup>+</sup>/HLA-G<sup>+</sup>,  
286 CD45<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>. Анализ этих субпопуляций лимфоцитов проводился во всех  
287 монокультурах как в полной среде, так и с добавлением аутогенных,  
288 аллогенных сывороток крови и с ФГГ2, ИГЧ1 (рисунок 1, рисунок 2).

289 По различию экспрессии HLA-G и HLA-DR на различных  
290 субпопуляциях женских и детских лимфоцитов в полной среде и в среде с  
291 добавлением аллогенных, аутогенных сывороток крови и с ФГГ2 и ИГЧ1,  
292 соответственно, определяли их эффект. Если в среде с той или иной  
293 сывороткой крови или с ФГГ2 и ИГЧ1 экспрессия HLA-G и HLA-DR на  
294 соответствующей субпопуляции лимфоцитов была ниже, чем в полной среде,  
295 то эффект данного иммунобиологического материала считался блокирующим.  
296 В том случае, если в среде с сывороткой крови или с ФГГ2 и ИГЧ1 экспрессия  
297 молекул HLA-G и HLA-DR на соответствующей субпопуляции лимфоцитов  
298 была выше, чем в полной среде, то эффект данной сыворотки считался  
299 активирующим. Для количественной оценки эффектов сывороток крови и  
300 ФГГ2, ИГЧ1 использовали формулу:

301 Изменение экспрессии HLA-G или HLA-DR в % = ((количество клеток с  
302 молекулами HLA-G или HLA-DR в среде с сывороткой крови или с ФГГ2,  
303 ИГЧ1 - количество клеток с молекулами HLA-G или HLA-DR в полной среде)  
304 / количество клеток с молекулами HLA-G или HLA-DR в полной среде) \* 100%.

## 305 5 Оценка эффекта выделенной фракции гаммаглобулина

306 На первом этапе исследования провели сравнение эффектов активации  
307 и блокирования экспрессии HLA-G и HLA-DR на лимфоцитах женщин  
308 основной и контрольной групп под воздействием аутогенной сыворотки и  
309 ФГГ2, ИГЧ1. Данные представлены в таблице 1. Как видно из таблицы,  
310 аутогенная женская сыворотка обладала блокирующим эффектом на  
311 субпопуляции лимфоцитов CD3<sup>-</sup>, HLA-G<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup> в контрольной  
312 группе и, напротив, активирующим эффектом – в основной группе (женщины,  
313 имеющие детей с ВПС). По этим показателям получены значимые различия  
314 между группами. Этот феномен неоднократно обсуждался в ранее  
315 проведенных исследованиях [6,15]. Известно, что ген *HLA-G* имеет низкий  
316 полиморфизм, поэтому практически у всех людей экспрессируется почти один  
317 и тот же белок [7]. В тоже, данная молекула является ключевой для  
318 ограничения иммунного воспаления в системе «мать-эмбрион/плод» и  
319 вынашивания беременности [13]. Доказано, что дефицит экспрессии HLA-G  
320 на клетках эмбриона и цитотрофобласта, а не генетический полиморфизм,  
321 ассоциирован с репродуктивными потерями [10]. Кроме того, показано, что  
322 молекула HLA-G экспрессируется не только на клетках вневорсинчатого  
323 цитотрофобласта, но и в половых путях, в крови беременных и небеременных

324 женщин, в семенной жидкости, а также в предимплантированных эмбрионах  
325 [10]. Тем самым, особенности экспрессии HLA-G в материнском  
326 микроокружении, в клетках эмбриона, могут быть значимыми в ограничении  
327 иммунного отторжения полуаллогенного эмбриона, и провоспалительной  
328 компоненты патогенеза ВПС. Такими дополнительными регуляторными  
329 свойствами могут обладать женские аутоиммунные антитела к HLA-G,  
330 которые присутствовали в аутогенных сыворотках женщин контрольной  
331 группы и отсутствовали в аутогенных сыворотках женщин основной группы  
332 (таблица 1).

333 Соответственно, в коммерческом лечебном иммуноглобулине для  
334 внутривенного введения (ИГЧ1) и в полученной концентрированной  
335 гаммаглобулиновой фракции (ФГГ2) эти антитела присутствовали. Так из  
336 таблицы 1 видно, что ИГЧ1 и ФГГ2 оказывали блокирующий эффект на все  
337 субпопуляции женских лимфоцитов, экспрессирующих HLA-G, в основной и  
338 контрольной группах. Причем, эффект данных препаратов был сопоставим с  
339 эффектом аутогенной сыворотки для женских лимфоцитов CD3<sup>-</sup>, HLA-G<sup>+</sup> в  
340 контрольной группе. Все женщины этой группы имели только условно-  
341 здоровых детей (без ВПС). Для данной субпопуляции в основной группе  
342 эффект ИГЧ1 и ФГГ2 значимо отличался от влияния на экспрессию HLA-G  
343 женской аутогенной сыворотки (таблица 1). Тем самым, если бы этим  
344 женщина было проведено внутривенное введение ИГЧ1 до беременности или  
345 в первые недели беременности, то вполне вероятно, что патогенез ВПС был  
346 бы заблокирован.

347 Схожим эффектом обладали ИГЧ1 и ФГГ2 на экспрессию HLA-G в  
348 субпопуляции CD3<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup> в основной и контрольной группах. Надо  
349 отметить, что в контрольной группе блокирующий эффект ИГЧ1 был значимо  
350 ниже блокирующего эффекта аутогенной сыворотки. В то время как,  
351 блокирующий эффект ФГГ2 в этой группе был сопоставим с аутогенной  
352 сывороткой. Это можно расценить с позиции большего количества  
353 аутоиммунных регуляторных антител к молекуле HLA-G, экспрессируемой на  
354 Т-лимфоцитах, в ФГГ2. Женские Т-лимфоциты являются ключевыми  
355 эффекторными и регуляторными клетками. Доскональное понимание роли  
356 HLA-G как на женских Т-, так и на В-лимфоцитах, еще впереди, как и оценка  
357 значимости аутоиммунных регуляторных антител к этой молекуле. В тоже  
358 время, представленное исследование показывает наибольший блокирующий  
359 эффект по отношению к экспрессии HLA-G именно от ФГГ2, который  
360 сопоставим с аутогенной сывороткой женщин, родивших здоровых детей.

