

На правах рукописи



ЦЕПОКИНА

Анна Викторовна

**РОЛЬ *HLA-DRB1* И *HLA-G* В ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ
К РАЗВИТИЮ ВРОЖДЕННЫХ ПОРОКОВ СЕРДЦА У ДЕТЕЙ**

3.3.3. – Патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Иркутск – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Кемеровский государственный университет»

Научный руководитель

доктор биологических наук, профессор

Литвинова Надежда Алексеевна

Научный консультант

доктор медицинских наук, доцент

Шабалдин Андрей Владимирович

Официальные оппоненты:

Андриевская Ирина Анатольевна – доктор биологических наук, профессор РАН, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания», лаборатория механизмов этиопатогенеза и восстановительных процессов дыхательной системы при неспецифических заболеваниях лёгких, заведующая

Салмина Алла Борисовна – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научный центр неврологии», лаборатория экспериментальной нейрцитологии отдела исследований мозга, главный научный сотрудник и заведующий

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ростовский научно-исследовательский институт акушерства и педиатрии

Защита диссертации состоится «___» _____ 2021 года в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 001.038.02 при ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» по адресу: 664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «НЦ ПЗСРЧ» и на сайте www.health-family.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 20__ г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук



Гребенкина
Людмила Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Врожденные пороки сердца являются одними из наиболее распространенных аномалий развития плода, составляя 30 % от числа всех врожденных пороков развития (Бокерия, 2019). Несмотря на современные достижения в кардиологии и кардиохирургии, врожденные пороки сердца являются частой причиной инвалидизации и смертности в детском возрасте (Саперова, 2017) и включают в себя широкий спектр фенотипов, которые различаются по морфологии, физиологии и другим факторам, что обуславливает необходимость дифференцированного изучения механизмов развития данной патологии (Hoang et al., 2018).

В настоящее время принято считать, что в патогенезе врожденных пороков сердца важную роль играет комплекс взаимовлияющих факторов: генетических, социальных, а также факторов окружающей среды (Liu et al., 2015; Gelb, 2015; Feng, 2015). Хотя за последнее десятилетие значительно увеличилось количество работ, посвященных изучению этиологии врожденных пороков сердца в различных направлениях, патогенез данного заболевания до сих пор остается не до конца изученным и вызывает интерес как для фундаментальных, так и для прикладных исследований.

При изучении патогенеза врожденных пороков сердца особое внимание уделяется состоянию здоровья родителей, особенно женщин, так как на протяжении всей беременности плод находится в непосредственном контакте с материнским организмом. Среди причин возникновения врожденных пороков сердца у детей выделяют: прегестационный и гестационный сахарный диабет матери (Garne et al., 2012; Oyen et al., 2016), курение и употребление алкоголя родителями (Yang et al., 2015; Wen et al., 2016), их социоэкономический статус (Xiang et al., 2018), прием фолиевой кислоты во время беременности (Czeizel et al., 2013), а также любые инфекционные заболевания, протекающие с подъемом температуры тела в первом триместре беременности (Саперова, 2017).

Стоит отметить, что важная роль в зачатии и вынашивании беременности уделяется генам главного комплекса гистосовместимости (HLA у человека). Основной функцией данного комплекса является участие в иммунных реакциях: распознавание чужеродного антигена, представление его иммунокомпетентным клеткам, а также участие в формировании антиген-специфической иммуносупрессии. Установлено, что молекулы главного комплекса гистосовместимости появляются на клетках плода и плаценты в ранние сроки эмбриогенеза. Формирование и вынашивание нормальной беременности рестриктировано распознаванием материнским иммунным микроокружением аллоантигенов HLA, наследуемых от отца, на оплодотворенном яйце и эмбрионе.

Таким образом, малоизученными остаются иммунные и иммуногенетические механизмы, ассоциированные с риском развития врожденных пороков сердца в последующих поколениях. Исходя из вышесказанного, изучение иммунных и иммуногенетических особенностей родителей и их вклад в патогенез врожденных пороков сердца является чрезвычайно важным аспектом, который обладает не только фундаментальной, но и практической значимостью.

Степень разработанности темы

Несмотря на актуальность исследования, количество научных работ, посвященных изучению патогенетических механизмов развития врожденных пороков сердца, на сегодняшний день ограничено (Gerlinskaya et al., 2000; Glushkov, 2003). Врожденные пороки сердца, встречающиеся более чем у 1 % новорожденных детей и определяющие перинатальную и младенческую смертность, могут быть рассмотрены как маркеры нарушения адаптации полуаллогенного зародыша к материнскому микроокружению в раннем онтогенезе, детерминированной комплексом HLA. В то же время лишь единичные исследования были посвящены этой проблеме (Sliwa et al., 2001). Напротив, активные исследования ведутся в области изучения системы HLA и ее ассоциаций с различными заболеваниями, в частности с репродуктивными потерями (Alecsandru et al., 2015).

Таким образом, отсутствие исследований, касаемых роли иммунных и иммуногенетических факторов в патогенезе врожденных пороков сердца, определило цель настоящего исследования.

Цель исследования

Оценить патогенетическую значимость родительских иммуногенетических факторов в предрасположенности к развитию врожденных пороков сердца у детей для оценки индивидуальных рисков формирования данного патологического состояния.

Задачи исследования

1. Оценить вклад генотипов *HLA-G* 3'UTR 14-bp ins/del в патогенез врожденных пороков сердца.
2. Определить родительские аллели *HLA-DRB1* и их комбинации, обладающие патогенетическим и протективным потенциалом в отношении развития врожденных пороков сердца.
3. Установить, вносит ли наследование патогенетических и протективных аллелей *HLA-DRB1* от родителей к их детям вклад в развитие врожденных пороков сердца.
4. Оценить вклад иммунных взаимодействий в системе «мать – плод» (на примере краткосрочной смешанной культуры лимфоцитов супругов) на течение условно здоровой беременности и беременности, приводящей к формированию врожденного порока сердца у плода
5. Оценить предикторный потенциал полученных маркеров для расчета вероятности риска развития врожденных пороков сердца.

