МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «КЕМЕРОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

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

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор Литвинова Надежда Алексеевна

Научный консультант:

доктор медицинских наук, доцент Шабалдин Андрей Владимирович

ОГЛАВЛЕНИЕ

| ВВЕДЕНИЕ 4 |
|---|
| ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 11 |
| 1.1. Врожденные пороки сердца: основные этапы внутриутробного развития |
| классификация, факторы риска развития |
| 1.2. Главный комплекс гистосовместимости: строение, функции, вклад в |
| патогенез заболеваний |
| 1.3. HLA детерминирование иммунных взаимодействий в системе |
| «мать- плод» |
| ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ |
| 2.1 Характеристика исследуемых групп |
| 2.2 Молекулярно-генетические методы исследования |
| 2.3. Иммунологические методы исследования в системе «мать-плод» 43 |
| 2.4. Статистическая обработка данных |
| ГЛАВА З РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ |
| 3.1. Сравнительная характеристика распределения частот генотипов НLA-G |
| 3'UTR 14-bp ins/del у женщин, имеющих детей с врожденными пороками |
| сердца |
| 3.2. Оценка патогенеческих и протекторных аллелей <i>HLA-DRB1</i> в семьях |
| имеющих детей с врожденными пороками сердца |
| 3.3. Наследование аллелей <i>HLA-DRB1</i> и их роль в предрасположенности к |
| развитию врожденных пороков сердца в последующем поколении 64 |
| 3.4. Аллогенные взаимодействия в краткосрочной культуре лимфоцитов в |
| семейных парах, имеющих детей с врожденными пороками сердца71 |
| ОБСУЖДЕНИЕ 81 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ 89 |
| ВЫВОДЫ |
| ПРИЛОЖЕНИЕ 1 |

| ПРИЛОЖЕНИЕ 2 | . 93 |
|-------------------|------|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ | . 94 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | . 96 |

ВВЕДЕНИЕ

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 участие В формировании антиген-специфической клеткам, a также 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 иммунные остаются И иммуногенетические механизмы, ассоциированные риском развития поколениях. врожденных пороков сердца В последующих Исходя 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 исследования

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 тоже 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 исследования

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 формирования врожденных пороков сердца на «Прогнозирования риска прегравидарном этапе (при планировании беременности)», отраженный в патенте Российской Федерации № 2016111571 13.02.2017, а также «Способ OT прегравидарного прогнозирования риска формирования спорадических

септальных врожденных пороков сердца без хромосомных заболеваний в последующих поколениях», отраженный в патенте Российской Федерации № 2018129364 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, посвящённые 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 диссертационного исследования

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

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, и апробация результатов

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.

Материалы данного исследования доложены и обсуждены на: XIМеждународной Пироговской научной медицинской конференции (г. Москва, 17.03.2016 г.), XVI Ежегодном научно-практическом семинаре молодых ученых «Актуальные вопросы экспериментальной И клинической (г. Томск, 01.04.2016 г.), VI научной сессии молодых учёных Кузбасса (г. Кемерово, 08.06.2016 г.), ESC Congress (г. Рим, 30.08.2016 г.), Сателлитной конференции молодых ученых «Иммунодиагностика, иммунопрофилактика и иммунотерапия иммунозависимых и инфекционных болезней» (г. Сочи, 4.10.2018) VIII г.), Кардиологов Сибирского Съезде федерального округа (г. Кемерово, 10-11.11.2019 г.).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 8 научных работ в ведущих рецензируемых журналах и изданиях, определенных ВАК РФ, из них 2 статьи в журналах, индексируемых в научной базе SCOPUS и 3 тезисов в материалах конференций. Получены 2 патента на изобретение «Прогнозирование риска формирования врожденных пороков сердца на прегравидарном этапе (при

планировании беременности)», №2016111571 от 13.02.2017, «Способ прегравидарного прогнозирования риска формирования спорадических септальных врожденных пороков сердца без хромосомных заболеваний в последующих поколениях», № 2018129364 от 19.12.2019.

Составлены методические рекомендации «Иммунологический метод прегравидарного прогнозирования риска формирования спорадических врожденных пороков сердца без хромосомных заболеваний».

Структура и объем 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 177 источников (37 отечественных и 140 иностранных).

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в разработке дизайна и планировании исследования. Результаты получены, проанализированы и обобщены в выводах и положениях автором лично.

Автор выражает глубокую признательность директору Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», члену-корреспонденту РАН Барбараш Ольге Леонидовне. Автор также искренне благодарит заведующую лабораторией геномной медицины к.м.н. Понасенко Анастасию Валериевну за помощь в организации эксперимента и возможность его проведения, а также за ценные советы. Кроме того, автор выражает слова искренней благодарности своим научным руководителям д.м.н. Шабалдину Андрею Владимировичу и д.б.н. Литвиновой Надежде Алексеевне за возможность выполнения диссертационной работы, ценные советы и всестороннюю помощь на всех этапах работы.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Врожденные пороки сердца: основные этапы внутриутробного развития, классификация, факторы риска развития