361 В таблице 2 представлен анализ эффектов аутогенной сыворотки, ФГГ2  
362 и ИГЧ1 в отношении молекул HLA-DR в основной и контрольной группах.  
363 Как видно из таблицы, аутогенная женская сыворотка обладала тем же  
364 блокирующим эффектом в отношении HLA-DR на анализируемых  
365 субпопуляции лимфоцитов CD3<sup>-</sup>, HLA-DR<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup> в контрольной

366 группе, как и для HLA-G. По данным показателям, между контрольной и  
367 основной группой были получены значимые различия. В основной группе  
368 женская аутогенная сыворотка, также как проявляла активирующий эффект по  
369 отношению к экспрессии молекулы HLA-DR. Этот феномен обсужден ранее,  
370 в том числе с позиции аутоиммунных регуляторных антител к HLA-DR, как  
371 иммунной основы для вынашивания беременности и протекции ВПС [6].

372 Анализ эффективности ИГЧ1 и ФГГ2 по отношению к HLA-DR значимо  
373 различался с эффектом аутогенной сыворотки.

374 Так, ИГЧ1 обладал блокирующим эффектом на экспрессию HLA-DR в  
375 контрольной группе для двух анализируемых субпопуляций: CD3<sup>-</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>  
376 и CD3<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>. И, напротив, его эффект стремился к нулю в основной  
377 группе. Если принять во внимание, что протекция ВПС связана с  
378 блокирующим эффектом экспрессии HLA-DR аутогенной сывороткой, то  
379 активности ИГЧ1 недостаточно для этой протекции.

380 В тоже время, ФГГ2 проявлял блокирующий эффект в отношении  
381 экспрессии HLA-DR на субпопуляциях лимфоцитов CD3<sup>-</sup>, HLA-DR<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>,  
382 HLA-DR<sup>+</sup> как в контрольной, так и в основной группах. По этому свойству  
383 полученные значимые различия для двух анализируемых субпопуляций  
384 лимфоцитов между аутогенной сывороткой в основной группе (таблица 2).  
385 Соответственно, протективный эффект в отношении риска формирования  
386 ВПС для полученного препарата гаммаглобулиновой фракции значимо выше,  
387 чем для коммерческого лечебного иммуноглобулина для внутривенного  
388 введения.

389 Следующим этапом исследования было сравнение эффектов ФГГ2 и  
390 ИГЧ1 с аллогенным влиянием материнской сыворотки крови на экспрессию  
391 молекул HLA-G и HLA-DR на детских лимфоцитах основной и контрольной  
392 групп.

393 В таблице 3 представлены данные об эффектах в отношении экспрессии  
394 молекулы HLA-G.

395 Как видно из таблицы, эффект аллогенной сыворотки был схож с  
396 эффектом аутогенной сыворотки. То есть, в двух анализируемых  
397 субпопуляциях лимфоцитов в контрольной группе аллогенная сыворотка  
398 оказывала блокирующий эффект на экспрессию HLA-G, а в основной группе  
399 – активирующий. О том, что аллогенные характеристики самой молекула  
400 HLA-G достаточно консервативны говорилось выше, с этих позиций антитела  
401 к аллоантигенам и аутоантигенам могут быть низкоспецифичными и  
402 проявлять свой регуляторный эффект как к материнскому микроокружению,  
403 так и к эмбриональным/плодовым HLA-G.

404 Эффекты ИГЧ1 и ФГГ2 были схожи между собой и различались между  
405 основной и контрольной группами. Так для субпопуляции преимущественно  
Russian Journal of Immunology (Russia)

406 В-лимфоцитов ( $CD3^-$ ,  $HLA-DR^+$ ) оба иммунобиологические препараты  
407 демонстрировали блокирующий эффект в контрольной группе и слабый  
408 активирующий эффект в основной группе. Надо отметить, что аллогенная  
409 сыворотка на данную субпопуляцию лимфоцитов действовала с выраженным  
410 активирующим эффектом, и по нему значимо отличалась от ИГЧ1 и ФГГ2.  
411 Соответственно можно говорить о том, что иммунобиологические препараты  
412 снижают экспрессию HLA-G на В-лимфоцитах основной группы, но не до  
413 уровня контрольной группы.

414 Для субпопуляции Т-лимфоцитов ( $CD3^+$ ,  $HLA-DR^+$ ) эффекты ИГЧ1 и  
415 ФГГ2 были схожими, но в основной группе эти иммунобиологические  
416 препараты значимо не влияли на экспрессию молекулы HLA-G при сравнении  
417 их эффекта с аллогенной материнской сывороткой крови. В группе контроля  
418 эффекты ИГЧ1 и ФГГ2 по отношению к экспрессии HLA-G на двух  
419 анализируемых субпопуляциях лимфоцитов значимо не отличались от  
420 эффектов аллогенной материнской сыворотки крови. Эти феномены требуют  
421 дальнейшего изучения, в том числе с позиции протекции ВПС.

422 В таблице 4 представлены данные о анализе эффектов аллогенной  
423 материнской сыворотки крови, ФГГ2 и ИГЧ1 на экспрессию HLA-DR в  
424 основной и контрольной группах. Как видно из таблицы, аллогенная  
425 сыворотка проявляла блокирующий эффект на экспрессию HLA-DR в двух  
426 анализируемых субпопуляциях лимфоцитов в контрольной группе. В тоже  
427 время, этот эффект отсутствовал в основной группе и был, напротив,  
428 активирующим для субпопуляции  $CD3^-$ ,  $HLA-DR^+$  лимфоцитов. На  
429 субпопуляцию  $CD3^+$ ,  $HLA-DR^+$  лимфоцитов материнская аллогенная  
430 сыворотка влияла слабым блокирующим эффектом, стремящемся к нулю. По  
431 этим эффектам основная группа значимо отличалась от группы контроля  
432 (таблица 2). В отношении аллогенных или отцовских антител к HLA I и II  
433 классов при репродуктивных потерях и аномалий развития плода имеется  
434 достаточное количество научных исследований. Интерес к аллогенным  
435 антителам против HLA, индуцируемых во время беременности, не стихает с  
436 80х годов прошлого столетия [9]. Современные исследования на  
437 диагностических платформах LUMINEX подтверждают, что более 40%  
438 повторнородящих женщин имеют антитела против HLA I и II классов. Причем  
439 доказано, что удельный вес женщин, имеющих специфические антитела  
440 против отцовских HLA не превышает 20% из всей популяции. Соответственно  
441 из когорты женщин, имеющих антитела к HLA, это будет 50% [14]. При  
442 репродуктивных потерях, а возможно и при аномалиях развития плода,  
443 снижается как количество женщин, имеющих антитела к HLA I и II классов,  
444 так и их специфичность по отношению к отцовским HLA [14].  
445 Неспецифические в отношении отцовских, а значит и аллогенных  
446 эмбриональных/плодовых, HLA антитела не обладают блокирующим  
447 эффектом. Они могут быть триггерами в развитии воспалительных реакций в