Научная новизна исследования

Впервые проанализирован вклад женских генотипов *HLA-G* 3 UTR 14-bp ins/del в патогенез врожденных пороков сердца.

Впервые показано, что родительские патологические и протективные аллели *HLA-DRB1* (мужской *HLA-DRB1**09 и женский *HLA-DRB1**10) и сочетания мужских *HLA-DRB1**11/*HLA-DRB1**15 и *HLA-DRB1**4/*HLA-DRB1**15 аллелей и

женских *HLA-DRB1*08/HLA-DRB1*11* аллелей ассоциированы с развитием врожденных пороков сердца у детей.

В результате проведенного исследования впервые определено, что наличие общих аллелей для супругов является одним из факторов, обуславливающих развитие врожденных пороков сердца.

Впервые описана роль иммунных нарушений в системе «мать-плод», выявленных посредством краткосрочной смешанной культуры лимфоцитов супругов, и их патогенетическая значимость в предрасположенности к развитию врожденных пороков сердца.

Теоретическая и практическая значимость работы

Получены фундаментальные сведения, которые значительно расширяют имеющиеся представления о роли гена *HLA-DRB1* в детерминировании эмбриопатий на примере формирования врожденных пороков сердца в последующем поколении. Результаты исследований раскрывают особенности наследования *HLA-DRB1* в когорте семей, имеющих детей с врожденными пороками сердца; доказывают роль иммунных нарушений по HLA-DR в системе «мать – плод» на развитие данного патологического состояния.

Проведенное исследование позволило разработать «Способ прегравидарного прогнозирования риска формирования септальных форм врожденных пороков сердца у плода», отраженный в патенте Российской Федерации № 2617249 от 24.04.2017, а также «Способ прегравидарного прогнозирования риска формирования спорадических септальных врожденных пороков сердца без хромосомных заболеваний в последующих поколениях», отраженный в патенте Российской Федерации № 2709610 от 19.12.2019. Изданы методические рекомендации «Иммунологический метод прегравидарного прогнозирования риска формирования спорадических врожденных пороков сердца без хромосомных заболеваний», утвержденные начальником ДОЗН Кемеровской области.

Результаты диссертационного исследования, посвященные изучению иммуногенетических факторов риска формирования врожденных пороков сердца,

внедрены в работу Государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Кузбасский клинический кардиологический диспансер имени академика Л. С. Барбараша», а также в работу Областного клинического перинатального центра им. Л. А. Решетовой.

Методология и методы исследования

В соответствии с поставленными задачами были выбраны современные иммунологические и молекулярно-генетические методы исследования, позволяющие полноценно охарактеризовать изучаемую выборку. Материалом для молекулярно-генетического и иммунологических исследований служила кровь из кубитальной вены, взятая в асептических условиях. В работе использовался регистр врожденных пороков сердца Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний».

В работе были использованы следующие методы: выделение ДНК методом фенол-хлороформной экстракции; генотипирование методом ПЦР; определение маркеров HLA-DR, CD3 методом проточной цитофлуориметрии; статистический анализ результатов.

Положения, выносимые на защиту

1. В патогенез врожденных пороков сердца вовлечены женские и мужские аллели, а также их комбинации, обладающие патогенетической и протективной значимостью.
2. Наличие общих аллелей для супругов является одним из факторов, обуславливающих развитие врожденных пороков сердца.
3. Экспрессия молекулы HLA-DR на женских лимфоцитах с фенотипом $CD3^+HLA-DR^+$ является одним из предикторов развития врожденных пороков сердца.

Степень достоверности результатов проведенных исследований

Достоверность результатов исследования, выводы и рекомендации базируются на достаточном объеме выборки, методических и методологических подходах с формулировкой и проверкой рабочей гипотезы, использовании

комплекса современных лабораторных методов исследования (иммунологические и молекулярно-генетические методы), а также адекватных статистических методах обработки результатов, полученных данных.

Апробация материалов диссертации

Материалы диссертационного исследования доложены и обсуждены на: XI Международной Пироговской научной медицинской конференции (Москва, 17.03.2016), XVI ежегодном научно-практическом семинаре молодых ученых «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической кардиологии» (Томск, 01.04.2016), VI научной сессии молодых учёных Кузбасса (Кемерово, 08.06.2016), ESC Congress (Рим, 30.08.2016), сателлитной конференции молодых ученых «Иммунодиагностика, иммунопрофилактика и иммунотерапия иммунозависимых и инфекционных болезней» (Сочи, 04.10.2018), VIII съезде кардиологов Сибирского федерального округа (Кемерово, 10–11.11.2019).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ, из них 5 – в журналах и изданиях, рекомендованных ВАК РФ для публикации материалов докторских и кандидатских диссертаций, из которых 2 – в рецензируемых изданиях, индексируемых в международной базе Scopus; 2 патента на изобретение, а также методические рекомендации «Иммунологический метод прегравидарного прогнозирования риска формирования спорадических врожденных пороков сердца без хромосомных заболеваний», утвержденные начальником ДОЗН Кемеровской области.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 115 страницах машинописного текста и состоит из введения, трех глав, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 9 рисунками и 22 таблицами. Библиографический указатель включает в себя 177 источников (37 отечественных и 140 иностранных).

Личный вклад автора

Автором диссертационного исследования лично сформированы цели и задачи исследования, а также выводы и положения, выносимые на защиту. Весь материал, представленный в диссертации, получен и обработан лично автором.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Экспериментальная часть работы выполнена на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кемеровский государственный университет» при участии лаборатории геномной медицины Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний».