Удельный вес врожденных пороков сердца (ВПС) среди всех пороков и аномалий развития плода составляет более 30 % (Van der Linde et al., 2011; Белозеров и др., 2014; Бокерия и др., 2016). Кроме того, показано ежегодное увеличение частоты рождения детей с ВПС для различных стран мира (Yang et al., 2009; Alenezi et al., 2015). Известно, что доля детей, рожденных с ВПС, составляет в среднем 0,7 % от общего числа новорожденных (Ляпин, 2005. Ariane et al., 2007; Alaani et al., 2011). Эпидемиологические исследования распространенности ВПС в Российской Федерации показали, что частота данной патологии у детей до 14 лет в 2006 году составляла 1105,8 на 100000 населения, у детей 15-17 лет -705,8/100000, а в 2014 году уже 1485,7/100000 и 1010,8/100000 у детей до 14 лет и у детей 15-17 лет, соответственно (Демикова и др., 2012; Бокерия и др., 2016). По отдельным территориям России также отмечены высокие показатели данной патологии. Так, на территории Краснодарского края данный показатель находится на отметке 1058,0/100000 детского населения, на территории г. Омска в 2011 г. – $1011,11 \pm 21,88/100000$ детского населения (Богачёв и др., 2011; Демикова, 2012). Эпидемиологические исследования частоты ВПС в Канаде показали, что частота данной патологии находилась на уровне 1189/100000 детского населения (Ariane et al., 2014). В странах Евросоюза действует открытый регистр врожденных пороков и аномалий развития плода и новорожденных Eurocat (http://www.eurocatnetwork.eu). По данным регистра, частота всех ВПС за период 2009 по 2014 годы находилась в пределах от 550 до 1010 на 100000 живорожденных детей (http://www.eurocat-network.eu).

ВПС Значимость маркера нарушений как В раннем онтогенезе подтверждается и тем, что в структуре инвалидизации в Российской Федерации доля врожденных аномалий системы кровообращения составляет 26 % (Мирзаян, 2011). Патологоанатомические исследования среди всех новорожденных, умерших на первом году жизни от врожденных аномалий, показали, что около 40 – 50 % детей умирает от ВПС (Белозеров, 2004; Школьникова и др., 2008). Показано, что вклад ВПС в детскую смертность до 14 лет остается высоким и не имеет тенденции к снижению, в отличие от других причин смертности (Саперова и др., 2017).

Таким образом, можно говорить о том, что ВПС являются пороками с высокой частотой встречаемости, выявляясь у 5 детей на 100 живорожденных (Бокерия, 2014), и именно они определяют детскую, младенческую и перинатальную смертности, причем этот вклад не подвержен влиянию современных медико-социальных лечебных и профилактических мероприятий.

Необходимо отметить, что в группу ВПС входит более 140 нозологических c доброкачественным течением форм, пороков И самостоятельным выздоровлением (открытое овальное окно, некоторые межжелудочковой перегородки, открытый артериальный проток и другие), до критических ВПС, приводящих к развитию тяжелой сердечной недостаточности и смерти (транспозиция магистральных сосудов, критические стенозы легочной артерии и аорты, гипоплазии левых и правых отделов сердца и другие) (Мутафьян, 2005). С этих позиций для оценки иммуногенетических факторов, приводящих к формированию ВПС, наиболее приемлемым является изучение ВПС в зависимости от критической стадии эмбриогенеза. В то же время, для практического здравоохранения классификация ВПС по стадии эмбриогенеза сердца не актуальна и громоздка, поэтому чаще всего для разграничения ВПС на большие группы используется международная классификация болезней (МКБ 10). В кардиохирургии ВПС, где существенное значение имеют первичные и вторичные нарушения гемодинамики, на восстановление которой и направлено хирургическое лечение, нашла широкое применение международная

классификация, принятая европейской ассоциацией кардиоторакальных хирургов в 2000 году (Nomenclature of Diagnosis of Heart Diseases at NMMC; Ann. Thorac. Surg., 2000).

Самая распространенная классификация ВПС, которой пользуются в институте сердечно-сосудистой хирургии имени А.Н. Бакулева, основана на анатомических и гемодинамических особенностях сердца (Фальковский и др., 2011).

Пороки со сбросом слева-направо («бледные»).

К бледным порокам относятся такие пороки, как открытый артериальный поток, дефекты межпредсердной и межжелудочковой перегородок, общее предсердие, аномальный дренаж вен, открытый общий атриовентрикулярный канал и дефекты аорто-легочной перегородки.

Пороки со сбросом справа-налево («синие»)

К синим поркам принято относить тетраду Фалло, многочисленные варианты транспозиций магистральных сосудов, аномалию Эбштейна, атрезию трехстворчатого клапана, общий артериальный ствол, варианты единственного желудочка, синдром гипоплазии левого сердца, гипоплазию правого желудочка.

Пороки с перекрестным сбросом могут включать все три перечисленные группы, если имеются те или иные сочетания, например, атровентрикулярный канал и тетрада Фалло, общий артериальный ствол.

Пороки с препятствием кровотока включают коарктации аорты, сужение или стеноз аортального клапана, стеноз клапана легочной артерии, стеноз митрального клапана, стенозы ветвей легочной артерии.

