

ВЛИЯНИЕ ЖЕНСКОЙ АУТОСЫВОРОТКИ КРОВИ НА АЛЛОГЕННЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В КРАТКОСРОЧНОЙ КУЛЬТУРЕ ЛИМФОЦИТОВ СУПРУГОВ, ИМЕЮЩИХ ДЕТЕЙ С КОНОТРУНКАЛЬНЫМИ ПОРОКАМИ

С.В. Горшкова¹, С.А. Шмулевич³, А.В. Шабалдин^{1,2} ✉, Н.С. Деева¹, А.В. Цепочкина¹,
Е.Б. Лукоянычева⁴, Г.В. Вавин⁴, Л.В. Антонова¹, Е.В. Шабалдина²

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Сосновский бульвар, 6, Кемерово, Российская Федерация, 650002; ²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Ворошилова 22а, Кемерово, Российская Федерация, 650056; ³Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Кемеровской области «Кемеровский областной клинический кардиологический диспансер имени академика Л.С. Барбараша», Сосновский бульвар, 6, Кемерово, Российская Федерация, 650002; ⁴Государственное автономное учреждение здравоохранения Кемеровской области «Кемеровская областная клиническая больница» имени С.В. Беляева, Октябрьский пр., 22, Кемерово, Российская Федерация, 650061

Основные положения

- Полученные данные оригинального исследования позволят выявлять нарушения в гуморальной регуляции иммунных взаимодействий матери и полуаллогенного по HLA эмбриона/плода, как фактора риска формирования спорадических пороков конотрункуса в последующем поколении.

Цель Изучение роли женской аутосыворотки крови в ограничении аллогенных взаимодействий в краткосрочной культуре лимфоцитов супругов, имеющих детей с пороками конотрункуса.

Материалы и методы Для выполнения поставленной цели обследована 21 семейная пара (основная группа), имеющая детей с пороками конотрункуса (тетрада Фалло) без хромосомных заболеваний. Контрольную группу составила 21 семья, имеющая трех и более здоровых детей. Иммунный ответ в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ) супругов оценивали 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.

Результаты Проведена оценка эффекта женской аутосыворотки на СКЛ супругов. Результаты исследования показали, что рождение детей с пороками конотрункуса ассоциировано с блокирующим эффектом женской аутосыворотки в отношении экспрессии HLA-DR на субпопуляции женских лимфоцитов (CD3⁺, HLA-DR⁺) и активирующим эффектом на эти реакции в отношении субпопуляции женских лимфоцитов (CD3⁻, HLA-DR⁺). Эти эффекты женской аутосыворотки в опытной группе могут быть связаны с отсутствием блокирующих HLA-DR аутоантител и высоким синтезом цитокинов T2- и T3-хелперными лимфоцитами.

Заключение В краткосрочной СКЛ отражаются эффекты женской аутосыворотки крови на аллогенные взаимодействия лимфоцитов супругов. Исследование коэффициента прироста и блокирующего коэффициента позволит выявлять нарушения в гуморальной регуляции иммунных взаимодействий матери и полуаллогенного по HLA эмбриона/плода, как фактора риска формирования спорадических пороков конотрункуса в последующем поколении.

Ключевые слова Смешанная культура лимфоцитов • Блокирующие антитела • Пороки конотрункуса • HLA-DR

Поступила в редакцию: 16.04.19; поступила после доработки: 14.05.19; принята к печати: 29.05.19

Для корреспонденции: Шабалдин Андрей Владимирович, e-mail: weit2007@ya.ru; адрес: 650002, Россия, г. Кемерово, Сосновский бульвар, 6

Corresponding author: Shabaldin Andrey V., e-mail: weit2007@ya.ru; address: Russian Federation, 650002, Kemerovo, 6, Sosnoviy Blvd.

EFFECTS OF FEMALE BLOOD AUTOSERUM ON ALLOGENIC INTERACTIONS IN SHORT-TERM LYMPHOCYTE CULTURES OF PARENTS HAVING CHILDREN WITH CONOTRUNCAL HEART MALFORMATIONS

S.V. Gorshkova¹, S.A. Shmulevich³, A.V. Shabaldin^{1,2}✉, N.S. Deeva¹, A.V. Tsepokina¹, E.B. Lukoyanycheva⁴, G.B. Vavin⁴, L.V. Antonova¹, E.B. Shabaldina²

¹Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, 6, Sosnoviy Blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002; ²Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Kemerovo State Medical University” of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 22a, Voroshilova St., Kemerovo, Russian Federation, 650029; ³State Budgetary Healthcare Institution of the Kemerovo Region “Kemerovo Regional Clinical Cardiology Dispensary n.a. Academician L.S. Barbarash”, 6, Sosnoviy Blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002; ⁴Autonomous Public Healthcare Institution “Kemerovo Regional Clinical Hospital n. a. S.V. Belyaeva”, 22, Oktyabrskiy Av., Kemerovo, Russian Federation, 650066

Highlights

- The findings of this original study ensure the detection of violations in the humoral regulation of the maternal immune interactions with semiallogeneic fetus, considered as a risk factor for developing sporadic conotruncal heart malformations in the next generation.

Aim	To study the role of female autoserum blood in limiting allogeneic interactions in short-term lymphocyte cultures of parents having children with conotruncal heart malformations.
Methods	21 married couples (the study group) with children suffering from conotruncal heart malformations (Tetralogy of Fallot) without chromosomal diseases were examined. The control group consisted of 21 families with three or more healthy children. The immune response in a mixed lymphocyte culture of parents was assessed by the increase in HLA-DR expression in the mixed culture with respect to spontaneous lymphocyte cultures. Primary staining of female and male lymphocytes with monoclonal antibodies to CD45, conjugated with various fluorescent dyes (PC-5 and PC-7), allowed assessing the immune response of female lymphocytes to male and vice versa.
Results	The effects of female autoserum on the mixed lymphocyte culture of parents were assessed. The obtained results reported that the birth of children with conotruncal heart malformations is associated with the interfering effect of female autoserum on HLA-DR expression on subpopulations of female lymphocytes (CD3 ⁺ , HLA-DR ⁺) and the activating effect on subpopulations of female lymphocytes (CD3 ⁻ , HLA-DR ⁺). The observed role of female autoserum in the study group may be associated with the absence of HLA-DR-blocking autoantibodies and high synthesis of cytokines by T2 and T3 helper lymphocytes.
Conclusion	The effects of female autoserum on allogeneic lymphocyte interactions of parents may be observed in short-term mixed lymphocyte cultures. The evaluation of the activating and interfering effects ensures timely identification of any violations in the humoral regulation of the maternal immune interactions with the HLA semiallogeneic fetus, considered as a risk factor for developing sporadic conotruncal heart malformations in the next generation.
Keywords	Mixed lymphocyte culture • Blocking antibodies • Conotruncal heart malformations • HLA-DR

Received: 16.04.19; received in revised form: 14.05.19; accepted: 29.05.19

Список сокращений

ВПС – врожденные пороки сердца	ЭКП – эффективный коэффициент прироста
СКЛ – смешанная культура лимфоцитов	ЭКБ – эффективный коэффициент блокирования
КП – коэффициент прироста	ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка
КБ – коэффициент блокирования	SSL – side scatter

Введение

Врожденные пороки сердца (ВПС) занимают лидирующее место среди всех врожденных пороков и аномалий развития плода и новорожденного ребенка. Однако, этиология и патогенез спорадических (не семейных) ВПС остаются не изученными. [1–3].