448 системе «мать-эмбрион/плод», и через это усиливать экспрессию молекул  
449 HLA I и II классов.

450 Тем самым, аллоиммунные антитела к HLA-DR эмбриона/плода/ребенка  
451 являются значимыми регуляторными элементами как в отношении  
452 вынашивания беременности, так и для блокирования тератогенеза в сердечно-  
453 сосудистой системе.

454 Анализ эффектов ФГГ2 и ИГЧ1 на экспрессию HLA-DR на лимфоцитах  
455 ребенка показал следующие особенности. Так в отношении экспрессии HLA-  
456 DR на активированных Т-лимфоцитах (CD3<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>) ФГГ2 и ИГЧ1  
457 демонстрировали блокирующие эффекты как в контрольной группе, так и  
458 группе сравнения (таблица 2), причем эффект ФГГ2 по отношению к ИГЧ1  
459 был более выраженный в основной группе.

460 Для субпопуляции (CD3<sup>-</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>) лимфоцитов в контрольной группе  
461 оба иммунобиологических препарата (ИГЧ1 и ФГГ2) демонстрировали  
462 схожий блокирующий эффект, в то время как в основной группе эффект ИГЧ1  
463 был слабо активирующий, а ФГГ2 оставался блокирующим со значимым  
464 различие с эффектом аллогенной материнской сыворотки.

465 Таким образом, в патогенез ВПС вносит вклад активирующий эффект  
466 факторов материнской аллогенной сыворотки (женских гуморальных  
467 факторов). Донорский иммуноглобулин человека может блокировать это  
468 патогенное воздействие женских гуморальных факторов. Причем у  
469 иммуноглобулина, полученного от многорожавших женщин, этот эффект  
470 выражен в большей степени, и тем самым, он может претендовать не только  
471 на лечебный препарат аллогенных форм репродуктивных потерь, но и как  
472 иммунобиологический препарат, направленный для прегравидарной  
473 иммунной профилактики ВПС. Полученные результаты не противоречат  
474 основной концепции иммунологии репродукции и ограничения иммунного  
475 воспаления при сердечно-сосудистой патологии [1,11].

## 476 **6 Заключение**

477 Блокирующая активность женской сыворотки по отношению к  
478 аутогенным (собственным) и аллогенным (эмбриона/плода/ребенка)  
479 молекулам HLA-G и HLA-DR определяет протективный эффект в отношении  
480 формирования ВПС в последующем поколении. Донорский иммуноглобулин  
481 человека обладает схожими блокирующими эффектами к этим молекулам,  
482 возможно за счет наличия в нем аллоиммунных антител к HLA I и II классов.  
483 Фракция гаммаглобулина, полученная из донорской крови многорожавших  
484 женщин, обладает более выраженным блокирующим эффектом по отношению  
485 к экспрессии молекул HLA-G и HLA-DR. Тем самым, данный  
486 иммунобиологический препарат может быть прототипом лечебного и

487 профилактического средства, блокирующего патогенез врожденных пороков  
488 сердца.

**ТАБЛИЦЫ**

**Таблица 1.** Эффекты иммунобиологических препаратов (аутогенная сыворотка, ФГГ2, ИГЧ1) на изменения экспрессии молекул HLA-G в основной и контрольной группах женщин.

**Table 1.** Effects of immunobiological preparations (autogenous serum, FGG2, IIG1) on changes in the expression of HLA-G molecules in the main and control groups of women.

Эффекты иммунобиологических препаратов	Женщины контрольной группы			Женщины основной группы (дети с ВПС)			P
	Me	P25	P75	Me	P25	P75	
Изменение экспрессии CD3 <sup>-</sup> , HLA-G, аутогенная сыворотка, %	-34,24	-74,71	6,22	78,18	45,07	111,297	0,001
Изменение экспрессии CD3 <sup>-</sup> , HLA-G, ИГЧ1, %	-11,72	-36,79	13,36	-7,42	-21,53	6,693	>0,05
Изменение экспрессии CD3 <sup>-</sup> , HLA-G, ФГГ2, %	-12,76	-45,33	23,81	-10,67	-19,31	30,644	>0,05
P ауто/ИГЧ1	>0,05			0,009			P
P ауто/ФГГ2	>0,05			0,003			
Изменение экспрессии CD3 <sup>+</sup> , HLA-G, аутогенная сыворотка, %	-35,59	-54,73	-16,46	45,72	22,47	68,97	0,001
Изменение экспрессии CD3 <sup>+</sup> , HLA-G, ИГЧ1, %	-3,82	-21,15	16,78	-0,71	-19,67	21,09	>0,05
Изменение экспрессии CD3 <sup>+</sup> , HLA-G, ФГГ2, %	-12,67	-36,69	10,02	-2,01	-18,04	14,03	>0,05
P ауто/ИГЧ1	0,042			0,019			
P ауто/ФГГ2	>0,05			0,011			

**Таблица 2.** Эффекты иммунобиологических препаратов (аутогенная сыворотка, ФГГ2, ИГЧ1) на изменения экспрессии молекул HLA-DR в основной и контрольной группах женщин.

**Table 2.** Effects of immunobiological preparations (autogenous serum, FGG2, HIG1) on changes in the expression of HLA-DR molecules in the main and control groups of women.