Пороки клапанного аппарата — это отдельная группа, в которую включаются только нарушения развития атриовентрикулярных или полулунных клапанов без сочетания с другими внутрисердечными нарушениями. Сюда относят пролапс (недостаточность) митрального (и трикуспидального) клапана и его стеноз, недостаточность клапанов аорты и легочной артерии.

Пороки венечных артерий сердца включают все нарушения их нормального развития: аномальное отхождение их устьев, коронаро-сердечные фистулы.

Кардиомиопатии или врожденные нарушения мышечного аппарата желудочков сердца.

Врожденные нарушения ритма сердца, которые не сочетаются ни с какими другими ВПС, а являются отдельным заболеванием.

Как уже говорилось выше, в 2000 году появилась новая европейская классификация ВПС, принятая ассоциацией кардиоторакальных хирургов (Nomenclature of Diagnosis of Heart Diseases at NMMC; Ann. Thorac. Surg., 2000; Швецов, 2014).

- 1. Стенотические или обструктивные пороки левого сердца, которые могут быть на различных уровнях:
- а) аортальный стеноз (Aortic stenosis) на различных уровнях (подклапанный, клапанный, надклапанный);
- б) коарктация аорты и ее крайняя форма прерывание дуги аорты;
- в) синдром гипоплазии левого сердца;
- г) врожденный митральный стеноз и его крайняя форма митральная атрезия;
- д) синдром Шона: проявление совокупности обструкций левого сердца (митральный стеноз, аортальный стеноз, коарктация аорты);
- е) стенозы легочных вен.
- 2. Стенотические или обструктивные пороки правого сердца:
- а) стеноз легочной артерии на различных уровнях, крайняя степень выраженности порока атрезия ЛА с ИМЖП;
- б) гипоплазия правого желудочка с гипоплазией или атрезией трикуспидального клапана;
- в) тетрада Фалло с выраженной гипоплазией или атрезией ЛА.
- 3. Шунтовые пороки с перегрузкой правого желудочка:
- а) ДМПП изолированный или в сочетании с частичным аномальным дренажем легочных вен;
- б) тотальный аномальный дренаж легочных вен.
- 4. Шунтовые пороки с перегрузкой левого желудочка:
- а) ДМЖП;

- б) открытый артериальный проток;
- в) дефект аортолегочной перегородки;
- г) атриовентрикулярный канал.

ВПС формируются в эмбриональный период со 2 по 8 неделю гестации (Баранов, 2015). В процессе эмбриогенеза, начиная со 2 недели, у эмбриона начинается закладка сердца из висцерального листка мезодермы. Изначально сердце представляет собой S-образную трубку, по которой кровь движется одним большим потоком (Белозеров, 2004). Затем, в течение 3 и 4 недели внутриутробного развития, идет постепенное усложнение трубки. Так, к концу четвертой недели внутриутробного развития в сердечной трубке можно различить отдела: краниальную часть (луковица сердца), которая переходит артериальный ствол, желудочковый отдел, и в каудальной части – предсердный отдел (Баранов и др., 2006). Уже на 3 неделе развития образуется зачаток межпредсердных и межжелудочковых перегородок. Стоит отметить, что, начиная с 4-й недели, наблюдается активный рост сердечной трубки, в результате чего она изгибается и сигмовидно закручивается (форма сердечной петли), вследствие чего происходит смена расположения предсердий и желудочков. Следующим этапом, после образования сердечной петли, идет стадия двухкамерного сердца, затем – стадия трехкамерного сердца, которая отличается от предыдущей тем, что на стадии двухкамерного сердца отмечается наличие одного предсердия и одного желудочка, а на стадии трехкамерного сердца происходит разделение общего предсердия на правое и левое. На данном этапе из зачатка межпредсердной перегородки первичная межпредсердная перегородка, начинает расти разделяющая единое предсердие на левое и правое. Однако перегородка до конца не дорастает, и формируется первичное межпредсердное отверстие. На 5-й неделе внутриутробного развития происходит закрытие первичного межпредсердного отверстия, однако, принимая во внимание то, что плод не дышит, между правым и левым предсердием в течение всего эмбрионального периода должно быть сообщение, иначе эмбрион будет не жизнеспособен. Поэтому в верхней части перегородки происходит формирование вторичного межпредсердного отверстия.

На 6-й неделе со стороны правого предсердия начинает образовываться вторичная межпредсердная перегородка, закрывая при этом вторичное межпредсердное отверстие. Как правило, к первому году жизни вторичная межпредсердная перегородка закрывается.

Последняя стадия — стадия четырехкамерного сердца — завершается на 8-й неделе внутриутробного развития. На этом этапе путем роста мышечной и фиброзной части стенок сердца по направлению к общему предсердножелудочковому каналу формируется перегородка, которая разделяет единый желудочек на правый и левый.

Изучено огромное количество экологических, социальных, медицинских и генетических факторов, оказывающих значимое влияние на развитие сердечно-сосудистой системы. Восприимчивость и чувствительность к различным неблагоприятным факторам повышается в критические периоды эмбриогенеза сердца.