Известно, что эмбриогенез сердца и связанный с ним тератогенез, максимально представлен на 3–6 неделе эмбрионального периода онтогенеза. За 3–4 недели из утолщенного сосуда с сократительной функцией формируется четырехкамерный сложно-организованный орган с автономной сократительной системой [4]. Влияние различных экзогенных и эндогенных тератогенов в этот временной промежуток приводит к развитию большого количества (более 140 нозологических форм) комбинированных и изолированных ВПС.

В настоящее время для спорадических ВПС рассматривается модель, включающая множественные причины без специфического мутагенного действия. Речь идет о влиянии комплекса повреждающих экзо- и эндогенных факторов в критические периоды развития эмбриогенеза [5]. Эти факторы могут действовать на эмбрион различными способами, в том числе, через активацию материнским микроокружением воспаления в системе «мать-эмбрион/плод». Именно такой механизм формирования ВПС описывают у женщин с диабетом второго типа, где повышенный уровень глюкозы активирует аутовоспаление, трансформирующееся на эмбрион [6]. Кроме того, широко обсуждается вопрос о посттрансляционных модификациях белков, участвующих в регуляции эмбриогенеза сердца [7, 8]. Надо отметить, что именно иммунная система матери поддерживает гомеостаз эмбриона и плода, обеспечивая антитератогенную защиту [9]. Основными молекулами, стимулирующими и ограничивающими иммунный ответ материнского микроокружения к аллоантигенам эмбриона/плода, являются HLA. Таким образом, декомпенсированный иммунный конфликт между матерью и эмбрионом по HLA в этот период может также активировать тератогенез в сердце.

С этих позиций остаются актуальными предположения, высказанные в 80–90-х гг. прошлого столетия В.И. Говалло (1989 г.) о растворимых специфических супрессорных адаптивных факторах, имеющихся у женщин и тормозящих иммунный конфликт в системе «мать-эмбрион/плод». К этим факторам могут относиться ассиметричные антитела, направленные на собственные антигены иммунной презентации – HLA-DR и HLA-DQ [10, 11]. Если принять во внимание, что антиген-презентирующие клетки составляют до 10% пула иммунного микроокружения зародыша [12], то снижение специфической иммунной презентации аллоантигенов плода мужского происхождения будет яв-

ляться существенным фактором в ограничении эффекторных функций. Эти молекулы осуществляют антиген-специфические межклеточные контакты (антиген-презентирующих, Т-хелперных, Т-регуляторных и Т-эффекторных клеток) и обеспечивают вынашивание беременности через прайминг Т-хелперов второго типа [13, 14]. Наличие антител к этим молекулам или особенности цитокиновой регуляции могут быть важным фактором в ограничении иммунного воспаления в системе «мать-эмбрион/плод».

Поиск материнских и отцовских иммунологических критериев, определяющих иммунные нарушения в системе «мать-эмбрион», как факторов индукции иммунного стресса и альтеративного компонента воспаления, является наиболее перспективным, так как дает возможность разработки методов прегравидарной иммунопрофилактики ВПС в последующем поколении.

Исходя из этого, **целью** настоящей работы было изучение роли женской аутосыворотки крови в ограничении аллогенных взаимодействий в краткосрочной культуре лимфоцитов супругов, имеющих детей с пороками конотрункуса.

Материалы и методы

Данное исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИ КПССЗ. У всех родителей до момента включения в исследование было получено информированное согласие на использование биологического материала в научных целях.

На базе НИИ КПССЗ проводился набор группы исследования, а также пробоподготовка для экспериментальной части. Экспериментальная часть выполнена на базе Государственного автономного учреждения здравоохранения Кемеровской области «Кемеровская областная клиническая больница» имени С.В. Беляева.

Для выполнения поставленной цели сформированы две группы семей (основная и контрольная группы). Проведено обследование 21 семейной пары (основная группа), имеющей детей со спорадическими пороками конотрункуса (тетрада Фалло) без хромосомных заболеваний. Контрольную группу составила 21 семья, имеющая трех и более здоровых детей.

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 [15].

Все действия по подготовке краткосрочной смешанной культуры лимфоцитов (СКЛ) 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 (Biolegend, США). Для женских лимфоцитов использовали антитела, конъюгированные с флуоресцентным красителем перидинин-хлорофиллом (PC-7), а для мужских – PC-5 (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) (Gibco (Thermo Fisher Scientific), США) из расчета 15%, L-глутамин (Panreac, Испания) из расчета 2 ммоль, 10 ммоль HEPES-буфера (Sigma, США), $5 \cdot 10^{-5}$ моль 2-меркаптоэтанола (Biochem, Франция) и 50 мкг/мл раствора гентамицина-сульфата (Ветинтерфарм, Россия). В отдельные пробирки переносили 500 мкл клеточной взвеси в полной ростовой среде, куда добавляли женскую аутосыворотку из расчета 10%. Таким образом, получали по две пробирки с женскими и мужскими лимфоцитами: лимфоциты первой пробирки содержали в полной ростовой среде, а лимфоциты второй пробирки – с добавлением 10% женской аутосыворотки. Далее в шесть пластиковых пробирок для проточной цитофлуориметрии (Beckman Coulter, США) вносили лимфоциты (в концентрации 2000 клеток в 1 мкл) как в полной среде, так и с добавлением 10% аутосыворотки в объеме 200 мкл. Первую пробирку использовали для СКЛ, поэтому в ней смешивали лимфоциты мужчины и женщины в общем объеме по 100 мкл (конечный объем 200 мкл). Во вторую пробирку вносили лимфоциты (200 мкл) женщины, и это была монокультура лимфоцитов женщин. В третью пробирку вносили лимфоциты (200 мкл) мужчины (супруга), и эта – монокультура лимфоцитов мужчины. Аналогичную процедуру проводили для лимфоцитов с добавлением 10% аутосыворотки. Далее, закрытые пробирки помещали в CO₂ инкубатор на 2 часа при 37 °С. После окончания инкубации проводили однократную отмывку лимфоцитов каждой пробирки. На последнем этапе выполняли окрашивание лимфоцитов (смешанной культуры и отдельных монокультур) с помощью конъюгатов флуоресцентных красителей (флуорисцеин изотиоцианат – FITC и фикоэритрин – PE) с моноклональными антителами к CD3 (Biolegend, США) и HLA-DR (Biolegend, США) соответственно, добавляли их в каждую пробирку по 5 мкл. Соотношение объема антител к количеству лимфоцитов, время и температура инкубаций соответствовали прилагаемым инструкциям к каждому конъюгированному моноклональному антителу. Инкубирование про-

водились 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 СКЛ супругов проводили на проточном цитофлуориметре Cytomics FC 500 с программным обеспечением CXP (Beckman Coulter, США).

Для снятия результатов был разработан протокол проточной цитофлуориметрии, представленный на Рис. 1–3. 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, меченые CD45-PC7 (против SSL), и мужские, окрашенные CD45-PC5 (против SSL). Далее в двух следующих гистограммах анализировали, соответственно, мужские и женские субпопуляции лимфоцитов CD3⁺, HLA-DR⁺, CD3⁺, HLA-DR⁺ и CD45⁺, HLA-DR⁺. Анализ этих субпопуляций проводили как в СКЛ, 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

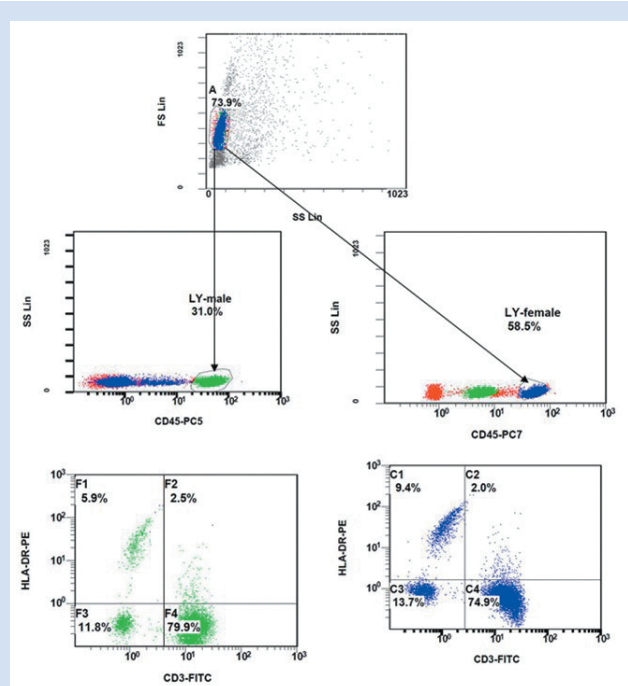


Рисунок 1. Смешанная культура лимфоцитов супругов

Примечание: Все лимфоциты участвующие в СКЛ первично гейтированы по SSL/FSL, далее они разделены на мужские (SSL / CD45-PC5) и женские (SSL / CD45-PC7), в которых проведена оценка субпопуляций CD3⁺ / HLA-DR⁺ и CD3⁺ / HLA-DR⁺.