Эффекты иммунобиологических препаратов	Женщины контрольной группы			Женщины основной группы (дети с ВПС)			P
	Me	P25	P75	Me	P25	P75	
Изменение экспрессии CD3 <sup>-</sup> , HLA-DR, аутогенная сыворотка, %	-15,21	-38,83	6,41	30,89	13,46	48,32	0,011
Изменение экспрессии CD3 <sup>-</sup> , HLA-DR, ИГЧ1, %	-24,19	-42,18	-6,20	8,66	-6,22	21,55	0,019
Изменение экспрессии CD3 <sup>-</sup> , HLA-DR, ФГГ2, %	-30,67	-52,23	-9,12	-11,47	-26,78	-0,84	>0,05
P ауто/ИГЧ1	>0,05			>0,05			P
P ауто/ФГГ2	>0,05			0,004			
Изменение экспрессии CD3 <sup>+</sup> , HLA-DR, аутогенная сыворотка, %	-46,95	-56,05	-37,85	8,68	-10,63	28,00	0,001
Изменение экспрессии CD3 <sup>+</sup> , HLA-DR, ИГЧ1, %	-15,88	-18,76	-12,99	4,49	-13,68	21,67	0,041
Изменение экспрессии CD3 <sup>+</sup> , HLA-DR, ФГГ2, %	-22,36	-37,09	-2,38	-10,52	-19,70	-1,35	>0,05
P ауто/ИГЧ1	>0,05			>0,05			P
P ауто/ФГГ2	>0,05			0,023			

**Таблица 3.** Эффекты иммунобиологических препаратов (материнская аллогенная сыворотка, ФГГ2, ИГЧ1) на изменения экспрессии молекул HLA-G в основной и контрольной группах детей.

**Table 3.** Effects of immunobiological preparations (maternal allogeneic serum, FGG2, IIG1) on changes in the expression of HLA-G molecules in the main and control groups of children.

Эффекты иммунобиологических препаратов	Дети контрольной группы			Дети основной группы (с ВПС)			P
	Me	P25	P75	Me	P25	P75	
Изменение экспрессии CD3 <sup>+</sup> , HLA-G, аллогенная сыворотка, %	-44,19	-72,70	-15,68	143,72	95,31	192,14	<0,001
Изменение экспрессии CD3 <sup>+</sup> , HLA-G, ИГЧ1, %	-56,62	-88,23	-37,01	17,71	-8,20	43,62	0,024
Изменение экспрессии CD3 <sup>+</sup> , HLA-G, ФГГ2, %	-18,62	-62,93	45,69	11,67	-7,07	30,42	>0,05
P алло/ИГЧ1	>0,05			0,031			P
P алло/ФГГ2	>0,05			0,027			
Изменение экспрессии CD3 <sup>+</sup> , HLA-G, аллогенная сыворотка	-41,40	-85,93	3,13	44,03	18,12	69,94	0,023
Изменение экспрессии CD3 <sup>+</sup> , HLA-G, ИГЧ1	-75,45	-83,28	-67,61	15,39	-3,71	37,07	0,009
Изменение экспрессии CD3 <sup>+</sup> , HLA-G, ФГГ2	-65,72	-87,83	-43,61	12,45	-3,45	28,36	0,017
P алло/ИГЧ1	>0,05			>0,05			
P алло/ФГГ2	>0,05			>0,05			

**Таблица 4.** Эффекты иммунобиологических препаратов (материнская аллогенная сыворотка, ФГГ2, ИГЧ1) на изменения экспрессии молекул HLA-DR в основной и контрольной группах детей.

**Table 4.** Effects of immunobiological preparations (maternal allogeneic serum, FGG2, IIG1) on changes in the expression of HLA-DR molecules in the main and control groups of children.

Эффекты иммунобиологических препаратов	Дети контрольной группы			Дети основной группы (с ВПС)			P
	Me	P25	P75	Me	P25	P75	
Изменение экспрессии CD3 <sup>+</sup> , HLA-DR, аллогенная сыворотка, %	-21,51	-24,96	-18,06	36,44	15,93	56,95	0,025
Изменение экспрессии CD3 <sup>+</sup> , HLA-DR, ИГЧ1, %	-15,49	-19,29	-11,68	2,30	-9,54	14,14	0,046
Изменение экспрессии CD3 <sup>+</sup> , HLA-DR, ФГГ2, %	-16,32	-24,91	-7,72	-9,44	-15,88	-3,00	>0,05
P алло/ИГЧ1	>0,05			0,048			P
P алло/ФГГ2	>0,05			0,027			
Изменение экспрессии CD3 <sup>+</sup> , HLA-DR, аллогенная сыворотка	-27,38	-34,77	-14,99	-3,67	-16,06	5,73	0,049
Изменение экспрессии CD3 <sup>+</sup> , HLA-DR, ИГЧ1	-45,53	-56,33	-34,74	-8,00	-14,79	-1,20	0,037
Изменение экспрессии CD3 <sup>+</sup> , HLA-DR, ФГГ2	-51,59	-56,71	-46,48	-24,65	-31,28	-18,02	0,045
P алло/ИГЧ1	>0,05			>0,05			
P алло/ФГГ2	>0,05			>0,05			

**Примечания:** ауто – аутогенная сыворотка;

алло – аллогенная сыворотка.