Молекулярно-генетический анализ выполнен 103 женщинам и 59 мужчинам, имеющим детей с ВПС, их детям ($n = 103$), а также 132 семейным парам, имеющим условно здоровых детей. Материалом для исследования послужила геномная ДНК, выделенная из периферической крови методом фенол-хлороформной экстракции. Генотипирование проводили по 13 аллелям гена *HLA-DRB1* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с учетом результатов в режиме реального времени с использованием коммерческих наборов компании «ДНК-технология» в соответствии с протоколом производителя. Амплификацию полиморфных участков гена *HLA-G* 3'UTR 14-bp ins/del проводили методом аллель-специфичной полимеразной цепной реакции в соответствии с протоколом производителя (Applied Biosystems, USA) с дальнейшей электрофоретической детекцией в 3 %-ном агарозном геле.

Иммунологический анализ проведен в образцах крови, полученной от 21 семейной пары, имеющей детей с ВПС, и от 21 семейной пары, имеющей условно здоровых детей. Определение иммунного ответа женских лимфоцитов на мужские лимфоциты проводили методом смешанной культуры лимфоцитов (СКЛ).

Статистический анализ. Статистическую обработку данных проводили при помощи стандартных статистических методов с использованием пакета программ Statistica 10.0. Тип распределения полученных данных определяли при помощи теста Колмогорова – Смирнова и Шапиро – Уилка. Сравнительный анализ двух групп проводили при помощи U-критерия Манна – Уитни. Данные представляли в виде медианы (Me), 25-го и 75-го перцентилей (P25 и P75). Для определения соответствия наблюдаемых частот генотипов гена *HLA-DRB1* равновесному распределению Харди – Вайнберга использовали χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность. Анализ межаллельных взаимодействий проводили при помощи программы MDR v.3.0.2. Различия между группами признавались статистически значимыми при вероятности отвергнуть верную нулевую гипотезу $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Особенности распределения аллелей и генотипов HLA-G 3'UTR 14-bp ins/del у женщин, имеющих детей с врожденными пороками сердца

Проведенные исследования показали, что распределение генотипов *HLA-G* 3'UTR (14-bp del/14-bp del (D/D); 14-bp del/14-bp ins (I/D); 14-bp ins/14-bp ins (I/I)) у женщин основной и контрольной групп не отклонялось от расчетных величин, полученных по уравнению Харди – Вайнберга, отражающего генетическое равновесие в популяции. Сравнение частот аллелей и генотипов в группе женщин, родивших детей с ВПС, и в группе контроля, не выявило значимых различий по пяти моделям наследования (Рисунок 1).

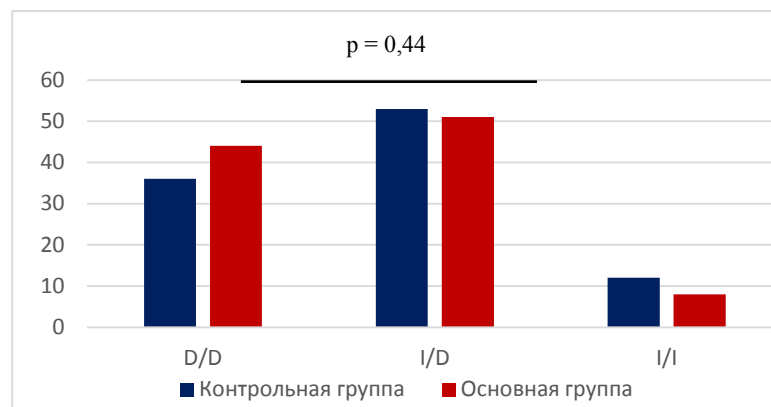


Рисунок 1 – Частоты генотипов *HLA-G* 3'UTR в основной и контрольной группах

Особенности распределения аллелей HLA-DRB1 в семьях, имеющих детей с врожденными пороками сердца

Выявлено, что у женщин, имеющих детей с ВПС, чаще в генотипе встречался аллель *HLA-DRB1*10* ($p = 0,0132$) гена *HLA-DRB1* по сравнению с женщинами контрольной группы. Показано, что величина отношения шансов (ОШ) для аллеля *HLA-DRB1*10* составила 15,35 (ДИ 95 % 1,76–40,47; $p = 0,013$), что говорит о том, что данный женский аллель является рисковым в отношении предрасположенности к развитию ВПС в последующем поколении (Рисунок 2).

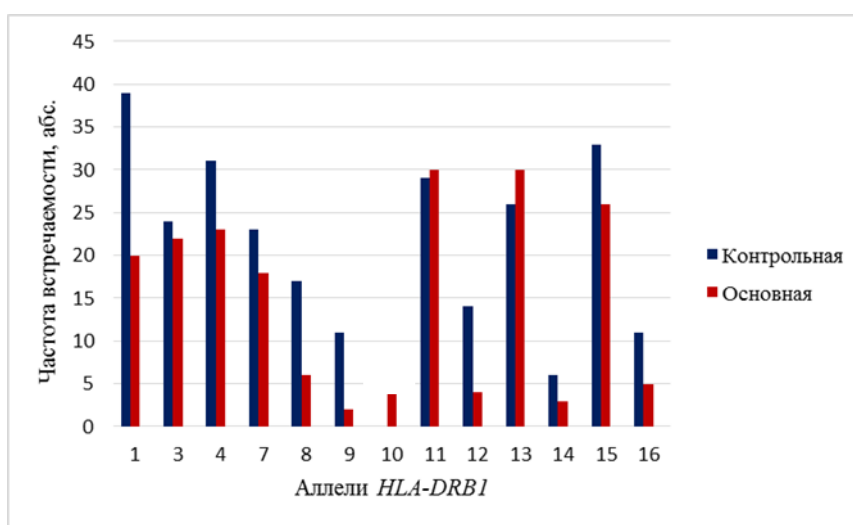


Рисунок 2 – Сравнительная характеристика аллелей гена *HLA-DRB1* в основной и контрольной группах женщин

Анализ сравнения частоты встречаемости аллелей *HLA-DRB1* у мужчин из основной и контрольной групп показал наличие ассоциации с аллелем *HLA-DRB1*09* (Рисунок 3). У мужчин аллель *HLA-DRB1*09* отсутствовал в основной группе, и выявлялся у 11 мужчин в контрольной группе (ОШ = 0,09; ДИ 95 % 0,038 – 0,231; $p = 0,016$), что говорит о его протективном эффекте в отношении развития ВПС.