Figure 1. Mixed lymphocyte cultures of parents

Note: All the lymphocytes in the MLC were primary gated on SSL/FSL, then they were divided into male (SSL / CD45-PC5 and female (SSL / CD45-PC7) lymphocytes with the further assessment of the CD3⁺ / HLA-DR⁺ and CD3⁺ / HLA-DR⁺ subpopulations.

монокультуре:

$$КП_{CD3^+HLA-DR^+} = ((CD3^+HLA-DR^+_{скл} - CD3^+HLA-DR^+_{кон}) \times 100) / CD3^+HLA-DR^+_{кон}, \text{ где:}$$

$CD3^+HLA-DR^+_{скл}$ – относительное число субпопуляции $CD3^+HLA-DR^+$ в СКЛ, %; $CD3^+HLA-DR^+_{кон}$ – относительное число субпопуляции $CD3^+HLA-DR^+$ в монокультуре анализируемого донора, %;

$$КП_{CD3^+HLA-DR^+} = ((CD3^+HLA-DR^+_{скл} - CD3^+HLA-DR^+_{кон}) \times 100) / CD3^+HLA-DR^+_{кон}, \text{ где:}$$

$CD3^+HLA-DR^+_{скл}$ – относительное число субпопуляции $CD3^+HLA-DR^+$ в СКЛ, %; $CD3^+HLA-DR^+_{кон}$ – относительное число субпопуляции $CD3^+HLA-DR^+$ в монокультуре анализируемого донора, %;

$$КП_{CD45^+HLA-DR^+} = ((CD45^+HLA-DR^+_{скл} - CD45^+HLA-DR^+_{кон}) \times 100) / CD45^+HLA-DR^+_{кон}, \text{ где:}$$

$CD45^+HLA-DR^+_{скл}$ – относительное число субпопуляции $CD45^+HLA-DR^+$ в СКЛ, %; $CD45^+HLA-DR^+_{кон}$ – относительное число субпопуляции $CD45^+HLA-DR^+$ в монокультуре анализируемого донора, %.

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 [16]. 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 аутосыворотки 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 аутосыворотки. Общая формула:

$$КБ = ((КП_{скла} - КП_{склэ}) \times 100) / |КП_{склэ}|, \text{ где}$$

$КП_{скла}$ – коэффициент прироста в СКЛ с 10% женской аутосывороткой,

$КП_{склэ}$ – коэффициент прироста в СКЛ в полной ростовой среде с ЭТС,

$|КП_{склэ}|$ – модуль коэффициента прироста в СКЛ в полной ростовой среде с ЭТС.

Отрицательное значение показателя КБ демонстрировало блокирующий эффект женской аутосыворотки 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

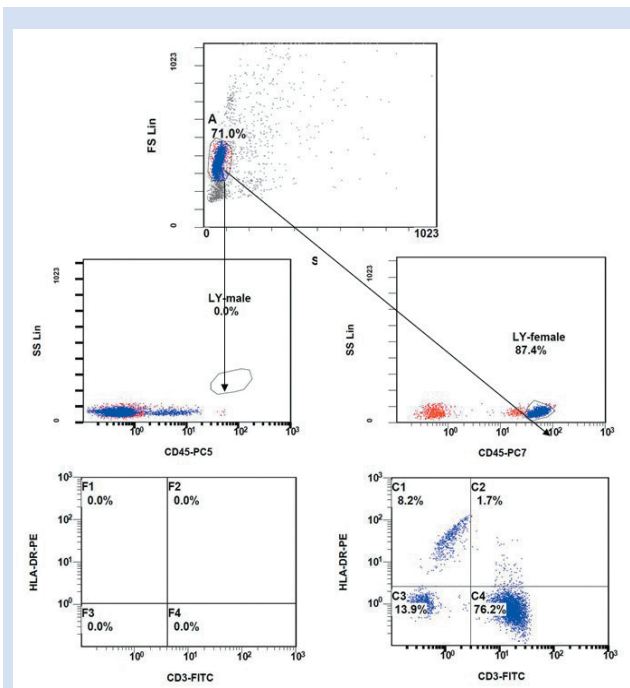


Рисунок 2. Спонтанная культура лимфоцитов женщины
Примечание: Все лимфоциты первично гетированы по SSL / FSL, далее они разделены по тому же протоколу, что и СКЛ на мужские (SSL / CD45-PC5 и женские (SSL / CD45-PC7). В спонтанной культуре нет мужских лимфоцитов и проведена оценка субпопуляций женских $CD3^+ / HLA-DR^+$ и $CD3^- / HLA-DR^+$.

Figure 2. Female spontaneous lymphocyte cultures
Note: All lymphocytes were primarily gated on SSL / FSL, then they were divided into male (SSL / CD45-PC5 and female (SSL / CD45-PC7) lymphocytes according to the same protocol. There were no male lymphocytes in the spontaneous lymphocyte culture. Therefore, female $CD3^+ / HLA-DR^+$ and $CD3^- / HLA-DR^+$ subpopulations were assessed.

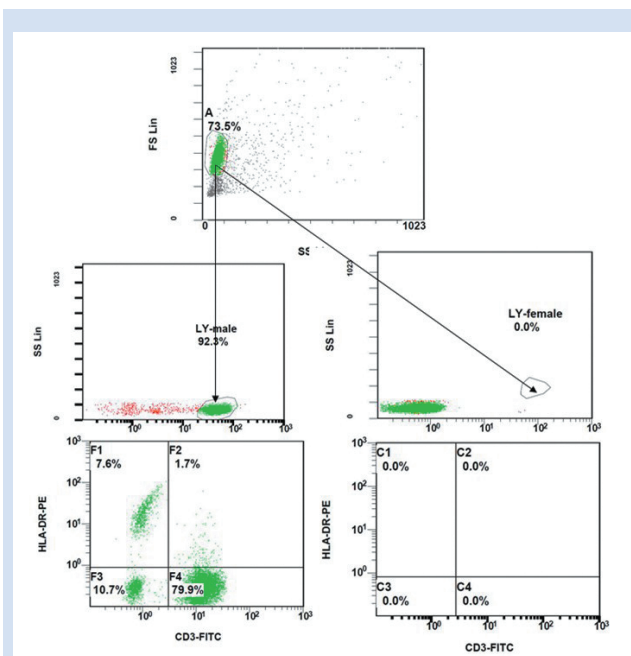


Рисунок 3. Спонтанная культура лимфоцитов мужчины
Примечание: Все лимфоциты первично гетированы по SSL / FSL, далее они разделены по тому же протоколу, что и СКЛ на мужские (SSL / CD45-PC5 и женские (SSL / CD45-PC7). В спонтанной культуре нет женских лимфоцитов и проведена оценка субпопуляций мужских $CD3^+ / HLA-DR^+$ и $CD3^- / HLA-DR^+$.

