

## 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

Шабалдин А.В.<sup>1,2</sup>, Деева Н.С.<sup>1</sup>, Сухих А.С.<sup>2</sup>, Вавин Г.В.<sup>2</sup>, Крюков П.М.<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Кемерово, Россия

**Резюме.** Высокий уровень рождения детей с врожденными пороками сердца (ВПС) и существенный вклад этой патологии в формирование перинатальной, младенческой и детской смертности, а также уровень инвалидизации детей, в том числе после радикального хирургического лечения, определяют значимость поиска методов прогнозирования и профилактики риска формирования ВПС на этапе планирования беременности. Одной из ключевых молекул, участвующей в иммунных взаимодействиях материнского микроокружения с эмбрионом, является HLA-G. Известно, что наибольшее количество антител к антигенам HLA различных классов выявляется у многорожавших женщин. Остается открытым вопрос, через какие молекулы HLA реализуется эффект блокирования иммунного воспаления в системе «мать — эмбрион» — женские антитела или донорский иммуноглобулин.

Целью исследования было получение очищенного гамма-глобулинового препарата из крови многорожавших женщин и оценка его функциональной активности в отношении женских молекул HLA-G.

Гамма-глобулиновую фракцию (ГГФ) из крови многорожавших женщин получали с помощью аффинной хроматографии на системе DEAE Affi-Gel Blue (BioRad, США). Были сформированы две группы: контрольная группа из 14 здоровых мужчин и опытная из 14 женщин, имеющих детей с врожденными пороками сердца. Особенности изменения экспрессии HLA-G на лимфоцитах под воздействием ГГФ были оценены с помощью протокола проточной цитофлуориметрии с расчетом соответствующих коэффициентов в процентах.

Оценка функциональной активности концентрированной ГГФ показала, что в контрольной группе под ее воздействием подавлялась экспрессия HLA-G на CD3 положительных и отрицательных лимфоцитах по отношению к действию аутоыворотки. В основной группе эффект ГГФ на экспрессию HLA-G был разнонаправленным. Так, на лимфоцитах CD3 отрицательных ГГФ значимо подавляла

### Адрес для переписки:

Шабалдин Андрей Владимирович  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»  
650002, Россия, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6.  
Тел.: 8 (903) 907-51-97.  
E-mail: weit2007@yandex.ru

### Address for correspondence:

Shabaldin Andrey V.  
Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases  
650002, Russian Federation, Kemerovo, Sosnoviy blvrd, 6.  
Phone: 7 (903) 907-51-97.  
E-mail: weit2007@yandex.ru

### Образец цитирования:

А.В. Шабалдин, Н.С. Деева, А.С. Сухих, Г.В. Вавин, Крюков П.М. «Изменение экспрессии мембранных молекул HLA-G у женщин, имеющих детей с врожденными пороками сердца, под воздействием фракции гамма-глобулинов, полученной из плазмы крови многорожавших женщин» // Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 3. С. 373-376.  
doi: 10.46235/1028-7221-987-AEO

© Шабалдин А.В. и соавт., 2021

### For citation:

A.V. Shabaldin, N.S. Deeva, A.S. Sukhikh, G.V. Vavin, P.M. Kryukov "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", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 3, pp. 373-376.  
doi: 10.46235/1028-7221-987-AEO  
DOI: 10.46235/1028-7221-987-AEO

экспрессию мембранной молекулы HLA-G при сравнении с контрольной группой. В то же время по отношению к лимфоцитам CD3<sup>+</sup> ГГФ оказывала стимулирующий эффект или не оказывала блокирующего эффекта. Полученный препарат может быть прототипом иммуноглобулина для внутривенного введения. Кроме того, в дальнейшем можно будет использовать подобные иммуноглобулиновые препараты для иммунной профилактики несиндромальных спорадических ВПС на прегравидарном этапе, так и для лечения в ранние сроки беременности. Лечебный эффект будет заключаться в блокировании свободных для распознавания HLA-молекул эмбриобласта.

*Ключевые слова:* гамма-глобулин, врожденные пороки сердца, иммунопрофилактика

## 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

Shabaldin A.V.<sup>a,b</sup>, Deeva N.S.<sup>a</sup>, Sukhikh A.S.<sup>b</sup>, Vavin G.V.<sup>b</sup>, Kryukov P.M.<sup>b</sup>

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

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

**Abstract.** High incidence of newborns with inborn heart defects (HD) and sufficient contribution of this disorder into perinatal, infant and pediatric mortality, as well as disability levels, even after radical surgical treatment determine significance of search for novel methods of prediction and prevention of appropriate HD risks at the stage of pregnancy planning. HLA-G is among key molecules participating in immune interactions between maternal microenvironment and embryos. Maximal antibody titers for HLA antigens is detected in multiparous women. However, the question remains open, which HLA molecules participate in blockage of immune inflammation in the mother-embryo system: either by maternal antibodies, or by donor immune globulins. Hence, the aim of our study was to obtain enriched  $\gamma$ -globulin preparation from blood of multiparous women and evaluation of its activity towards female HLA-G molecules.