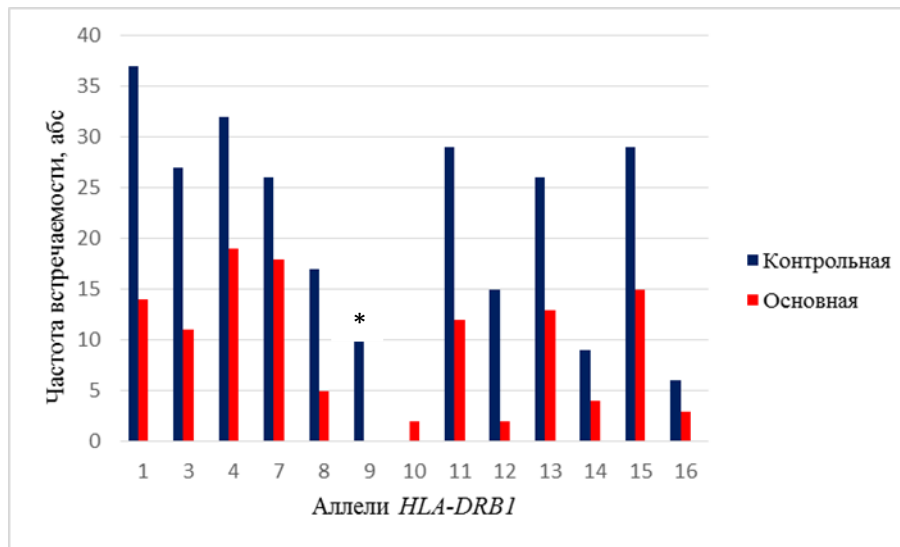


Рисунок 3 – Сравнительная характеристика аллелей гена *HLA-DRB1* в основной и контрольной группах мужчин

Сравнение частот встречаемости общих для супругов аллелей *HLA-DRB1* показало, что частота встречаемости общих аллелей для супругов контрольной группы не превышала 10 %, однако в семьях, имеющих детей с ВПС, частота встречаемости общих аллелей составила 41 % (Таблица 1). Как видно из таблицы 1, в основной группе чаще встречались следующие общие аллели у родителей: *HLA-DRB1*04* (ОШ = 11,52; ДИ 95 % 3,479–38,135; $p = 0,032$), *HLA-DRB1*11* (ОШ = 21,49; ДИ 95 % 6,488–71,112; $p = 0,007$), *HLA-DRB1*13* (ОШ = 5,29; ДИ 95 % 1,596–17,496; $p = 0,009$). Это говорит о том, что вероятность совпадения по *HLA-DRB1* матери и плода в основной группе выше, чем в контроле.

Далее был проведен анализ вклада мужских и женских сочетаний аллелей *HLA-DRB1* в развитие ВПС, а также их взаимодействие при помощи программы MDR 3.0.2. Данный метод позволяет провести одновременный анализ множества аллелей и выбрать только те сочетания, которые имеют наибольший вклад в развитие заболевания. В результате выявили оптимальную модель, которая определяет предрасположенность к развитию ВПС и характеризуется высокой воспроизводимостью и минимальной ошибкой предсказания (Таблица 2).

Таблица 1 – Сравнение частот встречаемости общих для супругов аллелей *HLA-DRB1* в основной и контрольной группах

Общие аллели в супружеской паре	Контрольная группа (n = 132), %	Основная группа (n = 48), %	p
Всего	9,09	41,5	0,001
<i>HLA-DRB1*01</i>	3,03	6,25	> 0,05
<i>HLA-DRB1*03</i>	1,52	0,00	> 0,05
<i>HLA-DRB1*04</i>	0,00	4,10	0,03
<i>HLA-DRB1*07</i>	0,75	4,10	> 0,05
<i>HLA-DRB1*11</i>	0,00	6,25	0,007
<i>HLA-DRB1*12</i>	0,75	0,00	> 0,05
<i>HLA-DRB1*13</i>	2,27	12,50	0,009
<i>HLA-DRB1*15</i>	0,75	8,30	> 0,05

Примечание: n – количество семей.

Анализ модели позволил выделить ряд рисковых и протективных генотипов. Так, показаны комбинации мужских и женских аллелей, ассоциированные с предрасположенностью к развитию ВПС в последующих поколениях. Наиболее значимыми сочетаниями аллелей у мужчин оказались *HLA-DRB1*11/HLA-DRB1*15* ($p = 0,016$, ОШ = 5,8 ДИ 95 % 1,27–26,89) и *HLA-DRB1*4/HLA-DRB1*15* ($p = 0,025$, ОШ = 4,3 ДИ 95 % 1,25–14,75). Стоит отметить, что при анализе аллелей у женщин статистически значимых рисковых сочетаний не выявлено, однако показано сочетание, обладающее протективным эффектом *HLA-DRB1*08/HLA-DRB1*11* ($p = 0,038$, ОШ = 0,13 ДИ 95 % 0,01–0,89).

Таблица 2 – Характеристика модели, определяющая предрасположенность к развитию врожденных пороков сердца в последующем поколении

Модель	Bal. Acc. Tr.	Bal. Acc. Test.	Se.	Sp.	Cons.	Pre.
Мультилокусная модель аллелей <i>HLA-DRB1</i>	0,73	0,52	0,78	0,67	10/10	0,70

Примечание: Tr. Bal. Acc. – тренировочная сбалансированная точность, Test. Bal. Acc. – тестируемая сбалансированная точность, Se. – чувствительность; Sp. – специфичность, Cons. – повторяемость результата, Pre. – точность модели.