Достаточно большое количество исследований демонстрирует взаимосвязь прегестационного сахарного диабета у матерей с риском развития BПС (Jenkins et al., 2007; Banhidy et al., 2010; Garne et al., 2012; Oyen et al., 2016). Авторы исследований предполагают, что данный вид диабета может влиять на формирование данной патологии в течение 7-й недели внутриутробного развития, которая приходится на критический период (Kousseff, 1999). Прегестационный диабет фенотипами $B\Pi C$, ассоциирован c различными включая атриовентрикулярный септальный дефект, коарктацию аорты, дефект межжелудочковой перегородки и другие (Correa et al., 2008; Donofrio et al., 2014).

Также, стоит отметить важную роль фолатов в развитии сердечнососудистых катастроф. Показано, что у матерей с высоким уровнем гомоцистеина чаще рождались дети с ВПС по сравнению с матерями, имеющими показатель гомоцистеина в пределах нормы (Verkleij-Hagoort et al., 2006; Hobbs et al., 2011).

К факторам риска также можно отнести наличие артериальной гипертонии у женщин в период беременности. Неоднократно показано, что гипертония у

матери ассоциирована с двукратным увеличением риска развития ВПС у ребенка (Yauck et al., 2004; Caton et al., 2009; Li et al., 2011).

В ряде исследований отмечается важность такого фактора как репродуктивная история. Различные методы лечения репродуктивных проблем, включая медикаментозные препараты для лечения бесплодия, увеличивают риск рождения ребенка с любым фенотипом ВПС (Tararbit et al., 2011). Данная закономерность сохраняется и при разделении ВПС на отдельные виды (Reefhuis et al., 2009, Reefhuis et al., 2010). Также отмечено, что при многоплодной беременности риск развития ВПС у одного из детей выше, по сравнению с обычной беременностью (Duong et al., 2012; Herskind et al., 2013).

Потенциальным фактором, который оказывает влияние на развитие ВПС, может выступать социоэкономический статус родителей. Датские ученые, проанализировав 81 000 новорожденных, отметили, что низкий уровень социального развития ассоциирован с ВПС у детей (Xiang et al., 2018). Небольшое исследование случай — контроль, проведенное в Литве, также показало трехкратное увеличение риска ВПС у детей, матери которых имели низкий социоэкономический статус (Yang et al., 2008; Kuciene et al., 2009).

Стресс, который испытывают матери на протяжении беременности, играет непосредственную роль в развитии ВПС, что находит свое подтверждение во многих современных исследованиях. Механизмом, посредством которого может осуществляться воздействие стрессовых факторов на организм, связан с увеличением синтеза кортикостероидов (Carmichael et al., 2000). В исследовании, проведенном на животных моделях, доказано, что кортикостероиды могут выступать в роли тератогенов, воздействуя на различные системы органов (Вјørn et al., 2014). Стрессовые ситуации, случающиеся во время беременности, вызывают увеличение концентрации кортикотропин-рилизинг-гормона и также кортикостероидов в организме матери (Holzman et al., 2001; Liu et al., 2009; Duong et al., 2012). Увеличение концентрации глюкокортикоидов в крови, как правило, приводит к возникновению резистентности к инсулину, что также может являться рисковым фактором для развития ВПС (Andrews et al., 1999). Котехоламины,

активно синтезирующиеся в организме во время стресса, приводят к снижению маточного кровотока, что, в свою очередь, приводит к гипоксии плода. Стоит отметить, что большинство исследований, посвященных влиянию стресса на организм беременных, связано с развитием различных видов врожденных аномалий, в том числе и ВПС (Duong et al., 2012; Liu, 2009).

Прием различных медикаментозных препаратов во время беременности также негативно сказывается на будущем ребенке. Так, литературные данные свидетельствуют о том, что прием антидепресантов увеличивает риск развития ВПС у потомства (Reis et al., 2010; Malm et al., 2011; Polen et al., 2013). Однако, несмотря на полученные положительные ассоциации, в некоторых исследованиях данные остаются противоречивыми (Alwan et al., 2007; Alwan et al., 2010; Bakker et al., 2010).

У женщин, получающих во время беременности антигипертензивную терапию, возрастает риск рождения детей с ВПС, однако имеющиеся данные достаточно противоречивы. Одни исследователи утверждают, что прием некоторых препаратов увеличивает предрасположенность к развитию ВПС в два раза (Cooper et al., 2006; Caton et al., 2009; Lennestal et al., 2009), однако в ряде других исследований никаких ассоциаций установлено не было (Banhidy et al., 2011; Li et al., 2011).

К медикаментозным препаратам, которые связаны с увеличением риска развития как ВПС в целом, так и отдельных фенотипов данной патологии, можно также отнести антибиотики (Crider et al., 2009; Reis et al., 2010), и фолиевую кислоту (Botto et al., 2000; van Beynum et al., 2010; Czeizel et al., 2013; Feng et al., 2015; Øyen et al., 2019).

Немаловажным фактором, который оказывает влияние на развитие плода и формирование у него ВПС, является употребление алкоголя матерью. Многие исследования подтверждают идею о том, что алкоголь является тератогеном, который оказывает негативное воздействие на эмбрион, особенно при употреблении в критические периоды его развития. Однако полученные данные

достаточно противоречивы (Carmichael et al., 2003; Yang et al., 2015; Wen et al., 2016).