Figure 3. Male spontaneous lymphocyte cultures
Note: All lymphocytes were primarily gated on SSL / FSL, then they were divided into male (SSL / CD45-PC5 and female (SSL / CD45-PC7) lymphocytes according to the same protocol. There were no female lymphocytes in the spontaneous lymphocyte culture. Therefore, male $CD3^+ / HLA-DR^+$ and $CD3^- / HLA-DR^+$ subpopulations were assessed.

молекулам HLA, а женские растворимые сывороточные 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:

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

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»,

|\text{КП(Б)м}| – модуль коэффициента прироста или блокирования в клеточных реакциях «мужчина против женщины».

Дизайн проведения СКЛ и выведения коэффициентов представлен на Рис. 4.

Статистическую обработку результатов проводили при помощи пакета программ Statistica 10.0. 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 (P25 и P75). Результаты считали статистически значимыми при значении $p < 0,05$.

Результаты

Проведенное исследование показало, что по иммунным показателям, отражающим взаимодействия

по HLA в системе «мать-эмбрион», группа семей с ВПС отличалась от группы контроля (Табл. 1). В таблице представлены только показатели, по которым получены значимые различия. Полученные данные демонстрируют, что основные значимые различия касались показателей, отражающих влияние женской аутосыворотки на аллогенные реакции женских лимфоцитов.

В частности, при добавлении женской аутосыворотки в СКЛ супругов, КП экспрессии HLA-DR

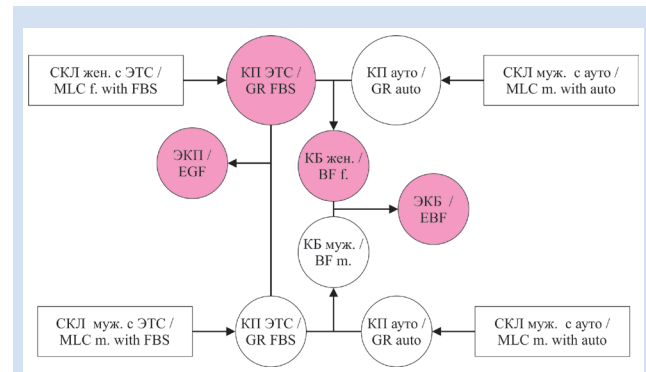


Рисунок 4. Дизайн смешанной культуры лимфоцитов супругов

Примечание: Цветом выделены конечные коэффициенты; муж. – мужской, жен. – женский, ауто – женская аутосыворотка крови, КП – коэффициент прироста, КБ – коэффициент блокирования, ЭКП – эффективный коэффициент прироста, ЭКБ – эффективный коэффициент блокирования, ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка, СКЛ женская – аллогенный ответ женских лимфоцитов на мужские в смешанной культуре лимфоцитов супругов, СКЛ мужская – аллогенный ответ мужских лимфоцитов на женские в смешанной культуре лимфоцитов супругов.

Figure 4. Design of mixed lymphocyte culture of parents
Note: Final ratios are highlighted in colors; f – female, m – male, auto – female blood autoserum, GR – growth rate, BF – blocking factor, EBF – effective blocking factor, EGF – effective growth rate, FBS – Fetal Bovine Serum, MLC f – allogeneic response of female lymphocytes to male in a mixed lymphocyte culture of parents, MLC m – allogeneic response of male lymphocytes to female in a mixed lymphocyte culture of parents.

Таблица 1. Аллоиммунные взаимодействия лимфоцитов супругов по HLA в основной и контрольной группах
Table 1. Alloimmune interactions of parental lymphocytes with HLA in the study and control groups

Аналиты / Analytes	Контрольная группа / Control group			Пороки конотрункуса / conotruncal heart malformations			P
	Me	LQ	UQ	Me	LQ	UQ	
КП СКЛ ауто HLA-DR ⁺ , CD3 ⁺ / GR MLC auto HLA-DR ⁺ , CD3 ⁺	28,41	15,43	41,38	-50,75	-63,32	-38,18	0,008
КП СКЛ ауто HLA-DR ⁺ , CD3 ⁻ / GR MLC auto HLA-DR ⁺ , CD3 ⁻	24,45	-10,97	59,87	359,34	254,77	463,92	-0,002
КБ СКЛ HLA-DR ⁺ , CD3 ⁺ / BF MLC HLA-DR ⁺ , CD3 ⁺	644,52	-66,84	1355,89	-1049,52	-1809,82	-289,21	0,0008
КБ СКЛ HLA-DR ⁺ , CD3 ⁻ / BF MLC HLA-DR ⁺ , CD3 ⁻	-406,63	-985,21	193,95	14361,35	5992,95	22729,75	-0,0001
КБ СКЛ HLA-DR ⁺ / BF MLC HLA-DR ⁺	38,69	-22,64	100,01	6562,22	-1663,77	14788,21	-0,0003
ЭКП ауто HLA-DR ⁺ , CD3 ⁺ / EGR auto HLA-DR ⁺ , CD3 ⁺	70,74	20,76	120,72	-106,00	-490,67	278,67	0,02
ЭКБ HLA-DR ⁺ , CD3 ⁺ / EBF HLA-DR ⁺ , CD3 ⁺	54,06	-13,80	121,92	-747,69	-1317,14	-178,24	-0,002

Примечание: ауто – женская аутосыворотка, СКЛ – смешанная культура лимфоцитов, КП – коэффициент прироста, КБ – коэффициент блокирования, ЭКП – эффективный коэффициент прироста, ЭКБ – эффективный коэффициент блокирования, Me – медиана, LQ – 25-й квартиль, UQ – 75-й квартиль.

Note: auto – female autoserum, MLC – mixed lymphocyte culture, GR – growth rate, BF – blocking factor, EBF – effective blocking factor, EGF – effective growth rate, Me – median, LQ – 25th quartile, UQ – 75th quartile.

на активированных Т-лимфоцитах ($CD3^+$, HLA-DR⁺) был положительным в контрольной группе и отрицательным в основной группе. По этому показателю группы значимо различались ($p = 0,008$).

Достоверные различия достигнуты и для КП экспрессии HLA-DR на субпопуляции лимфоцитов ($CD3^+$, HLA-DR⁺) в СКЛ с добавлением женской аутосыыворотки. В сравниваемых группах данный показатель положительный, но в основной группе, имеющих детей с конотрукальными пороками, данный КП выше, чем в группе контроля ($p = 0,002$).

Как уже отмечено, КП отражает изменения экспрессии HLA-DR на женских или мужских лимфоцитах в смешанной культуре по отношению к спонтанным женским или мужским культурам, соответственно. Если принять во внимание тот факт, что в СКЛ с ЭТС КП экспрессии HLA-DR на различных субпопуляциях лимфоцитов не отличались между группами, то вполне обосновано предположение о значимости факторов женской аутосыыворотки на аллогенные по HLA клеточные иммунные реакции.