The  $\gamma$ -globulin fraction (GGF) was obtained from blood plasma of multiparous women by means of affine chromatography using DEAE Affi-Gel Blue system (BioRad, USA). We have formed 2 groups: a control group (14 healthy males), and experimental group of 14 women who gave birth to the children with inborn heart defects. The changes of HLA-G expression on lymphocytes exposed to GGF were evaluated according to a flow cytometry protocol with calculation of percentage values using appropriate quotients. Evaluation of functional activity exerted by the GGF concentrate in control group showed inhibition of HLA-G expression on CD3<sup>+</sup> and CD<sup>-</sup>-lymphocytes against effects of autologous serum. GGF effects in experimental group upon HLA-G expression were differently directed, e.g., GGF sufficiently inhibited membrane HLA-G expression on the CD3-negative lymphocytes, compared to control group. Meanwhile, GGF showed stimulatory effect upon CD3<sup>+</sup>-lymphocytes, or it did not show any inhibitory action. The preparation obtained may serve as prototype for intravenous infusion. Moreover, in future one may use such immunoglobulin preparations, both for immune prophylaxis of non-syndromal sporadic HDs at the pregravidary stage, as well as at early terms of pregnancy. The therapeutic effect will be achieved due to blockage of embryoblast HLA molecules available to recognition.

*Keywords:*  $\gamma$ -globulin, inborn heart defects, immune prophylaxis

Исследование выполнено при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0546-2019-0002.

### Введение

Известно, что врожденные пороки сердца (ВПС) являются ведущей аномалией раннего онтогенеза, которая определяет уровень неонаталь-

ной и младенческой смертности, а также уровень инвалидизации детей, в том числе после радикального хирургического лечения [4]. Именно это определяет значимость поиска методов профилактики риска формирования ВПС на этапе планирования беременности.

Высказано мнение, что спорадические несиндромальные ВПС, удельный вес которых в структуре ВПС составляет свыше 80%, могут формироваться в результате иммунного конфликта по HLA в системе «мать – плод», за счет декомпенсации локального воспаления [1].

С этих позиций иммуноглобулиновые препараты, широко используемые для лечения аллоиммунных форм репродуктивных потерь, могут выступить прототипом для иммунной профилактики спорадических несиндромальных ВПС на прегравидарном этапе.

Одной из ключевых молекул, участвующих в иммунных взаимодействиях материнского микроокружения с эмбрионом, является HLA-G. Известно, что наибольшее количество антител к антигенам HLA различных классов выявляется у многорожавших женщин [3]. Остается открытым вопрос, через какие молекулы HLA реализуется эффект блокирования иммунного воспаления в системе «мать – эмбрион» – женские антитела или донорский иммуноглобулин.

Исходя из этого, была поставлена **цель исследования** – получение очищенного гамма-глобулинового препарата из крови многорожавших женщин и оценка его функциональной активности в отношении женских молекул HLA-G.

## Материалы и методы

Для получения очищенной гамма-глобулиновой фракции (ГГФ) из крови многорожавших женщин была выполнена аффинная хроматография при помощи системы DEAE Affi-Gel Blue (BioRad, США). Оценка функциональной активности иммуноглобулинового препарата в отношении молекул HLA-G была выполнена на лимфоцитах, полученных из периферической крови 14 условно здоровых мужчин репродуктивного возраста (контрольная группа) и 14 женщин, имеющих детей с СНВПС (основная группа). Использовали проточную цитофлуориметрию, выполненную на приборе Cytomics FC 500 с программным обеспечением СХР (Beckman Coulter, США). Особенности изменения экспрессии HLA-G на донорских лимфоцитах под воздействием ГГФ были оценены с помощью протокола проточной цитофлуориметрии с расчетом соответствующих коэффициентов, в процентах [2]. Статистическая обработка данных проводили в пакетах программ STATISTICA версия 10.0 и MedCalc 17.5.3. по правилам вариационной статистики.

Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

На первом этапе было получено 42 мл иммуноглобулиновой фракции с концентрацией общего белка 4,3 г/л и остаточным альбумином менее 0,1 г/л (Architect C8000, Abbott, США). Концентрация белка в полученной фракции соответствовала нижней границе концентрации иммуноглобулина G в сыворотке крови человека. Иммуноэлектрофорез показал, что в хроматографическом смыве имеется только гамма-глобулиновая фракция (ГГФ).

Коммерческие иммуноглобулиновые препараты имеют концентрацию от 60 до 100 г/л. Исходя из этого, провели концентрирование полученной ГГФ с использованием лиофилизации (LABCONCO, США) и повторным разведением лиофилизата в 4 мл физиологического раствора NaCl (0,9%). Повторное исследование концентрации белка в полученном растворе показало величину, равную 40 г/л, с минимальным остаточным альбумином.

Тем самым на первом этапе исследования был получен близкий к коммерческому препарат гамма-глобулина с концентрацией 40 г/л.