Кроме алкоголя, большое внимание уделяется и курению матерей как до беременности, так и на всем ее протяжении. Большинство исследований подтверждают неблагоприятный эффект табачного дыма на формирование плода и развитие у него ВПС (Alverson et al., 2011; Zhang et al., 2017).

Прием наркотических веществ различного происхождения также влияет на состояние беременной женщины. Большое количество литературных данных свидетельствует о корреляции между развитием пороков сердца у детей и употреблением наркотических веществ матерями (Xiao et al., 2001; Hrusca et al., 2013; Lind et al., 2017).

В целом, можно сделать вывод, что ВПС – это патология, развивающаяся в воздействия результате комплексного на эмбрион факторов макромикроокружения женщины, которые индуцируют окислительный стресс, влияют на миграцию и дифференцировку эмбриональных клеток, способствуют развитию тканевой гипоксии, нарушают детоксикацию различных метаболитов, оказывают повреждающее действие на ДНК, а также подавляют основные процессы регуляции клеточного цикла, в том числе запрограммированный апоптоз эмбриональных клеток. Социальные факторы, влияющие на женщину, такие как низкий социальный уровень и уровень образования, табакокурение, алкоголизм, наркомания, инфекции, передающиеся половым путем, неправильное питание, способствуют увеличению нагрузки как на беременную женщину, так и на плод, вызывая при этом нарушение онтогенеза, что в конечном итоге приводит к развитию ВПС.

1.2. Главный комплекс гистосовместимости: строение, функции, вклад в патогенез заболеваний

Известно, что главный комплекс гистосовместимости (The Main Histocompatibility Complex, MHC) включает гены, кодирующие рецепторы

клеточной поверхности, играющие важную роль в функционировании иммунной системы организма и во взаимодействиях особей внутри вида. Началом активного изучения главного комплекса гистосовместимости можно считать 50-е годы, с момента его открытия Ж. Доссе, который в 1980 году получил Нобелевскую премию (Dausset, 1984). Начиная с этого периода, интерес исследователей к генетической структуре и биологическим функциям главного комплекса гистосовместимости, называемого у человека HLA (Human Leucocyte Antigen), стремительно вырос.

На сегодняшний день HLA комплекс представлен тремя основными классами, которые располагаются на коротком плече 6 хромосомы и отличаются как строением, так и выполняемыми функциями (Klein et al., 2000). Известно, что HLA высокополиморфной, является TO содержит система есть проявляющиеся более чем в одной фенотипической форме (Hughes et al., 1993). Именно этот высокий эволюционно закрепленный полиморфизм в генах системы HLA является основой выживаемости человека как вида (Хаитов и др., 2013). Одним из уникальных свойств молекул HLA является первичное распознавание антигена, а точнее его участка, обозначаемого как агретоп, и через эту функцию рестриктирование иммунного ответа к ксено- и эндобиотикам (Ярилин, 2010). Как известно, последующие этапы иммунного ответа связаны с распознаванием Тклеточным рецептором пептида (эпитопа), связанного с молекулой HLA. Доказано, что эволюционно гены (A, B, D) Т-клеточного рецептора и гены (A, B) молекул HLA-В имеют общий ген (Neefjes et al., 2011).

Увеличение спектра распознавания агретопов определяется тем, что HLA, в отличие от многих других генов, наследуются по кодоминантному типу. На клеточной мембране соматических и иммунокомпетентных клеток экспрессируются оба гена материнской и отцовской хромосом, то есть оба кодируемых продукта участвуют в рестрикции иммунного ответа. Каждый человек обладает своим индивидуальным и неповторимым набором генов HLA системы, а полное соответствие генов можно наблюдать только у однояйцевых близнецов (Могилина, 2013).

Высокую полиморфность комплекса HLA наглядно демонстрирует тот факт, что на сегодняшний день насчитывается 30 522 аллелей (данные на март 2021 года), описанных в номенклатуре HLA и включенных в международную базу данных IPD-IMGT / HLA при том, что ежегодно количество открытых аллей возрастает (http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html).

В настоящее время в базе данных представлена следующая информация о генах, их аллелях, кодируемых ими протеинах и неэкспрессируемых аллелях (таблица 1).

Таблица 1 – Количество известных аллелей HLA по состоянию на март 2021 года (источник http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html)

| Аллели HLA | Количество |
|----------------------|------------|
| Аллели HLA I класса | 21,903 |
| Аллели HLA II класса | 8,136 |
| Всего аллелей HLA | 30,522 |

Необходимо отметить, что из всех известных классов HLA, наибольшего внимания заслуживают классические гены I и II класса HLA. К генам HLA I класса относятся HLA-A, HLA-B, HLA-C, расположенные на теломерном участке 6 хромосомы (рисунок 1), и кодирующие антигены тканевой совместимости, представленные на поверхности всех ядросодержащих клеток.