Подтверждением этого предположения являются статистически значимые различия в блокирующем эффекте женской аутосыыворотки на аллогенные по HLA клеточные реакции женских лимфоцитов в СКЛ супругов. Показано, что эффект женской аутосыыворотки в отношении клеточных аллогенных по HLA реакций женских активированных Т-лимфоцитов ($CD3^+$, HLA-DR⁺) в СКЛ супругов, имеющих детей с пороками конотрункуса, был с выраженным блокирующим эффектом (КБ – отрицательный), в то время как в контрольной группе он был стимулирующим (КБ – положительный). По этому показателю между группами получено достоверное различие ($p = 0,0008$). В отношении субпопуляции лимфоцитов ($CD3^+$, HLA-DR⁺) эффект женской аутосыыворотки в сравниваемых группах прямо противоположный. Так, СКЛ супругов, имеющих детей с пороками конотрункуса, женская аутосыыворотка активировала, а в контрольной группе – блокировала. Различия между группами статистически значимы ($p = 0,0001$). В целом для всех женских лимфоцитов, экспрессирующих HLA-DR, активирующий эффект (КБ – положительный) женской аутосыыворотки выше в основной группе по отношению к контрольной ($p = 0,0003$). Выраженная активация женскими сыывороточными факторами Т- и В-лимфоцитов материнского иммунного микроокружения эмбриона может быть основой для усиления альтерирующего компонента воспаления в системе «мать-эмбрион» с последующей индукцией тератогенеза в формирующейся сердечно-сосудистой системе эмбриона/плода.

Роль факторов женской аутосыыворотки проявилась и при оценке ЭКП и ЭКБ. Как указывалось, выше, эти коэффициенты рассчитывались с учетом соответствующих КП и КБ в СКЛ «мужчина

против женщины». Принимался во внимание тот факт, что мужские лимфоциты не имеют сенсibilизации к женским HLA и поэтому данные клеточные реакции могут выступать в качестве контрольных. Было выявлено значимое различие по ЭКП экспрессии HLA-DR на активированных женских Т-лимфоцитах ($CD3^+$, HLA-DR⁺) по отношению к мужским в СКЛ супругов с добавлением женской аутосыыворотки. Так в группе семей, имеющих детей с пороками конотрункуса, этот показатель отрицательный, а в группе контроля (имеющих здоровых детей) – положительный ($p = 0,02$). Этот ЭКП был сопоставим с соответствующим женским КП для этой субпопуляции лимфоцитов. Принимая во внимание отсутствие различий по другим ЭКП, в том числе рассчитанных для клеточных реакций в СКЛ с ЭТС, вновь высказывается предположение о роли сыывороточных факторов в моделировании клеточных аллогенных по HLA реакций в системе «мать-эмбрион/плод», приводящих к индукции формирования пороков конотрункуса у эмбриона.

По ЭКБ получено единственное достоверное различие между сравниваемыми группами в отношении женских активированных Т-лимфоцитов. Блокирующий эффект женской аутосыыворотки в отношении клеточных аллогенных по HLA реакций женских активированных Т-лимфоцитов ($CD3^+$, HLA-DR⁺) был выраженный (с учетом блокирования ответа мужских активированных Т-лимфоцитов в отношении женских) в группе семей, имеющих детей с пороками конотрункуса (ЭКБ – отрицательный). В группе контроля этот ЭКБ был положительный, между группами достигнуто достоверное различие ($p = 0,002$).

С целью выявления иммунологических родительских предикторов риска формирования пороков конотрункуса в последующем поколении провели регрессионный анализ, где зависимой переменной было наличие (1 балл) или отсутствие (0 баллов) порока конотрункуса у детей. Данные представлены в Табл. 2.

В Табл. 2 представлены только статистически значимые Бета-коэффициенты (отражают относительное влияние предиктора на зависимую переменную.) и Б-коэффициенты (отражают прогнозическую значимость предиктора).

КП экспрессии HLA-DR на женских активированных Т-лимфоцитах ($CD3^+$, DR⁺) в СКЛ с ЭТС имел положительную ассоциацию с риском формирования порока конотрункуса. То есть, чем выше экспрессия HLA-DR на женских активированных Т-лимфоцитах в СКЛ с ростовыми факторами и без добавления женской аутосыыворотки, тем выше риск формирования порока конотрункуса в последующем поколении.

Напротив, КП экспрессии HLA-DR на женских активированных Т-лимфоцитах ($CD3^+$, DR⁺) в СКЛ

с добавлением женской аутосыворотки имел отрицательную ассоциацию с риском формирования порока конотрункуса в последующем поколении.

Кроме того, КБ экспрессии HLA-DR на женских активированных Т-лимфоцитах (CD3+, DR+) в СКЛ и ЭКБ экспрессии HLA-DR на женских активированных Т-лимфоцитах (CD3+, DR+) в СКЛ отрицательно ассоциированы с риском формирования пороков конотрункуса в последующем поколении. Эти данные свидетельствуют о том, что чем сильнее подавляется экспрессия HLA-DR на женских активированных Т-лимфоцитах (CD3+, DR+) гуморальными факторами женской аутосыворотки, тем выше риск формирования порока в эмбриональном периоде.

Полученные результаты указывают на дисбаланс женских клеточных и гуморальных факторов регуляции иммунных взаимодействий в системе «мать-эмбрион/плод» в патогенезе формирования ВПС, в частности, пороков конотрункуса.

Обсуждение

Регуляция иммунных взаимодействий в системе «мать-эмбрион/плод» является важным звеном в ограничении локального воспаления и предотвращении формирования эмбриопатий, к которым можно отнести и конотрункальные пороки.

Основным регуляторными молекулами, участвующими в торможении этих патологических процессов на ранних этапах эмбриогенеза, могут быть как интерлейкины, так и антитела.

В литературных данных показано, что вынашивание беременности на ранних сроках связано с локальным маточным синтезом противовоспалительных цитокинов, таких как интерлейкина (IL-) 4, IL-10 и трансформирующего фактора роста бета (TGF- β) [17–19]. Эти цитокины связаны с аутокринной регуляцией с особой субпопуляцией маточных Т-регуляторных лимфоцитов, которые непосредственно участвуют в торможении иммунного вос-

паления на ранних этапах беременности [20]. Доказана высокая экспрессия рецептора к прогестерону на мембране этих лимфоцитов, имеющая огромное значение в их активации при наступлении беременности и её вынашивании в первый триместр [20]. Одна из важных функций этих клеток связана, с одной стороны, с активацией со способностью распознавать эмбриональные HLA, экспрессируемые на полуаллогенном зародыше и эмбрионе, а, с другой стороны, с супрессорным эффектом по отношению Т-цитотоксических лимфоцитов [21].

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 продемонстрирован эффект женской аутосыворотки на субпопуляции лимфоцитов. Если принять во внимание, что формирование спорадических ВПС без хромосомных заболеваний связано с нарушенными иммунными взаимодействиями в системе «мать-эмбрион» [22], так как эмбриогенез сердца приходится на 3–7 неделю гестации, и в этот период сохраняется контакт материнского иммунного микроокружения с тканями эмбриона, а выраженность аллогенных иммунных реакций может индуцировать дисэмбриогенез, то нарушение в синтезе цитокинов могут определять это состояние. В первый триместр беременности в системном и локальном иммунитете доминируют медиаторные маркеры Т2 и Т3-хелперного иммунного ответа (IL-4, IL-3, IL-8, IL-10, IL-13, IL-14, TGF- β), что позволяет ограничить иммунный конфликт в системе «мать-эмбрион» [23]. IL-10 подавляет экспрессию HLA-DR на всех субпопуляциях лимфоцитов, в том числе, и на Т-лимфоцитах. Супрессорной функцией обладает и TGF- β [13]. Стимулировать экспрессию HLA-DR на В-лимфоцитах за счет аутокринного эффекта может IL-3 [13, 24]. Тем самым, в отношении экспрессии HLA-DR на активированных

Таблица 2. Множественный линейный регрессионный анализ иммунных предикторов риска формирования врожденных пороков конотрункуса

Table 2. Multiple linear regression of immune risk predictors for developing congenital conotruncal heart malformations

Регрессия ВПС/контроль / Regression CHD/control	Бета- коэффициент / Beta-coefficient	Стандартная ошибка бета- коэффициента / Standard error Beta-coefficient	Б-коэффициент / B-coefficient	Стандартная ошибка Б-коэффициента / Standard error B-coefficient	p
КП СКЛ ЭТС HLA-DR+,CD3+ / GR MLC FBS HLA-DR+,CD3+	0,79828	0,24716	0,00648	0,00201	0,0028
КП СКЛ ауто HLA-DR+,CD3+ / GR MLC auto HLA-DR+,CD3+	-0,72841	0,21795	-0,00609	0,00182	0,0021
КБ СКЛ HLA-DR+,CD3+ / BF MLC HLA-DR+,CD3+	-0,77770	0,38038	-0,00002	0,00001	0,0489
ЭКБ HLA- DR+, CD3+ / EBF HLA-DR+, CD3+	-2,23207	0,93680	-0,00008	0,00003	0,0231

Примечание: ауто – женская аутосыворотка, СКЛ – смешанная культура лимфоцитов, КП – коэффициент прироста, КБ – коэффициент блокирования, ЭКБ – эффективный коэффициент блокирования, ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка; ВПС – врожденный порок сердца.