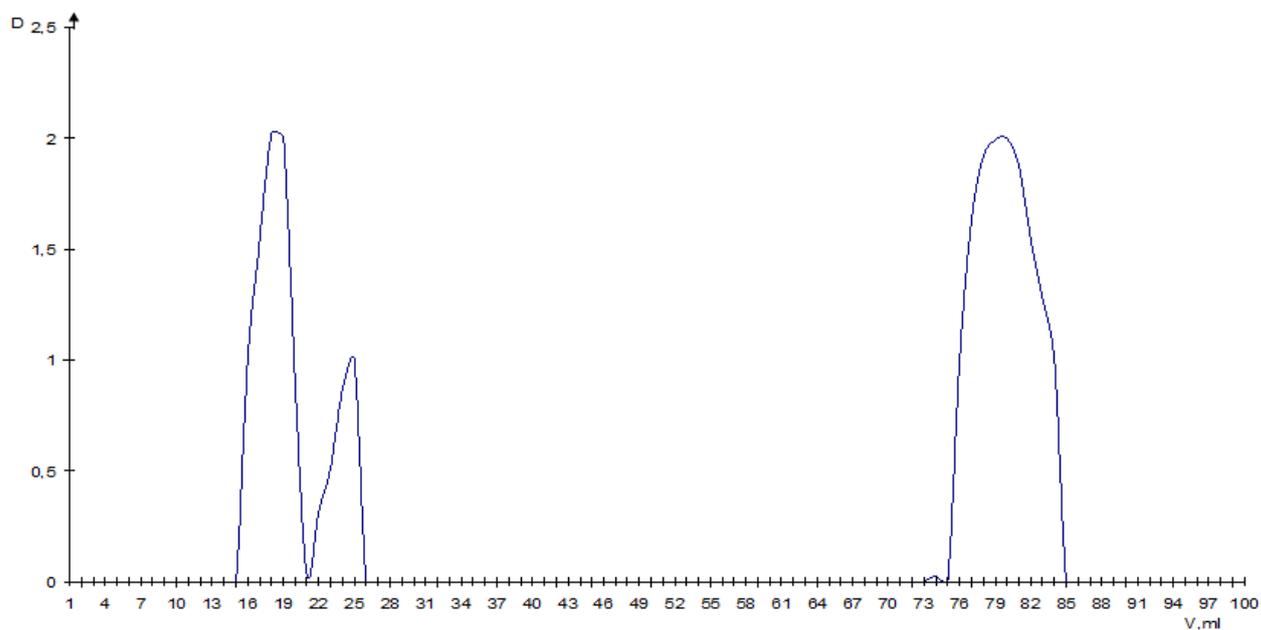
**Notes:** auto – autogenous serum;

allo – allogeneic serum.

## РИСУНКИ

**Рисунок 1.** Хроматограмма выделения ФГГ с объемом элюции 16-20 мл и десорбированного сывороточного белка с объемом элюции 75-85 мл.

**Figure 1.** Chromatogram of the isolation of FGG with an elution volume of 16-20 ml and desorbed whey protein with an elution volume of 75-85 ml.



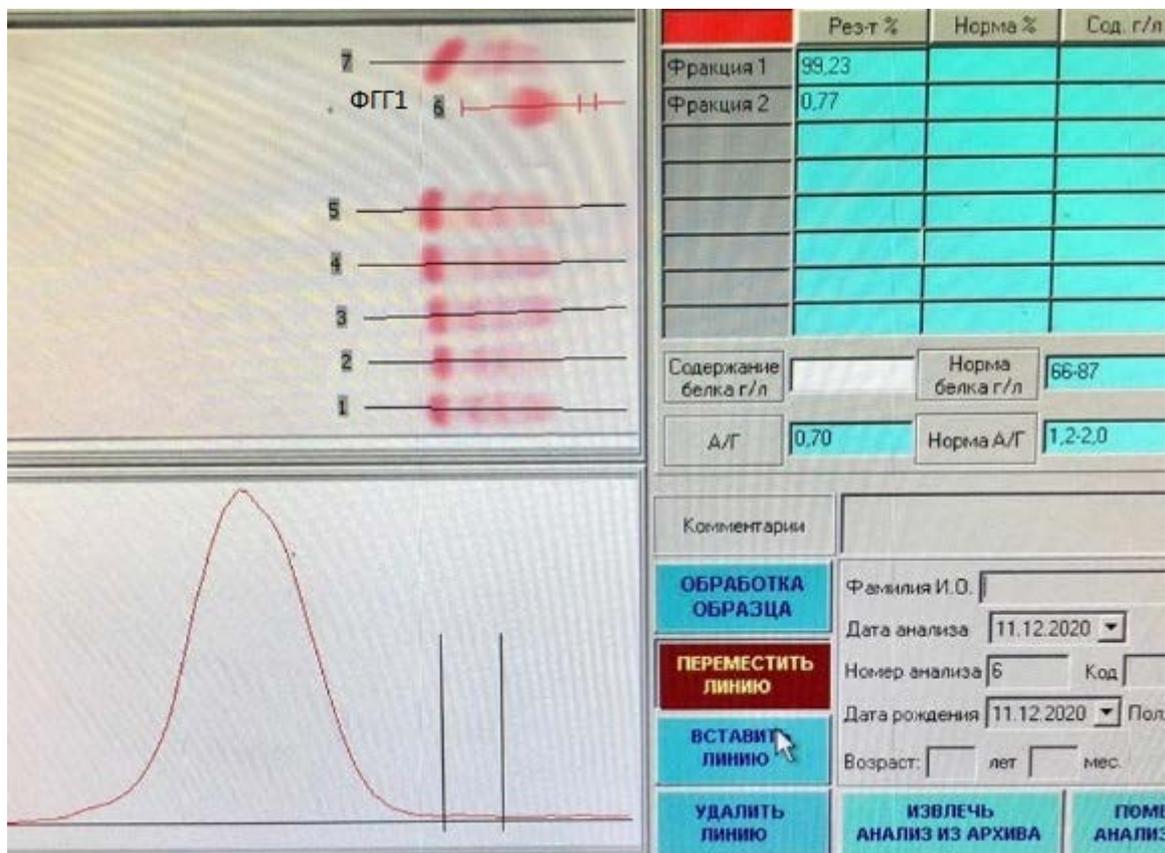
**Рисунок 2.** Электрофорез хроматографического смыва в 1,5% агарозном геле, окраска Суданом черным.