Отклонение от случайного равновероятного наследования *HLA-DRB1* от родителей к их детям влияет на особенности распределения аллелей *HLA-DRB1*

как у здоровых, так и больных детей. Сравнение частот встречаемости аллелей *HLA-DRB1* в исследуемой и контрольной группах детей выявило аллель *HLA-DRB1*15* ($p = 0,014$), ассоциированный с ВПС. Стоит отметить, что величина ОШ для данного аллеля составила 2,05 (1,16–3,60), что свидетельствует о его рисковом влиянии в отношении предрасположенности к развитию ВПС (Рисунок 4).

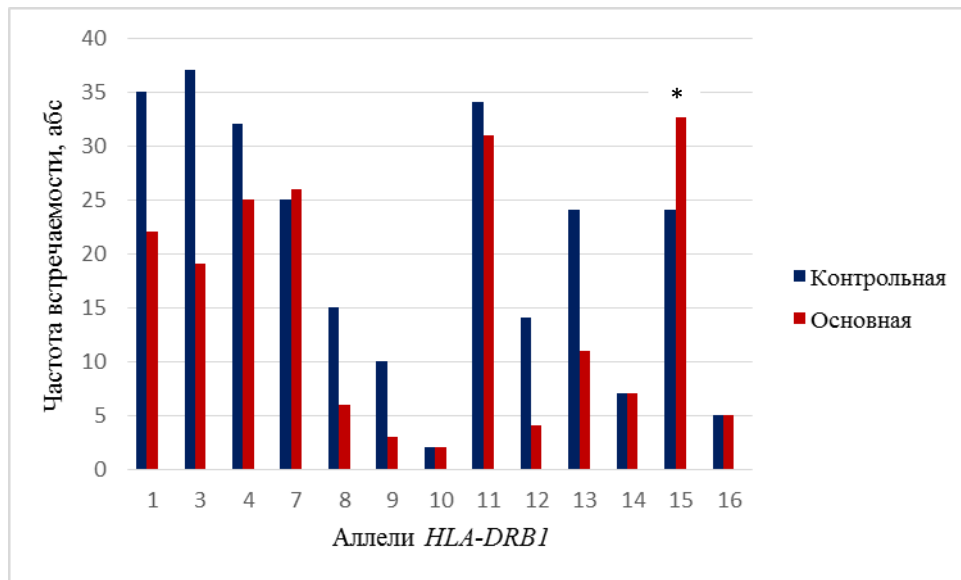


Рисунок 4 – Сравнительная характеристика аллелей гена *HLA-DRB1* у детей из обследованных групп

Наследование аллелей HLA-DRB1 и их роль в предрасположенности к развитию врожденных пороков сердца в последующем поколении

Для оценки переданных и переданных аллелей *HLA-DRB1* отобрано 48 полных семей, имеющих детей с ВПС. Для проведения анализа использовали TDT тест, который позволяет определять количество переданных и переданных аллелей «риска» потомству. При проведении сравнительного анализа оценивали общее количество переданных и переданных аллелей от родителей к детям (Таблица 3).

Таблица 3 – Сравнительная характеристика переданных и переданных родительских аллелей детям с врожденным пороком сердца

Аллели <i>HLA-DRB1</i>	Общее количество аллелей (n = 192)	Переданные (n = 96)	Непереданные (n = 96)	χ^2	p
01	20	12	8	0,5	0,23
03	17	11	6	1,03	0,15
04	26	11	15	0,4	0,26
07	24	16	8	2,33	0,06
08	8	3	5	0,13	0,36
09	1	1	0	0,0	0,50
10	2	0	2	0,50	0,24
11	25	14	11	0,18	0,33
12	6	3	3	0,40	0,65
13	25	8	17	2,94	0,042
14	3	3	0	1,35	0,12
15	31	11	20	2,46	0,057
16	4	3	1	0,25	0,31

Примечание: χ^2 – хи-квадрат с поправкой Йетса, n – количество аллелей.

Таблица 4 – Сравнительная характеристика переданных и переданных родительских аллелей условно здоровым детям (контрольная группа)

Аллели <i>HLA-DRB1</i>	Общее количество аллелей (n = 528)	Переданные (n = 264)	Непереданные (n = 264)	χ^2	p
01	76	35	41	0,5	0,23
03	51	37	14	11,57	0,001
04	63	32	31	0,02	0,5
07	51	26	25	0,08	0,47
08	34	18	16	0,13	0,39
09	21	12	9	0,45	0,28
10	2	1	1	0,01	0,5
11	58	32	26	0,71	0,13
12	30	14	16	0,12	0,33
13	48	24	24	0,01	0,5
14	15	6	9	0,62	0,17
15	62	24	38	0,34	0,33
16	17	5	12	2,97	0,063

Примечание: χ^2 – хи-квадрат с поправкой Йетса, n – количество аллелей.

Сравнение особенностей наследования в контрольной группе (Таблица 4) также показало, что аллели *HLA-DRB1* в равной степени передавались и не передавались потомству.

Исходя из гипотезы о том, что наличие общих аллелей у супругов и плода приводит к нежелательным исходам беременности, провели сравнение переданных и непереданных общих для родителей аллелей *HLA-DRB1* их детьми. Показано, что из 48 исследуемых семей, в 22 (45,8 %) семьях имелось совпадение супругов по аллелям *HLA-DRB1*. Как уже говорилось, этот показатель выше, чем в контрольной группе. Однако только в 16 семьях (72,7 %) общие аллели были унаследованы детьми.

Аллогенные взаимодействия в краткосрочной культуре лимфоцитов в семейных парах, имеющих детей с врожденными пороками сердца

Для оценки нарушений в системе «мать-плод» по антигенам HLA использовали метод смешанной культуры лимфоцитов, графический результат которого представлен на рисунке 5.