Note: auto – female autoserum, MLC – mixed lymphocyte culture, GR – growth rate, BF – blocking factor, EBF – effective blocking factor, FBS – Fetal Bovine Serum.

женских Т-лимфоцитах и В-лимфоцитах при их взаимодействии с аллогенными по HLA лимфоцитами супруга возможно оказывает эффект и цитокины женской аутоыворотки. Рассматривая КБ женской аутоыворотки на женские субпопуляции лимфоцитов в СКЛ, можно сделать вывод о чрезмерной экспрессии и синтеза всех выше описанных цитокинов первого триместра беременности, в частности IL-10, TGF- β и IL-3. Эта гиперсекреция усиливает иммунный конфликт в системе «мать-эмбрион» и способствует формированию воспалительной эмбриопатии с поражением сердца и сосудов.

Другой часто обсуждаемый вопрос в сфере иммунологии репродукции, связан с ролью женских аутоантител к HLA, ограничивающих иммунный конфликт и локальное воспаление в системе «мать-эмбрион» [11]. Определение в настоящем исследовании КБ женской аутоывороткой иммунных реакций в СКЛ предполагает, что в сыворотке крови женщин имеются ассиметричные аутоантитела против HLA-DR, ограничивающие межклеточные кооперации иммунокомпетентных клеток при формировании иммунного ответа на аллоантигены зародыша/эмбриона/плода. Проведенное исследование показало, что в контрольной группе в женской сыворотке отсутствуют факторы, блокирующие аллогенные по HLA-DR иммунные реакции женских активированных Т-лимфоцитов в СКЛ супругов. В то время как в отношении В-лимфоцитов этот эффект присутствует. Не исключено, что подавление экспрессии HLA-DR на В-лимфоцитах женской аутоывороткой обусловлено наличием в ней аутоиммунных антител к собственным HLA-DR. Положительный эффект в контрольной группе женской аутоыворотки в отношении экспрессии HLA-DR на женских активированных Т-лимфоцитах предположительно связан с преимущественным праймингом Т2 и Т3 – хелперных лимфоцитов и секретируемых ими интерлейкинов. Вполне вероятно, что женские активированные Т-лимфоциты в контрольной группе являются Т3-хелперами (T-reg), а их активация связана с регуляторным действием Т2-хелперных лимфоцитов, посредством синтеза ими IL-3, IL-4, IL-13. Рассматривая эту ситуацию в отношении опытной группы, можно предположить, что у женщин, родивших детей с пороками конотрункуса, нет ассиметричных антител к ауто HLA-DR, но есть выраженный синтез цитокинов как Т2, так и Т3 – хелперными лимфоцитами. IL-10 и TGF- β аутокринно угнетают Т3 – хелперные лимфоциты, а IL-13, IL-4, IL-14 и IL-3 аутокринно чрезмерно активируют Т-2-хелперные лимфоциты и через них В-лимфо-

циты. Одним из клинических эффектов этой стимуляции будет нарастание гуморальных факторов, вмешивающихся в эмбриогенез сердца и нарушающих его. Соответственно, отсутствие блокирующего эффекта и, напротив, присутствие активирующего действия гуморальных сывороточных женских факторов на женские В-лимфоциты стало важным интегральным значением для диагностики иммунных причин риска формирования спорадических пороков конотрункуса в эмбриональном периоде [25, 26].

Таким образом, в краткосрочной СКЛ отражаются гуморальные регуляторные эффекты, индуцированные аллогенным взаимодействием лимфоцитов супругов. Исследование КП и КБ позволит выявлять нарушения в гуморальной регуляции иммунных взаимодействий матери и полуаллогенного по HLA эмбриона/плода как фактора риска формирования спорадических пороков конотрункуса в последующем поколении.

Заключение

Формирование пороков конотрункуса ассоциировано с высокой активностью женской аутоыворотки в отношении аллогенного по HLA ответа женских лимфоцитов на лимфоциты супруга.

Активирующий эффект женской аутоыворотки в отношении аллогенного по HLA ответа женских лимфоцитов на лимфоциты супруга является ведущим значимым прогностическим фактором риска формирования пороков конотрункуса в последующем поколении.

Конфликт интересов

С.В. Горшкова заявляет об отсутствии конфликта интересов. С.А. Шмулевич заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.В. Шабалдин заявляет об отсутствии конфликта интересов. Н.С. Деева заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.В. Цепкина заявляет об отсутствии конфликта интересов. Е.Б. Лукоянычева заявляет об отсутствии конфликта интересов. Г.В. Вавин заявляет об отсутствии конфликта интересов. Л.В. Антонова заявляет об отсутствии конфликта интересов. Е.В. Шабалдина заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование

Работа выполнена при поддержке гранта УМНИК 2019 «Разработка программы прегравидарного иммунологического прогнозирования риска формирования спорадических врожденных пороков сердца без хромосомных заболеваний в последующем поколении».

Информация об авторах

Горшкова Софья Викторовна, лаборант-исследователь лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной и клинической кардиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-

Author Information Form

Gorshkova Sofya V., laboratory assistant at the Laboratory of Cell Technologies, Department of Experimental and Clinical Cardiology, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”,

исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0003-2922-3438

Шмелевич Светлана Александровна, кандидат медицинских наук, заведующая отделением детской кардиологии Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Кемеровской области «Кемеровский областной клинический кардиологический диспансер имени академика Л.С. Барбараша», Кемерово, Российская Федерация;

Шабалдин Андрей Владимирович, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной и клинической кардиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»; профессор кафедры микробиологии, иммунологии и вирусологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства образования Российской Федерации, Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-8785-7896

Деева Надежда Сергеевна, лаборант-исследователь лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной и клинической кардиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-6162-4808

Цепоккина Анна Викторовна, младший научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной и клинической кардиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-4467-8732

Лукоянычева Елена Борисовна, заведующая иммунологической лабораторией Государственного автономного учреждения здравоохранения Кемеровской области «Кемеровская областная клиническая больница им. С.В. Беляева», Кемерово, Российская Федерация;

Вавин Григорий Валерьевич, кандидат медицинских наук, заместитель главного врача по клинико-диагностической службе Государственного автономного учреждения здравоохранения Кемеровской области «Кемеровская областная клиническая больница им. С.В. Беляева», Кемерово, Российская Федерация;

Антонова Лариса Валерьевна, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией клеточных технологий отдела экспериментальной и клинической кардиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-8874-0788

Шабалдина Елена Викторовна, доктор медицинских наук, заведующая кафедрой оториноларингологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства образования Российской Федерации, Кемерово, Российская Федерация. **ORCID** 0000-0002-0450-2767