**Figure 2.** Electrophoresis of chromatographic wash in 1.5% agarose gel, stained with Sudan black.



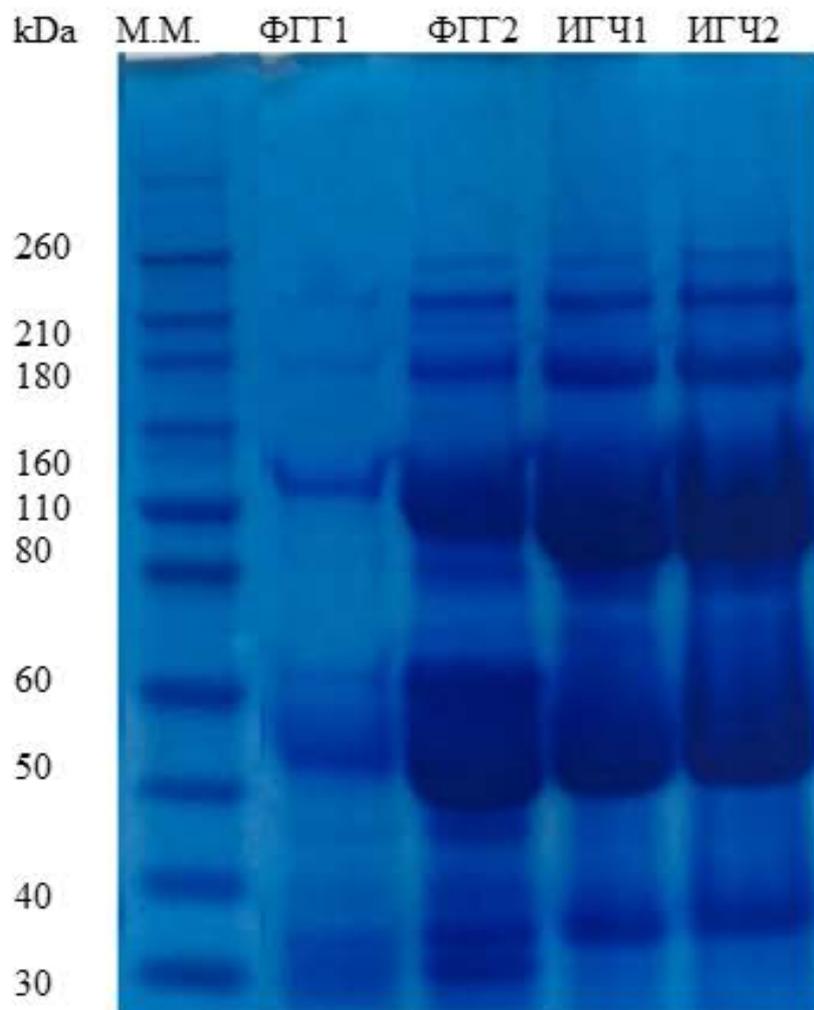
**Рисунок 3.** Электрофоретическое разделение белковой фракции сыворотки крови на мембранах ацетилцеллюлоза (КлиниТест-ЭФ, Россия). Дорожка №6, ФГГ1 является анализируемым образцом.

**Figure 3.** Electrophoretic separation of the protein fraction of blood serum on cellulose acetate membranes (CliniTest-EF, Russia). Lane No. 6, FGG1 is the analyzed sample



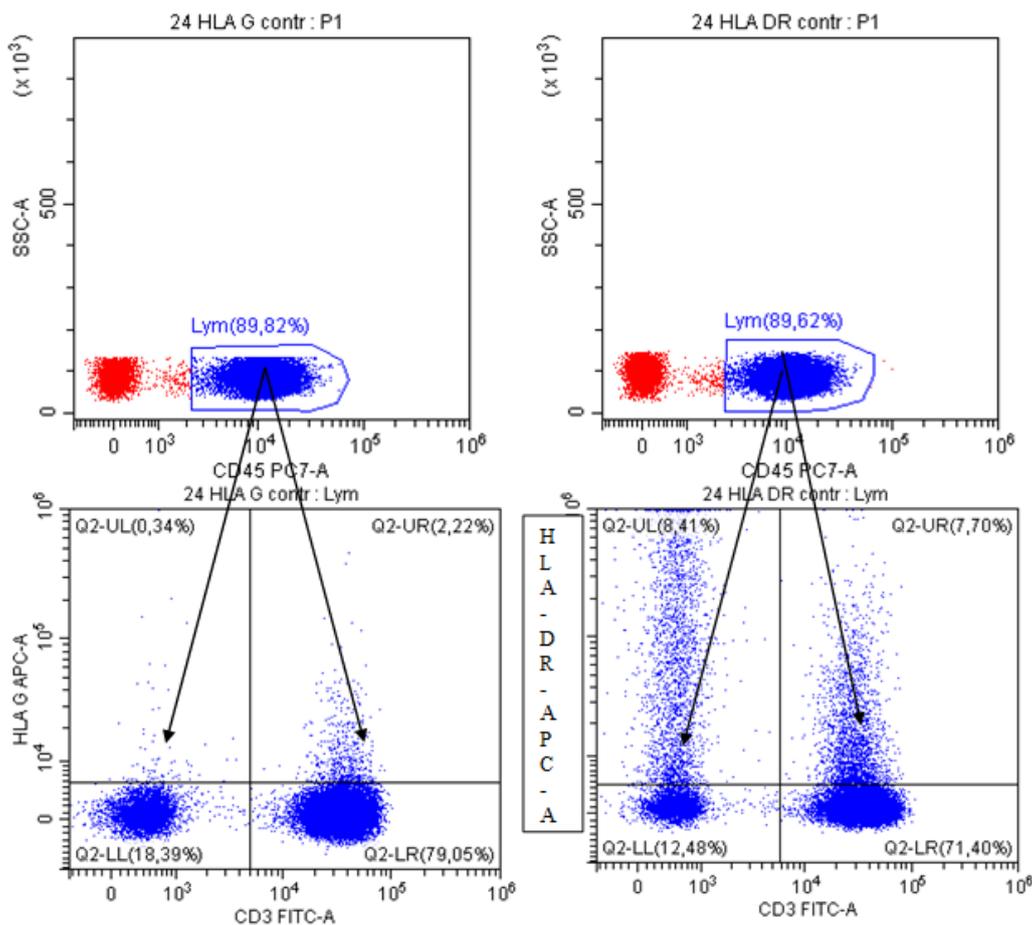
**Рисунок 4.** SDS-PAGE электрофорез. М.М. – молекулярная масса. kDa – кило Дальтоны.