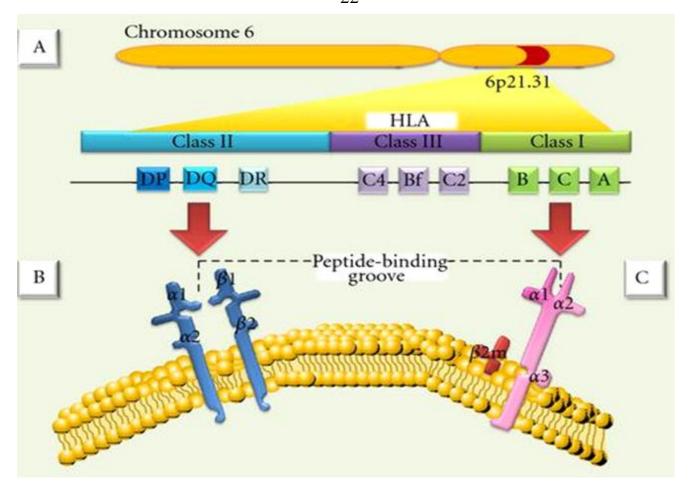


Рисунок 1 — Генетическая и пептидная организация генов HLA. A — организация локусов на уровне 6 хромосомы. В — организация генов и пептидов I класса HLA. С — организация генов и пептидов II класса HLA (García et al., 2012)

«Классические» гены I класса обладают высоким полиморфизмом. Изменчивость молекул HLA-A и HLA-B, HLA-C по большей части обусловлена различиями в аминокислотных последовательностях тяжелой альфа цепи (Marsh et al., 1999).

По своему строению классические и эмбриональные молекулы I класса представляют собой гетеродимеры, которые состоят из двух полипептидных цепей (легкой и тяжелой). Обе цепи имеют внеклеточный, трансмембранный и цитоплазматические участки. Аллоантигенный полиморфизм молекулы HLA I класса связан с α1- и α2-доменами α-цепи (тяжелая цепь). Между этими доменами находится участок, куда встраивается пептид (агретоп) для дальнейшей презентации этого комплекса Т-клеточному рецептору (Neefjes et al., 2011). Тем

самым, аллоантигенный полиморфизм молекул HLA I класса непосредственно связан с их распознающей агретоп функцией. Легкая или β цепь молекул I класса представлена β2-микроглобулином, кодирующий ген которого локализован в 15 хромосоме и не входит в состав комплекса HLA (Ярилин, 2010).

Основной функцией молекул HLA I класса является презентация процессированного антигена иммунокомпетентным клеткам. Данный феномен в иммунологии носит название «двойное распознавание». Т-клеточный рецептор распознает чужеродный антигенный эпитоп одновременно с распознаванием собственной молекулы HLA (Пол, 1987; Ярилин, 2010). Наибольшее значение молекулы HLA I класса играют при формировании иммунного ответа к внутриклеточным антигенам, в частности к вирусным антигенам. Вирусные встроенные первично распознаваемые молекулой I эпитопы, мембраны презентируются макрофагов, дендритных других антигенпрезентирующих клеток цитотоксическим Т-лимфоцитам, в состав Тклеточных рецепторов которых входит костимулирующая молекула СD8. Именно эта молекула имеет сродство к HLA I класса (Neefjes et al., 2011). В этот момент цитотоксические Т-лимфоциты становятся сенсибилизированными к вирусному антигену, и эффекторная субпопуляция антиген-специфического клона этих клеток начинает распознавать вирусные эпитопы, встроенные в молекулу HLA I класса на соматических (прежде всего эпителиальных) клетках. Данное распознавание заканчивается для инфицированных клеток «поцелуем смерти» – их цитолизом.

Классические молекулы I класса (HLA-A, HLA-B и HLA-C) являются главными молекулами тканевой совместимости, ограничивающими внутривидовые аллогенные трансплантации органов и тканей (Пол, 1989). Доминирование этих молекул связано с тем, что Т-клеточный рецептор реципиента непосредственно распознает молекулу HLA I класса на антигенпрезентирующей клетке (АПК, донорская клетка пассажир) с активацией цитоксического и киллерного иммунного ответа (последний возникает при распознавании неклассических HLA I класса), в то время как другие аллогенные

антигены проходят опосредованное распознавание через их презентацию аутологичными АПК (Neefjes et al., 2011). Факт участия АПК, аллогенных по отношению к лимфоцитам, в формировании иммунного ответа, проявляется в аллогенных смешанных культурах мононуклеаров, где несовместимость по HLA индивидуумов дает наиболее выраженный пролиферативный ответ по сравнению с другими локусами тканевой совместимости (Roelen et al., 2018).

Кроме того, молекулы HLA I класса, как мембранные молекулы, экспрессируемые на всех клетках организма, принимают участие в распозновании различных лигандов и переносу их в цитоплазму и органеллы клеток. В этом отношении более подробно изучены именно молекулы HLA I класса. Показано, что HLA-A и HLA-B обладают наиболее выраженной экспрессией молекул на мембране соматических и иммунокомпетентных клеток по сравнению с HLA-C. Помимо этого, также наблюдаются различия и в конечных мембранных продуктах. Так HLA-A и HLA-C лучше связываются с пептидным комплексом (PLC), в то время как HLA-B не обладает подобной способностью. Несмотря на это, связывание HLA-B с пептидом и их дальнейший транспорт в плазматическую мембрану происходит быстрее, чем у HLA-A и HLA-C (Klein et al., 2000; Li et al., 2010; Dyer et al., 2013).