Кемерово, Russian Federation; **ORCID** 0000-0003-2922-3438

Shmulevich Svetlana A., PhD, Head of the Pediatric Cardiology Department, State Budgetary Healthcare Institution of the Kemerovo Region “Kemerovo Regional Clinical Cardiology Dispensary n.a. Academician L.S. Barbarash”, Kemerovo, Russian Federation;

Shabaldin Andrey V., PhD, leading researcher at the Laboratory of Cell Technologies, Department of Experimental and Clinical Cardiology, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; Professor at the Department of Microbiology, Immunology and Virology, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Kemerovo State Medical University” of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-8785-7896

Deeva Nadezhda S., laboratory assistant at the Laboratory of Cell Technologies, Department of Experimental and Clinical Cardiology, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-6162-4808

Tsepokina Anna V., research assistant at the Laboratory of Genomic Medicine, Department of Experimental and Clinical Cardiology, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-4467-8732

Lukoanycheva Elena B., Head of the Immunology Laboratory, Autonomous Public Healthcare Institution “Kemerovo Regional Clinical Hospital n. a. S.V. Belyaeva”, Kemerovo, Russian Federation;

Vavin Grigory V., PhD, Deputy Director Medical, Autonomous Public Healthcare Institution “Kemerovo Regional Clinical Hospital n. a. S.V. Belyaeva”, Kemerovo, Russian Federation;

Antonova Larisa V., PhD, Head of the Laboratory of Cell Technologies, Department of Experimental and Clinical Cardiology, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-8874-0788

Shabaldina Elena V., PhD, Chairperson of the Department of Otorhinolaryngology, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Kemerovo State Medical University” of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Kemerovo, Russian Federation. **ORCID** 0000-0002-0450-2767

Вклад авторов в статью

ГСВ – получение и анализ данных, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание;

Author Contribution Statement

GVS – data collection and analysis, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content;

ШСА – получение данных, внесение корректив в статью, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание;

ШАВ – вклад в дизайн исследования, анализ данных, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание;

ДНС – получение и анализ данных, внесение корректив в статью, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание;

ЦАВ – интерпретация полученных данных, внесение корректив в статью, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание;

ЛЕБ – получение данных, внесение корректив в статью, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание;

ВГВ – получение данных, внесение корректив в статью, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание;

АЛВ – интерпретация полученных данных, внесение корректив в статью, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание;

ШЕВ – получение данных, внесение корректив в статью, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание.

ShSA – data collection, editing, approval of the final version, fully responsible for the content;

ShAV – contribution to the design of the study, data analysis, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content;

DNS – data collection and analysis, editing, approval of the final version, fully responsible for the content;

TsAV – data interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content;

LEB – data collection, editing, approval of the final version, fully responsible for the content;

VGV – data collection, editing, approval of the final version, fully responsible for the content;

ALV – data interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content;

ShEV – data collection, editing, approval of the final version, fully responsible for the content.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бокерия, Л.А., Гудкова Р.Г., Сердечно-сосудистая хирургия-2014. Болезни и врожденные аномалии системы кровообращения. М.: НЦССХ им. А.Н.Бакулева; 2015.
2. Eurocat. Available at: <http://www.eurocat/network.eu>. (accessed 10.02.2016).
3. Шабалдин А.В., Глебова Л.А., Бачина А.В., Счастливец Е.Л., Потапов В.П. Особенности эпидемиологии врожденных пороков сердца у детей г. Кемерово как крупного промышленного центра. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2014;(4):38-46.
4. Garcia-Enguidanos A., Calle M.E., Valero J., Luna S., Domínguez-Rojas V. Risk factors in miscarriage and malformation: a review. European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology. 2002; 102(2): 111-119. doi: [https://doi.org/10.1016/S0301-2115\(01\)00613-3](https://doi.org/10.1016/S0301-2115(01)00613-3)
5. 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; 53 (3-4): 306-321. doi: 10.1093/ilar.53.3-4.306
6. Baack M.L., Wang C., Hu S., Segar J.L., Norris A.W. Hyperglycemia induces embryopathy, even in the absence of systemic maternal diabetes: an in vivo test of the fuel mediated teratogenesis hypothesis. Reprod Toxicol. 2014;46:129–136. doi:10.1016/j.reprotox.2014.03.013.
7. Liddy K.A., White M.Y., Cordwell S.J. Functional decorations: post-translational modifications and heart disease delineated by targeted proteomics Genome Med. 2013; 5(2): 20. DOI: 10.1186/gm424
8. Oyama K., El-Nachef D., Zhang Y., Sdek P. MacLellan W.R. Epigenetic regulation of cardiac myocyte differentiation. Frontiers in Genetics, 2014; 5:375. doi: 10.3389/fgene.2014.00375.
9. Сепиашвили Р. И. Функциональная система иммунного гомеостаза Аллергология и иммунология. 2015; 16(1): 91-100.
10. 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; 62(6): 323-325.
11. 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. Human Reproduction. 1999; 14(3): 650–655;
12. Miranda S., Litwin S., Barrientos G. Dendritic cells therapy confers a protective microenvironment in murine pregnancy. Scand J Immunol. 2006; 64(5): 493-499.
13. Ярилин А. А. Иммунологии: учебник. М: Изд-во «ГЭОТАР-Медиа»; 2010. [Yarilin A. A. Immunologii: uchebnik. Moscow: GEOTAR-Media; 2010. (In Russian.)].
14. 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; 97(1): 104-111. doi: 10.1016/j.jri.2012.12.001;
15. Чистякова Г.Н., Шабалдин А.В., Беленкова О.В., Мозес В.Г., Матвеева В. Г., Шабалдина Е. В., Ремизова И. И., Газиева И. А.; Федеральное государственное бюджетное учреждение "Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества" Министерства здравоохранения Российской Федерации, патентообладатель. Способ определения аллогенного иммунного ответа в кратковременной смешанной культуре лимфоцитов неродственных доноров. Патент РФ 2581925. 20.02.2016.
16. Самбур М.Б. Способ оценки взаимодействия лимфоцитов in vitro, основанный на определении их розеткообразующей способности. Иммунология. 1991; 2: 30-33.
17. Singh M., Orazulike N. C., Ashmore J., Konje J. C. Changes in maternal serum transforming growth factor beta-1 during pregnancy: a cross-sectional study. BioMed research international. 2013;2013:318464 doi: 10.1155/2013/318464.
18. Li Q. Transforming growth factor β signaling in uterine development and function. J Anim Sci Biotechnol. 2014;5(1):52. doi:10.1186/2049-1891-5-52;
19. Chatterjee P., Chiasson V.L., Bounds K.R., Mitchell B.M. Regulation of the Anti-Inflammatory Cytokines Interleukin-4 and Interleukin-10 during Pregnancy. Front Immunol. 2014;5:253. doi:10.3389/fimmu.2014.00253.
20. Ширшев С.В. Гормональные механизмы регуляции иммунной системы в период беременности. Успехи современной биологии. 2005; 6: 555-566.
21. Mjosberg J., Berg G., Jenmalm M.C., Ernerudh J. FOXP3+ regulatory T cells and T helper 1, T helper 2, and T helper 17 cells in human early pregnancy deciduas. Biol Reprod. 2010. 82(4): 698-705. doi: 10.1095/biolreprod.109.081208.

22. Хайтов Р. М., Алексеев Л. П., Кофиади И. А. Роль иммуногенетики в решении фундаментальных и прикладных задач персонализированной медицины. Медицина экстремальных ситуаций. 2016; 3:(57): 9-24.

23. Газиева И.А., Чистякова Г.Н., Ремизова И.И. Роль нарушений продукции цитокинов в генезе плацентарной недостаточности и ранних репродуктивных потерь. Медицинская иммунология. 2014; 16(6): 539-550. doi:10.15789/1563-0625-2014-6-539-550.