Оценка функциональной активности концентрированной ГГФ показала, что в контрольной группе под ее воздействием подавлялась экспрессия HLA-G на CD3 положительных и отрицательных лимфоцитах, по отношению к действию ауто сыворотки (Me -13,57%,  $Q_{0,25}$  -46,59%,  $Q_{0,75}$  +19,38; Me -18,51%,  $Q_{0,25}$  -33,17%,  $Q_{0,75}$  -3,86 соответственно). Это изменение видимой экспрессии мембранной HLA-G могло быть результатом ее блокирования соответствующими антителами, входящими в состав ГГФ.

В основной группе (женщины, имеющие детей с спорадическими несиндромальными ВПС) эффект ГГФ на экспрессию HLA-G был разнонаправленным. Так, на лимфоцитах CD3 отрицательных ГГФ значимо подавляла экспрессию мембранной молекулы HLA-G (Me -37,19%,  $Q_{0,25}$  -58,64%,  $Q_{0,75}$  -15,68; против Me -13,57%,  $Q_{0,25}$  -46,59%,  $Q_{0,75}$  +19,38 в контроле,  $p = 0,02$ ) при сравнении с контрольной группой. В то же время по отношению к лимфоцитам CD3 положительным ГГФ оказывала стимулирующий эффект или не оказывала блокирующего эффекта. При сравнении этих показателей с контрольной группой также выявлено значимое различие (Me +8,21%,  $Q_{0,25}$  -27,81%,  $Q_{0,75}$  +50,38; против Me -18,51%,  $Q_{0,25}$  -33,17%,  $Q_{0,75}$  -3,86 в контроле,  $p = 0,01$ ).

## Заключение

Таким образом, очищенная гамма-глобулиновая фракция донорской крови многорожавших

женщин может оказать значимый иммунопрофилактический эффект на иммунные нарушения в системе «мать – эмбрион», через моделирование антителами экспрессии HLA-G на различных субпопуляциях женских лимфоцитов. Этот феномен гамма-глобулиновой фракции может быть основным для предотвращения формирования спорадических несиндромальных врожденных по-

роков сердца, а полученный препарат может быть прототипом иммуноглобулина для внутривенного введения, направленного для прегравидарной профилактики врожденных пороков сердца.

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы / References

1. Нагорнева С.В., Прохорова В.С., Шелаева Е.В., Худовекова А.М. Анализ частоты выявления врожденных пороков развития у плодов за последние 5 лет (2013-2017) // Журнал акушерства и женских болезней, 2018. Т. 67, № 3. С. 44-48. [Nagorneva S.V., Prokhorova V.S., Shelaeva E.V., Khudovekova A.M. The prevalence of congenital fetal anomalies for the past 5 years (2013-2017). *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney = Journal of Obstetrics and Women's Diseases*, 2018, Vol. 67, no. 3, pp. 44-48. (In Russ.)]
2. 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 the determination of antibodies to allogeneic HLA-G. Shabaldin A.V., Moses V.G., Belenkova O.V., Shabaldina E.V. Invention patent RU 2585091 C1, 05/27/2016. Application No. 2015101526/15 dated 19.01.2015].
3. Шабалдин А.В., Шмудевич С.А., Чистякова Г.Н., Ремизова И.И., Лукоянычева Е.Б., Горшкова С.В., Шабалдина Е.В. Особенности аллогенных взаимодействий в краткосрочной культуре лимфоцитов супругов, имеющих детей с врожденными пороками сердца или ранние репродуктивные потери // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 2. С. 279-292. [Shabaldin A.V., Shmulevich S.A., Chistyakova G.N., Remizova I.I., Lukoyancheva E.B., Gorshkova S.V., Shabaldina E.V. Peculiarities of allogenic interactions in the short-term culture of lymphocytes of spouses who have children with congenital heart diseases or early reproductive losses. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol.21, no. 2, pp. 279-292. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-279-292.
4. Wu Q.Y. To promote the sustainable development of surgical treatment for congenital heart disease by innovation and practice. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*, 2018, Vol. 56, no. 6, pp. 407-409.

#### Авторы:

**Шабалдин А.В.** — д.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории пороков сердца ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»; профессор кафедры микробиологии, иммунологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Кемерово, Россия

**Деева Н.С.** — ординатор 1-го года ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

**Сухих А.С.** — к.фарм.н., старший научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Кемерово, Россия

**Вавин Г.В.** — к.м.н., заведующий центральной научно-исследовательской лабораторией ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Кемерово, Россия

**Крюков П.М.** — к.м.н., ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Кемерово, Россия

#### Authors:

**Shabaldin A.V.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Leading Research Associate, Laboratory of Heart Defects, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases; Professor, Department of Microbiology, Immunology and Virology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

**Deeva N.S.**, Ordinator, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

**Sukhikh A.S.**, PhD, MD (Pharmacy), Senior Research Associate, Central Research Laboratory, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

**Vavin G.V.**, PhD (Medicine), Head, Central Research Laboratory, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

**Kryukov P.M.**, PhD (Medicine), Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Поступила 17.05.2021  
Принята к печати 20.07.2021

Received 17.05.2021  
Accepted 20.07.2021