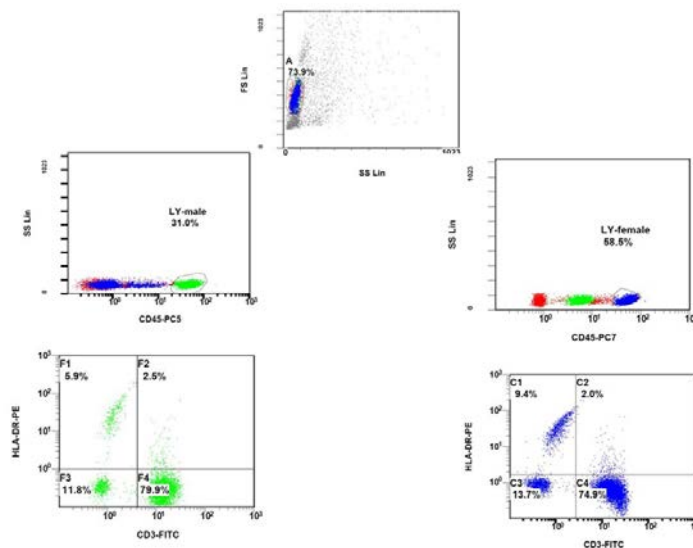


Рисунок 5 – Смешанная культура лимфоцитов супругов, где первично по SSL/FSL гейтированы все лимфоциты, участвующие в СКЛ; далее они разделены на мужские (SSL/CD45⁻PC5 и женские (SSL/CD45⁻PC7), в которых проведена оценка субпопуляций CD3⁺HLA-DR⁺ и CD3⁻HLA-DR⁺

Показано, что при добавлении женской аутосыворотки в СКЛ супругов, КП экспрессии HLA-DR на активированных Т-лимфоцитах ($CD3^+HLA-DR^+$) был положительным в контрольной группе и отрицательным в основной группе (Таблица 5). По этому показателю группы значимо различались ($p = 0,008$). Статистически значимые различия достигнуты и для КП экспрессии HLA-DR на субпопуляции лимфоцитов ($CD3^-HLA-DR^+$) в СКЛ с добавлением женской аутосыворотки. В сравниваемых группах данный показатель положительный, но в основной группе семей, имеющих детей с пороками сердца, данный КП выше, чем в группе контроля ($p = 0,002$). КП отражает изменение экспрессии HLA-DR на женских или мужских лимфоцитах в смешанной культуре по отношению к спонтанным женским или мужским культурам, соответственно.

Таблица 5 – Аллоиммунные взаимодействия лимфоцитов супругов по HLA в основной и контрольной группах (Me, квартили [25%–75%])

Аналиты	Контрольная группа	Основная группа
КП СКЛ ауто $CD3^+HLA-DR^+$	28,41 [15,43–41,38]	-50,75 [-63,32 – (-38,18)]*
КП СКЛ ауто $CD3^-HLA-DR^+$	24,45 [-10,79–59,87]	359,34 [254,77–463,92]*
КБ СКЛ $CD3^+HLA-DR^+$	644,52 [-66,84–1355,89]	-1049,52 [-1809,82 – (-289,21)]*
КБ СКЛ $CD3^-HLA-DR^+$	-406,63 [-985,21–193,95]	14361,35 [5992,95–22729,75]*
КБ СКЛ $HLA-DR^+$	38,69 [-22,64–100,01]	6562,22 [-1663,77–14788,21]*
ЭКП ауто $CD3^+HLA-DR^+$	70,74 [20,76–120,72]	-106,00 [-490,67–278,67]*
ЭКБ $CD3^+HLA-DR^+$	54,06 [-13,80–121,92]	-747,69 [-1317,14 – (-178,24)]*

* Статистически значимые различия.

Показано, что эффект женской аутосыворотки в отношении клеточных аллогенных по HLA реакций женских активированных Т-лимфоцитов ($CD3^+HLA-DR^+$) в СКЛ супругов, имеющих детей с ВПС, был с выраженным блокирующим эффектом (КБ – отрицательный), в то время как в контрольной группе он был стимулирующим (КБ – положительный) ($p = 0,0008$). В отношении субпопуляции

лимфоцитов ($CD3^+HLA-DR^+$) эффект женской аутоыворотки в сравниваемых группах был прямо противоположным. Так, СКЛ супругов, имеющих детей с ВПС, женская аутоыворотка активировала, а в контрольной группе – блокировала ($p = 0,0001$). В целом для всех женских лимфоцитов, экспрессирующих HLA-DR, активирующий эффект (КБ – положительный) женской аутоыворотки выше в основной группе по отношению к контрольной ($p = 0,0003$).

Кроме того, выявлено статистически 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 аутоыворотки. Так, в группе семей, имеющих детей с ВПС, этот показатель отрицательный, а в группе контроля (семьи, имеющие здоровых детей) – положительный ($p = 0,02$). Этот ЭКП был сопоставим с соответствующим женским КП для этой субпопуляции лимфоцитов. С учетом отсутствия различий по другим ЭКП, в том числе рассчитанным для клеточных реакций в СКЛ с ЭТС, вновь высказывается предположение о роли сывороточных факторов в моделировании клеточных аллогенных по HLA реакций в системе «мать – плод», приводящих к индукции формирования пороков сердца у плода. По ЭКБ получено единственное достоверное различие между сравниваемыми группами в отношении женских активированных Т-лимфоцитов. Блокирующий эффект женской аутоыворотки в отношении клеточных аллогенных по HLA реакций женских активированных Т-лимфоцитов ($CD3^+HLA-DR^+$) был выраженным (с учетом блокирования ответа мужских активированных Т-лимфоцитов в отношении женских) в группе семей, имеющих детей с ВПС (ЭКБ – отрицательный). В группе контроля этот ЭКБ был положительный, между группами достигнуто достоверное различие ($p = 0,002$).