24. 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; 69(4): 315-303.

25. 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 теоретической и клинической медицины (Узбекистан). 2014; 3(1): 219-222.

26. Беленкова О.В., Мозес В.Г., Шабалдин А.В., Лисаченко Г.В. Показатели аллогенных взаимодействий лимфоцитов супругов как дополнительные диагностические и прогностические критерии иммунных форм репродуктивных потерь. Саратовский научно-медицинский журнал. 2013; 4(9): 649-652.

REFERENCES

1. Bokeriya, L.A., Gudkova R.G., Serdechno-sosudistaya hirurgiya-2014. Bolezni i vrozhdennye anomalii sistemy krovoobrashcheniya. Moscow: NCSSKH im. A.N.Bakuleva; 2015. (In Russian)

2. Eurocat. Available at: <http://www.eurocat/network.eu>. (accessed 10.02.2016).

3. Shabaldin A.V., Glebova L.A., Bachina A.V., Schastlivcev E.L., Potapov V.P. Features of epidemiology of congenital heart diseases at children Kemerovo, as large industrial centre. Complex Issues of Cardiovascular Diseases. 2014;(4):38-46. (In Russian)

4. Garcia-Enguidanos A., Calle M.E., Valero J., Luna S., Dominguez-Rojas V. Risk factors in miscarriage and malformation: a review. European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology. 2002; 102(2): 111-119. doi: [https://doi.org/10.1016/S0301-2115\(01\)00613-3](https://doi.org/10.1016/S0301-2115(01)00613-3)

5. 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; 53 (3-4): 306-321. doi: 10.1093/ilar.53.3-4.306

6. Baack M.L., Wang C., Hu S., Segar J.L., Norris A.W. Hyperglycemia induces embryopathy, even in the absence of systemic maternal diabetes: an in vivo test of the fuel mediated teratogenesis hypothesis. Reprod Toxicol. 2014;46:129-136. doi:10.1016/j.reprotox.2014.03.013.

7. Liddy K.A., White M.Y., Cordwell S.J. Functional decorations: post-translational modifications and heart disease delineated by targeted proteomics Genome Med. 2013; 5(2): 20. DOI: 10.1186/gm424

8. Oyama K., El-Nachef D., Zhang Y., Sdek P. MacLellan W.R. Epigenetic regulation of cardiac myocyte differentiation. Frontiers in Genetics, 2014; 5:375. doi: 10.3389/fgene.2014.00375.

9. Sepiashvili R. I. Funkcional'naya sistema immunnogo gomeostaza Allergologiya i immunologiya. 2015; 16(1): 91-100. (In Russian)

10. 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; 62(6): 323-325.

11. 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. Human Reproduction. 1999; 14(3): 650-655.

12. Miranda S., Litwin S., Barrientos G. Dendritic cells therapy confers a protective microenvironment in murine pregnancy. Scand J Immunol. 2006; 64(5): 493-499.

13. YArilin A. A. Immunologii: uchebnik. Moscow: GEOTAR-Media; 2010. (In Russian)

14. 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; 97(1): 104-111. doi: 10.1016/j.jri.2012.12.001;

15. CHistyakova G.N., SHabaldin A.V., Belenkova O.V., Mozes V.G., Matveeva V. G., SHabaldina E. V., Remizova I. I., Gazieva I. A. Federal'noe gosudarstvennoe byudzhethoe uchrezhdenie "Ural'skij nauchno-issledovatel'skij institut ohrany materinstva i mladenchestva" Ministerstva zdavoohraneniya Rossijskoj Federacii, patentoobladatel' Sposob opredeleniya allogennogo immunnogo otveta v kratkovremennoj smeshannoj kul'ture limfocitov nerodstvennykh donorov. Patent RF 2581925. 20.02.2016. (In Russian)

16. Sambur M.B. Sposob ocenki vzaimodejstviya limfocitov in vitro, osnovannyj na opredelenii ih rozetkoobrazuyushchej sposobnosti. Immunologiya. 1991; 2: 30-33 (In Russian)

17. Singh M., Orazulike N. C., Ashmore J., Konje J. C. Changes in maternal serum transforming growth factor beta-1 during pregnancy: a cross-sectional study. BioMed research international. 2013;2013:318464 doi: 10.1155/2013/318464.

18. Li Q. Transforming growth factor β signaling in uterine development and function. J Anim Sci Biotechnol. 2014;5(1):52. doi:10.1186/2049-1891-5-52;

19. Chatterjee P., Chiasson V.L., Bounds K.R., Mitchell B.M. Regulation of the Anti-Inflammatory Cytokines Interleukin-4 and Interleukin-10 during Pregnancy. Front Immunol. 2014;5:253. doi:10.3389/fimmu.2014.00253.

20. Shirshov S.V. Gormonal'nye mekhanizmy regulyacii immunnij sistemy v period beremennosti. Uspekhi sovrem. biologii. 2005; 6: 555-566 (In Russian)

21. Mjosberg J., Berg G., Jenmalm M.C., Ernerudh J. FOXP3+ regulatory T cells and T helper 1, T helper 2, and T helper 17 cells in human early pregnancy deciduas. Biol Reprod. 2010. 82(4): 698-705. doi: 10.1095/biolreprod.109.081208.

22. Haitov R. M., Alekseev L. P., Kofiadi I. A. Rol' immunogenetiki v reshenii fundamental'nyh i prikladnyh zadach personalizirovannoj mediciny. Medicina ekstremal'nyh situacij. 2016; 3:(57): 9-24. (In Russian)

23. Gazieva I.A., Chistyakova G.N., Remizova I.I. Role of cytokine production disorders in genesis of placental insufficiency and early reproductive losses. Medical Immunology (Russia). 2014;16(6):539-550. (In Russian) <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2014-6-539-550>

24. 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; 69(4): 315-303;

25. Belenkova O.V., Mozes V.G., SHabaldin A.V., SHabaldina E.V. Harakter allogennyh vzaimodejstvij suprugov v kratkovremennoj smeshannoj kul'ture pri immunnnyh formah reproductivnyh poter'. Zhurnal teoreticheskoy i klinicheskoy mediciny (Uzbekistan). 2014; 3(1): 219-222. (In Russian)

26. Belenkova O.V., Mozes V.G., SHabaldin A.V., Lisachenko G.V. Pokazateli allogennyh vzaimodejstvij limfocitov suprugov kak dopolnitel'nye diagnosticheskie i prognosticheskie kriterii immunnnyh form reproductivnyh poter'. Saratovskij nauchno-meditsinskij zhurnal. 2013; 4(9): 649-652. (In Russian)

Для цитирования: С.В. Горшкова, С.А. Шмелевич, А.В. Шабалдин, Н.С. Дева, А.В. Цепочкина, Е.Б. Лукоянычева, Г.В. Вавин, Л.В. Антонова, Е.В. Шабалдина. Влияние женской аутосыворотки крови на аллогенные взаимодействия в краткосрочной культуре лимфоцитов супругов, имеющих детей с конотрункальными пороками. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2019; 8 (3). DOI: 10.17802/2306-1278-2019-8-3

To cite: S.V. Gorshkova, S.A. Shmulevich, A.V. Shabaldin, N.S. Deeva, A.V. Tsepokina, E.B. Lukoyanycheva, G.B. Vavin, L.V. Antonova, E.B. Shabaldina. Effects of female blood autoserum on allogenic interactions in short-term lymphocyte cultures of parents having children with conotruncal heart malformations. Complex Issues of Cardiovascular Diseases. 2019; 8 (3). DOI: 10.17802/2306-1278-2019-8-3