**Figure 4.** SDS-PAGE electrophoresis. M.M. - molecular mass. kDa – kilo Daltons.



**Рисунок 5.** Протокол проточной цитофлуометрии для анализа экспрессии молекул HLA-G и HLA-DR на лимфоцитах женщин и детей в полной среде (сбор клеток прекращался при достижении 10 000 лимфоцитов по гейту SSC-A/CD45 PC-7A).

**Figure 5.** Flow cytometry protocol for analyzing the expression of HLA-G and HLA-DR molecules on lymphocytes from women and children in complete medium (cell collection stopped when reaching 10,000 lymphocytes using the SSC-A/CD45 PC-7A gate).



## ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ\_МЕТАДААННЫЕ

### Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

**Синицкая Анна Викторовна** – к.б.н., научный сотрудник лаборатории геномной медицины, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний». ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»;

индекс: 650002;

телефон: 8-950-586-33-97;

e-mail: [seroav1991@gmail.com](mailto:seroav1991@gmail.com)

**Sinitskaya Anna Viktorovna** – PhD, Researcher, Laboratory of Genomic Medicine, Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases. Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases;

index: 650002;

telephone: 8-950-586-33-97;

e-mail: [seroav1991@gmail.com](mailto:seroav1991@gmail.com)

### Блок 2. Информация об авторах

**Шабалдин Андрей Владимирович** – д.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории пороков сердца, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»;

адрес: 650002, Кемерово, Сосновый бульвар 6;

телефон: 8(903)907-51-97;

e-mail: [weit2007@yandex.ru](mailto:weit2007@yandex.ru)

**Shabaldin Andrey Vladimirovich** – Doctor of Medical Sciences, Associate Professor, Leading Researcher, Laboratory of Heart Diseases, Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases;

address: Kemerovo, 6, Sosnoviy blvd, 650002, Kemerovo;

telephone: 8(903)907-51-97;

e-mail: [weit2007@yandex.ru](mailto:weit2007@yandex.ru)

**Синицкая Анна Викторовна** – к.б.н., научный сотрудник лаборатории геномной медицины, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»;

адрес: 650002, Кемерово, Сосновый бульвар 6;

телефон: 8(3842)34-53-77;

e-mail: [cepoav1991@gmail.com](mailto:cepoav1991@gmail.com)

**Sinitetskaya Anna Viktorovna** – PhD, Researcher, Laboratory of Genomic Medicine, Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases;

address: Kemerovo, 6, Sosnoviy blvd, 650002, Kemerovo;

telephone: 8(3842)34-53-77;

e-mail: [cepoav1991@gmail.com](mailto:cepoav1991@gmail.com)

**Шмулевич Светлана Александровна** – к.м.н., детский кардиолог, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»;

адрес: 650002, Кемерово, Сосновый бульвар 6;

телефон: 8(3842)64-45-80;

e-mail: [smulsa@kemcardio.ru](mailto:smulsa@kemcardio.ru)

**Shmulevich E. O.** – PhD, pediatric cardiologist, Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases;

address: Kemerovo, 6, Sosnoviy blvd, 650002, Kemerovo;

telephone: 8(3842)64-45-80;

e-mail: [smulsa@kemcardio.ru](mailto:smulsa@kemcardio.ru)

**Гришачева Е. О.** – клинический ординатор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»;

адрес: 650002, Кемерово, Сосновый бульвар 6;

телефон: 8(3842)64-45-80;

e-mail: [grisheo@kemcardio.ru](mailto:grisheo@kemcardio.ru)

**Grishacheva E. O.** – clinical resident, Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases;

address: Kemerovo, 6, Sosnoviy blvd, 650002, Kemerovo;

telephone: 8(3842)64-45-80;

e-mail: [grisheo@kemcardio.ru](mailto:grisheo@kemcardio.ru)

**Шабалдина Е. В.** – д.м.н., заведующая кафедрой оториноларингологии, ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, Кемерово, Россия;

телефон: 8(903)907-51-97;

e-mail: [weit2007@yandex.ru](mailto:weit2007@yandex.ru)

**Shabaldina E. V.** – Doctor of Medical Sciences, Head of the Department of Otorhinolaryngology, Kemerovo State Medical University, Russian Federation; address: 22a, Voroshilova Street, Kemerovo, 650003; telephone: 8(903)907-51-97; e-mail: [weit2007@yandex.ru](mailto:weit2007@yandex.ru)

**Деева Н. С.** – врач кардиолог, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»; адрес: 650002, Кемерово, Сосновый бульвар 6; телефон: 8(3842)64-45-80; e-mail: [deevns@kemcardio.ru](mailto:deevns@kemcardio.ru)

**Deeva N. S.** – Cardiologist, Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases; address: Kemerovo, 6, Sosnoviy blvd, 650002, Kemerovo; telephone: 8(3842)64-45-80; e-mail: [deevns@kemcardio.ru](mailto:deevns@kemcardio.ru)

### **Блок 3. Метаданные статьи**

ПОЛУЧЕНИЕ ДОНОРСКОГО ГАММАГЛОБУЛИНА ОТ МНОГОРОЖАВШИХ ЖЕНЩИН, И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА ЭКСПРЕССИЮ МОЛЕКУЛ HLA-G И HLA-DR ЛИМФОЦИТОВ ЖЕНЩИН, ИМЕЮЩИХ ДЕТЕЙ С СЕПТАЛЬНЫМИ ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ СЕРДЦА

OBTAINING DONOR GAMMAGLOBULIN FROM MULTIPAROUS WOMEN, AND ITS EFFECT ON THE EXPRESSION OF HLA-G AND HLA-DR MOLECULES IN LYMPHOCYTES OF WOMEN WITH CHILDREN WITH SEPTAL CONGENITAL HEART DEFECTS

**Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:**

ПОЛУЧЕНИЕ ДОНОРСКОГО ГАММАГЛОБУЛИНА  
OBTAINING DONOR GAMMAGLOBULIN

**Ключевые слова:** фракции гаммаглобулина, врожденные пороки сердца, HLA-G, HLA-DR, антитела.

**Keywords:** congenital heart defects, HLA-DR, HLA-G, antibody.

Оригинальные статьи.

Количество страниц текста – 13, количество таблиц – 4, количество рисунков – 5.