Для выявления иммунологических предикторов риска формирования ВПС определена формула для расчета вероятности риска развития ВПС в последующих поколениях.

$$Y = (\text{EXP}(Z) / (1 + \text{EXP}(Z))) \times 100 \%, \text{ где}$$

$$Z = (0,678 - (X_1 \times 0,004) - (X_2 \times 0,002) + (X_3 \times 0,003)),$$

где Y – вероятность риска формирования ВПС в последующих поколениях, %; X_1 – КБ женской аутоывороткой экспрессии HLA-DR на женских Т-лимфоцитах в женской СКЛ, % (от -50 до +200); X_2 – ЭКП экспрессии HLA-DR на женских Т-лимфоцитах в женской СКЛ с ЭТС по отношению к соответствующей мужской СКЛ, % (от -1200 до +50); X_3 – ЭКП экспрессии HLA-DR на женских В-лимфоцитах в женской СКЛ с ЭТС по отношению к соответствующей мужской СКЛ, % (от -500 до +150).

Анализ генетических локусов с иммунными показателями мужчин и женщин из основной группы показал, что с более высокими уровнями экспрессии молекулы HLA-DR на поверхности лимфоцитов связано наличие в генотипе женщин аллеля *HLA-DRB1*8* ($p = 0,01$), а также аллеля *HLA-DRB1*11* ($p = 0,04$). В то же время стоит отметить, что для мужчин КП экспрессии HLA-DR на активированных Т-лимфоцитах в СКЛ с добавлением женской аутоыворотки статистически значимо выше у отцов, которые были носителями аллеля *HLA-DRB1*4* ($p = 0,03$). С другими аллелями статистически значимых различий получено не было (Таблица 6).

Таблица 6 – Взаимосвязь генетических локусов с иммунными показателями мужчин и женщин из основной группы

Аллели <i>HLA-DRB1</i>	Женщины			Мужчины		
	КП СКЛ ЭТС HLA DR+	КП СКЛ Ауто HLA DR+	КБ КБ СКЛ HLA-DR ⁺	КП СКЛ ЭТС HLA DR+	КП СКЛ Ауто HLA DR+	КБ КБ СКЛ HLA-DR ⁺
01	0,59	0,19	0,51	0,31	0,59	0,39
03	0,23	0,36	0,94	0,71	0,91	0,58
04	0,65	0,98	0,59	0,62	0,03*	0,0028*
07	0,20	0,78	0,23	0,72	0,85	0,75
08	0,09	0,37	0,01*	0,44	0,66	0,58

09	0,19	0,98	0,40	0,0	0,0	0,0
10	0,66	0,33	0,50	0,91	0,48	0,48
11	0,04*	0,72	0,49	0,85	0,43	0,21
12	0,99	0,10	0,24	0,18	0,88	0,44
13	0,30	0,43	0,41	0,52	0,76	0,74
14	0,21	0,76	0,93	0,50	0,25	0,23
15	0,45	0,38	0,73	0,18	0,10	0,59
16	0,21	0,41	0,45	0,73	0,78	0,70

* Отмечен р-уровень со значимыми различиями.

В результате исследования определены основные маркеры, на основании которых разработана схема, показывающая роль иммуногенетических факторов в предрасположенности к развитию врожденных пороков сердца (Рисунок 5).

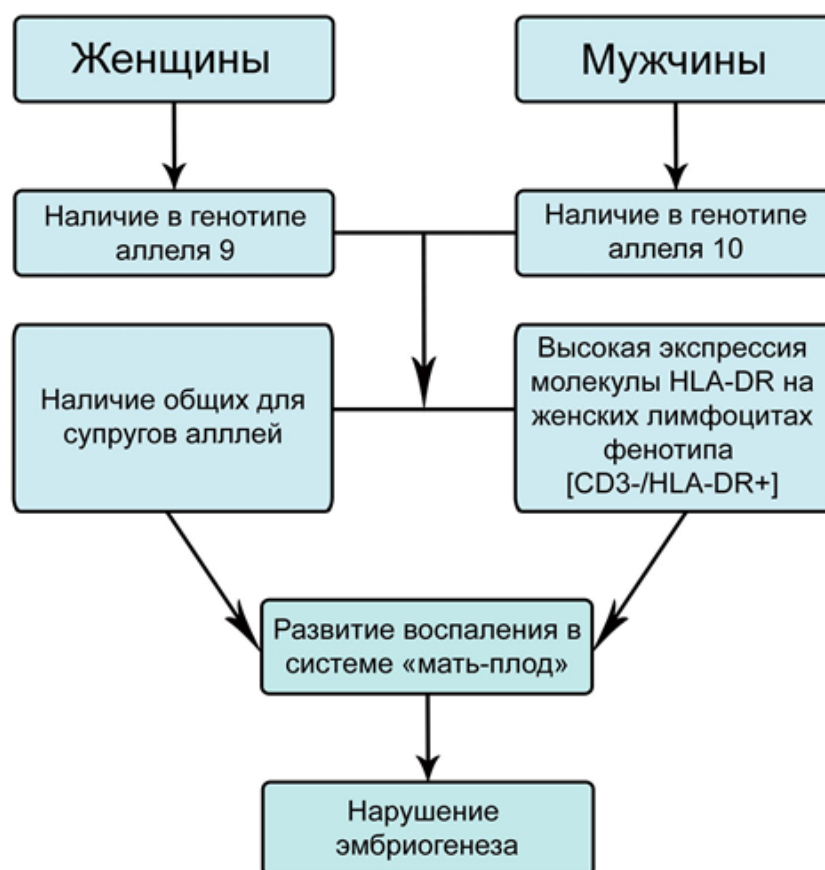


Рисунок 6 – Схема, показывающая влияние иммуногенетических факторов на предрасположенность к развитию врожденных пороков сердца

ВЫВОДЫ

1. В патогенез врожденных пороков сердца вносят вклад родительские патологические и протективные аллели *HLA-DRB1* (мужской *HLA-DRB1*09* и женский *HLA-DRB1*10*) и сочетания мужских (*HLA-DRB1*11/HLA-DRB1*15* и *HLA-DRB1*4/HLA-DRB1*15*) и женских (*HLA-DRB1*08/HLA-DRB1*11*) аллелей.