Помимо «классических» генов (HLA-A, HLA-B и HLA-C) к I классу также принято относить так называемые «неклассические» гены — HLA-G, HLA-E и HLA-F. Показано, что молекула HLA-G в значительной степени экспрессируется на клетках трофобласта (Kovats et al., 1990). Однако последнии исследования показали, что данная молекула может экспрессироваться в роговице, а также в поджелудочной железе. Кроме того, увеличение уровня данной молекулы наблюдается при аутоимунных заболеваниях и вирусных инфекциях (Favier et al., 2007). Для молекулы HLA-E показана экспрессия на тех же клетках, что и для «классических» молекул I класса (Persson et al., 2020), в то время как HLA-F обнаруживается преимущественно в селезенке, тканях тимуса и плаценте (Lepin et al., 2000). Кроме того, известны некоторые их функции в постнатальный период. В частности, продукты генов HLA-E и HLA-G способны связываться с

антигенными пептидами, что способствует распознаванию антигенов NKклетками (Мейл и др., 2007).

Из всех трех «неклассических» молекул в развитии толерантности во время беременности активно изучается НLА-G. В настоящее время выделено семь различных изоформ HLA-G, образовавшихся в результате альтернативного сплайсинга (Carosella et al., 2000). Показано, что rs3174, располагающийся в 3 нетранслируемой области, влияет на уровень экспрессии гена и стабильность мРНК (Rousseau et al., 2003). Данная область является наиболее изучаемой в отношении развития патологий. Так, показаны ассоциации *HLA-G* 3'UTR 14-bp ins/del с репродуктивными потерями, осложнениями после трансплантации органов и тканей, болезнью Крона, артритом и так далее (Баклейчева и др., 2020). Однако большее количество работ посвящено изучению взаимосвзязи *HLA-G* 3'UTR 14-bp ins/del с репродуктивными потерями. Так, в исследованиях отмечается, что наличие *HLA-G* 14 bp ins/ins генотипа связано с привычным невынашиваем беременности (Hashemi et al., 2017; Amodio et al., 2020).

Гены HLA II класса располагаются ближе, чем HLA I и III классов, к центромерному участку 6 хромосомы, а продукты представляют собой гетеродимеры равнозначных α и β цепей (рисунок 2).

Строение молекул HLA II класса отличается от I класса прежде всего наличием двух гомологичных а и в цепей (Хаитов и др., 2016). Но, подобно антигенам первого класса, HLA II класса обладают высоким уровнем полиморфизма в а1 и в1 доменах соответствующих цепей, определяющих аллоантигенные различия индивидуумов. Кроме того, для генов HLA II класса выявлены микросаттелитные полиморфизмы в интронах, как правило детерминирующие эффективность и скорость экспрессии молекул на мембране иммунокомпетентных клеток (Foissac et al., 2000) (рисунок 2).

Гомологичные α и β пептидные цепи молекулы HLA II класса связаны между собой водородными связями (Klein, 2000), и каждая цепь имеет два внеклеточных домена — пептидсвязывающий домен (α 1 или β 1) и иммуноглобулин-подобный домен (α 2 или β 2), которые прочно фиксированы на

клетках с помощью трансмембранного участка молекулы (Маянский и др., 2006; Klein et al, 2000). Пептидсвязывающие α 1 или β 1 домены участвуют в образовании щели Бьёркмана, в которую вкладывается эпитоп, презентируемый Т-клеточному репецтору. Вариабельные последовательности аминокислот входят в состав доменов α 1 и β 1-цепей, причем наиболее полиморфен участок гена В, ответственного за синтез β 1-домена. Доказано, что α 2 и β 2 домены не имеют аллотипов (Маянский и др., 2006). Передача сигнала с α и β цепей в активационный внутриклеточный каскад также равнозначна.

Область HLA II класса представлена тремя локусами – HLA-DR, HLA-DQ и HLA-DP, которые кодируют молекулы, участвющие в презентации антигенных эпитопов различным субпопуляциям регуляторных Т-лимфоцитов (Ярилин, 2010; Holoshitz, 2013). В тоже время во II классе HLA существует еще ряд локусов, продукты которых не идентифицируются на мембране лимфоцитов – HLA-DO и HLA-DM (Pos et al., 2013). Взаимодействие через локусы HLA-DR, HLA-DQ и HLA-DP АПК с иммунорегуляторными лимфоцитами регулируется иммунным ответом как по клеточному, так и по гуморальному типу. Исходя из этих свойств молекул HLA II класса, кодирующие их гены обозначают как гены иммунного ответа (Ir — immune response). Кроме того, доказано, что молекула HLA-DR рестриктирует антигенный мостик между АПК и Т-хелперами, а HLA-DQ — между АПК и Т-цитоксическими и CD8+ субпопуляциями Т-регуляторных лимфоцитов (Goldberg et al., 2015).

Надо отметить, что имеются различия и в отношении аллельного полиморфизма в экзонах генов α и β цепей молекул HLA-DR, HLA-DQ и HLA-DP. Так, касаемо полиморфизма в экознах α и β цепей, показано, что у молекулы HLA-DR полиморфной является β цепь и соответствующий *HLA-DRB1* ген, а для молекулы HLA-DQ — обе цепи полиморфны за счет полиморфизма в генах *HLA-DQA* и *HLA-DQB1*.