18.07.2023

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи или ее doi
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. <i>Complex Issues of Cardiovascular Diseases</i> . 2021, vol.10, no.2, pp. 113-124. (In Russ.)	DOI: 10.17802/2306-1278-2021-10-2-113-124.
2	Дубоссарская, З.М., Дубоссарская, Ю.А. Основные вопросы иммунологии репродукции // Медицинские аспекты здоровья женщины. 2010. – Т. 31, № 4. – С. 15-21.	Dubossarskaya Z.M., Dubossarskaya Yu.A. Basic issues of reproduction immunology. <i>Medical aspects of women's health</i> , 2010, vol 31, no. 4, pp. 15-21	
3	Есина Е. В., Логина Н. Ю., Аляутдина О. С. Роль иммунных взаимодействий в развитии бесплодия: обзор литературы // Российский 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 literature review. <i>Russian Medical Journal. mother and child</i> . 2013, vol. 21, no.1, pp. 44-48	<a href="https://www.rmj.ru/articles/ginekologiya/Roly_immunnyh_vzaimodeystviy_v_r">https://www.rmj.ru/articles/ginekologiya/Roly_immunnyh_vzaimodeystviy_v_r</a>

			azvitii_besplodiya_obzor_literatury/
4	Романенко Н.А., Бессмельцев С.С., Чечёткин А.В. Коррекция иммунного статуса пациентов иммуноглобулином человека для внутривенного введения // Казанский медицинский журнал. – 2017. – Т. 5. – С. 775-783.	Romanenko N.A., Bessmel'tsev S.S., Chechetkin A.V. Orrection of patients' immune status with human intravenous immunoglobulin. <i>Kazan medical journal</i> , 2017, vol.5, pp. 775-783	<a href="https://cyberleninka.ru/article/n/korrektsiya-immunnogo-statusa-patsientov-immunoglobulinom-cheloveka-dlya-vnutrivennogo-vvedeniya">https://cyberleninka.ru/article/n/korrektsiya-immunnogo-statusa-patsientov-immunoglobulinom-cheloveka-dlya-vnutrivennogo-vvedeniya</a>
5	Способ определения антител к аллогенным HLA-G. Шабалдин А.В., Мозес В.Г., Беленкова О.В., Шабалдина Е.В. Патент на изобретение RU 2585091 C1, 27.05.2016. Заявка № 2015101526/15 от 19.01.2015.	Method for determination of antibodies to allogeneic HLA-G. Shabaldin A.V., Mozes V.G., Belenkova O.V., Shabaldina E.V. Patent for invention RU 2585091 C1, May 27, 2016. Application No. 2015101526/15 dated 01/19/2015.	<a href="https://patents.google.com/patent/RU2585091C1/ru">https://patents.google.com/patent/RU2585091C1/ru</a>
6	Шабалдин А.В., Гривцова С.В., Деева Н.С., Шмудевич 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 //	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. <i>Medical Immunology (Russia)</i> , 2021, vol. 23, no. 1, pp. 143-148.	DOI:10.15789/1563-0625-CIT-2013

	Медицинская иммунология. – 2021. – Т.23, № 1. – С. 143-148.		
7	Шабалдин А.В., Деева Н.С., Сухих А.С., и др. Изменение экспрессии мембранных молекул HLA-G у женщин, имеющих детей с врожденными пороками сердца, под воздействием фракции гамма-глобулинов, полученной из плазмы крови многорожавших женщин // Российский иммунологический журнал. – 2021. – Т. 24, №3. – С. 373-376.	Shabalдин A.V., Deeva N.S., Sukhikh A.S., et al. 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. <i>Russian Journal of Immunology</i> , 2021, Vol. 24, no.3, pp. 373-376.	DOI: 10.46235/1028-7221-987-AEO
8	Chen L., Guan J., Wei Q., Yuan Z., Zhang M. Potential role of “omics” technique in prenatal diagnosis of congenital heart defects. <i>Clinica Chimica Acta</i> , 2018, vol. 482, pp. 185-190.		DOI: 0.1016/j.cca.2018.04.011
9	Densmore T. L., Tim Goodnough L., Ali S., Dynis M., Chaplin H. Prevalence of HLA sensitization in female apheresis donors. <i>Transfusion</i> .1999, vol. 39, no. 1, pp. 103-106.		DOI: 10.1046/j.1537-2995.1999.39199116901.x.
10	Lynge Nilsson L., Djuriscic S., Hviid T. V. F. Controlling the immunological crosstalk during conception and pregnancy: HLA-G in reproduction. <i>Frontiers in immunology</i> .2014, vol. 5, pp. 198.		DOI: 10.3389/fimmu.2014.00198. eCollection 2014.

11	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. <i>Clin Exp Immunol.</i> 2001, vol.124, no.1, pp. 9-15.		DOI: 10.1046/j.1365-2249.2001.01497.x.
12	Nyborg K.M., Kolte A.M., Larsen E.C., Christiansen O.B. Immunomodulatory treatment with intravenous immunoglobulin and prednisone in patients with recurrent miscarriage and implantation failure after in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection. <i>Fertil Steril.</i> 2014, Vol.102, no. 6, pp. 1650-1655.		DOI: 10.1016/j.fertnstert.2014.08.029.
13	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? <i>Human immunology.</i> 2020, vol. 81, no. 4, pp. 127-133.		DOI: 10.1016/j.humimm.2019.09.006.
14	Prieto-Casal F., Cabañas-Gadea C., Figueredo-López S., Villagra-Carrón V. Fetomaternal immunization against HLA antigens in women from a Paraguayan population. <i>Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud.</i> 2021, vol. 19, no. 1, pp. 48-57		DOI: 10.18004/mem.iics/1812-9528/2021.019.01.48.

15	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. <i>Medical Immunology (Russia)</i> , 2016, vol. 21, no. 2, pp. 279-292.		DOI: 10.15789/1563-0625-2019-2-279-292
16	Wu Q.Y. To promote the sustainable development of surgical treatment for congenital heart disease by innovation and practice. <i>Zhonghua Wai Ke Za Zhi</i> . 2018, vol. 56, no. 6, pp. 407-409.		DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5815.2018.06.003.