2. Частота встречаемости общих аллелей для супругов контрольной группы не превышала 10 %; в семьях, имеющих детей с врожденными пороками сердца, частота встречаемости общих аллелей составила 41 %.

3. Наследование рискованных и протективных аллелей *HLA-DRB1* от родителей к детям не обладает патогенетической значимостью в отношении развития врожденных пороков сердца.

4. Экспрессия молекулы HLA-DR на женских лимфоцитах с фенотипом CD3⁻HLA-DR⁺ ассоциирована с риском развития врожденных пороков сердца при добавлении в смешанную культуру лимфоцитов супруга, добавление эмбриональной телячьей сыворотки приводит к ее снижению, а добавление женской аутосыворотки – к увеличению.

5. Молекула HLA-DR, экспрессируемая на женских лимфоцитах, обладает предикторным потенциалом и может быть использована для расчета вероятности риска развития врожденных пороков сердца.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работы, опубликованные в журналах перечня рецензируемых научных изданий (ВАК при Минобрнауки РФ)

1. 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 / A. V. Shabaldin, S. V. Grivtsova, N. S. Deeva, S. A. Shmulevich, **A. V. Tsepokina** [et al.] // Medical immunology. – 2021. – Vol. 23 (1). – С.143–148. DOI: 10.15789/1563-0625-CIT-2013. (Scopus)

2. Особенности наследования аллелей *HLA-DRB1* в семьях, имеющих детей с врожденными пороками сердца / **А. В. Цепокينا**, А. В. Шабалдин,

С. А. Шмулевич [и др.] // Журн. мед.-биол. исследований. – 2020. – Т. 8, № 2. – С. 166–173. DOI: 10.37482/2542-1298-Z007.

3. Роль полиморфных вариантов гена *HLA-DRB1* в развитии врожденных пороков сердца / **А. В. Цепкина**, А. В. Шабалдин, С. А. Шмулевич [и др.] // Российский иммунологический журнал. – 2018. – Т. 12, № 4. – С. 774–776. DOI: 10.31857/S102872210002671-3.

4. Влияние женской аутосыворотки крови на аллогенные взаимодействия в краткосрочной культуре лимфоцитов супругов, имеющих детей с конотрункальными пороками / С. В. Горшкова, С. А. Шмулевич, А. В. Шабалдин, Н. С. Деева, **А. В. Цепкина** [и др.] // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2019. – Т. 8, № 3. – С. 60–70. DOI: 10.17802/2306-1278-2019-8-3.

5. Особенности распределения аллелей и генотипов *HLA-G* 3'UTR 14-bp ins/del у женщин, имеющих детей с врожденными пороками сердца или репродуктивные потери в ранние сроки гестации / А. В. Шабалдин, **А. В. Цепкина**, С. А. Шмулевич [и др.] // Медицинская иммунология. – 2017 – № 6 – С. 763–770. (Scopus)

Материалы конференций

6. **Цепкина А. В.** Роль генов главного комплекса гистосовместимости в формировании врожденных пороков сердца у детей / **А. В. Цепкина**, А. В. Понасенко // Сборник тезисов XI Международной (XX Всероссийской) Пироговской медицинской конференции студентов и молодых ученых. – М., 2016. – С. 492.

7. Иммуногенетические аспекты формирования врожденных пороков конотрункуса без хромосомных заболеваний / Н. С. Деева, **А. В. Цепкина**, А. В. Шабалдин [и др.] // Российский иммунологический журнал. – 2019. – № 2. – С. 227–229.

8. Роль родительских иммуногенетических факторов в формировании в последующем поколении спорадических врожденных пороков сердца без хромосомных заболеваний / **А. В. Цепкина**, С. В. Горшкова, А. В. Шабалдин

[и др.] // Детская кардиология-2018: сб. тезисов 10-го Всероссийского конгресса. – М., 2018. – С. 52–53.

Патенты

9. **Пат. 2617249 Российская Федерация, МПК G01N 33/53.** Способ прегравидарного прогнозирования риска формирования септальных форм врожденных пороков сердца у плода / Шабалдин А. В., Табакаев М. В., **Цепочкина А. В.**, Шмулевич С. А.; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний». – № 2016111571; заявл. 28.03.2016; опубл. 24.04.2017, Бюл. № 12. – 11 с.

10. **Пат. 2709610 Российская Федерация, МПК G01N 33/52.** Способ прегравидарного прогнозирования риска формирования спорадических септальных врожденных пороков сердца без хромосомных заболеваний в последующих поколениях / Шабалдин А. В., Горшкова С. В., Шмулевич С. А., **Цепочкина А. В.**, Вавин Г. В., Лукоянычева Е. Б., Шабалдина Е. В.; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний». – № 2018129364; заявл. 10.08.2018; опубл. 19.12.2019, Бюл. № 35. – 17 с.

Методические рекомендации

11. Иммунологический метод прегравидарного прогнозирования риска формирования спорадических врожденных пороков сердца без хромосомных заболеваний / А. В. Шабалдин, С. А. Шмулевич, **А. В. Цепочкина** [и др.]. – Кемерово, 2019. – 35 с.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВПС – врожденные пороки сердца

СКЛ – смешанная культура лимфоцитов

КП – коэффициент прироста

КБ – блокирующий коэффициент

ЭКП – эффективный коэффициент прироста

ЭКБ – эффективный коэффициент блокирования

Подписано в печать 19.07.2021. Формат 60×84¹/₁₆. Бумага офсетная № 1.
Печать офсетная. Усл. печ. л. 1,4. Тираж 100 экз. Заказ № 130

Адрес издательства и типографии ООО «АИ Кузбассвуиздат»:
650993, Кемеровская область, г. Кемерово, ул. Кирова, 45.
Тел. 8 (3842) 36-36-00. E-mail: 58293469@mail.ru