II Антигены, контролируемые генами класса, экспрессируются клетках (АПК), преимущественно на антигенпрезентирующих таких как В-лимфоциты. макрофаги Однако, стимулировании И при цитокинами

(интерлейкин-4, у-интерферон, фактор некроза опухоли), действующими на регуляторные области, молекулы II класса экспрессируются на Т-лимфоцитах. Кроме того, возможна экспрессия этих молекул (опять же под высоким стимулирующим воздействием интерлейкина-4, у-интерферона, фактора некроза опухоли) на соматических клетках, например, эндотелиальных клетках сосудов, бэта-клетках островков Лангерганса (Gras et al., 2012).

В области генов III класса HLA сосредоточены С3 гены, связанные с функциями системы комплемента, гены фактора некроза опухоли (ФНО (TNF)), а также гены, которые кодируют белки теплового шока (HSP). Локализация данных генов связана с выполняемыми ими функциями, а именно обеспечением неспецифической защиты организма от чужеродных агентов без стадии распознавания генетически чужеродных агентов (Хаитов и др., 2016).

Процессинг и презентация АГ молекулами системы HLA является основой здоровья и болезней в человеческой популяции. По своей природе молекулы HLA являются мембранными гликопротеинами, которые связывают антигены и представляют их Т клеткам (Howell et al., 2010). В зависимости от того, к какому классу принадлежит молекула HLA, представление связанного пептида происходит определенным типам Т клеток. Так, молекулы I класса обеспечивают презентацию цитотоксическим Т клеткам CD8+ фенотипа. Предполагается, что основным источником пептидов для представления молекул I класса являются пептиды, процессированные в протеосоме из цитоплазмы. Протеосомы в организме необходимы для «разрезания» пептидов, длина которых составляет от 8 до 17 аминокислот (Shastri et al., 2002). В момент реализации иммунного ответа клетка, которая презентирует на своей поверхности антиген в комплексе с молекулами HLA I класса, подвергается атаке цитотоксическими CD8+ Тлимфоцитами.

В отличие от молекул I класса, молекулы II класса презентируют антигены Т-хелперным клеткам всех подтипов (1, 2, 3, 17 и др.) с CD4⁺ фенотипом. Молекулы HLA II класса представляют антигены экзогенного происхождения. Как правило, пептиды, которые связываются с молекулами II класса,

представляют собой части белков, которые были поглощены клеткой и через фаголизосому подвержены деградации последующим встраиванием нерасщепленного участка в молекулу HLA II класса (Мейл и др., 2007). Т-хелперы усиливают или угнетают антиген представляющие функции и содействуют дифференцировке пролиферации В-лимфоцитов И цитотоксических Т-клеток (Могилина, 2013). Как правило, тканевое HLA H распространение антигенов молекул класса ограничено иммунокомпетентными клетками, в том числе В-клетками, макрофагами, эндотелиальными клетками и активированными Т-лимфоцитами (Shankarkumar, 2004). Момент появления молекул II класса на других клетках свидетельствует об (Shankarkumar, 2004; Маянский активашии И др., 2006). физиологическая функция молекул HLA II класса, в отличие от HLA I класса, заключается в представлении антигенов экзогенного происхождения (главным образом инфекционных агентов) клетками иммунной системы для запуска иммунного ответа на них. Формирование в процессе эволюции системы генов II класса, выделение их из общих с І классом предковых генов и специализация вероятно, в результате возникла, действия инфекционного паразитарного окружения (Болдырева, 2007).

Как уже говорилось выше, особая роль комплекса HLA связана с контролем активности различных субпопуляций иммунокомпетентных клеток. Это сказывается на качестве иммунного ответа к различным экзогенным и эндогенным антигенам. Эффективность иммунных ответов к различным антигенам будет определять здоровье и болезни индивидуума (Хаитов и др., 1998). С этих позиций локус HLA с конца прошлого века исследуют в контексте ассоциаций с различными хроническими заболеваниями, а данное направление получило название «HLA и болезни». Так, в 1960-х годах было открыто, что у мышей МНС контролирует как генетическую предрасположенность к лейкемии, так и иммунный ответ. Открытие, что гены специфического иммунного ответа могут находиться в H-2 регионе мыши, стимулировало поиск ассоциаций HLA и болезней, основанных на различиях иммунного ответа, играющих роль в болезнях

иммунной или аутоиммунной этиологии. Влияние молекул МНС на реактивность к АГ наиболее отчетливо проявляется в опытах на экспериментальных животных. Однако положительные ассоциации между НLА-фенотипом и особенностями иммунного ответа известны и для человека (Маянский и др., 2006). В настоящее время существует огромный список HLA-ассоциированных болезней. Больше всего ассоциаций получено между аллелями и генотипами генов HLA II класса с одной стороны, и иммуновоспалительными заболеваниями с другой.

В период с 1970 по 1990 года исследователи активно сосредоточились на изучении связи молекул системы HLA с восприимчивостью и резистентностью к инфекционным заболеваниям. В ходе исследований был установлен ряд ассоциаций с данным спектром заболеваний, однако наиболее изученными из всех остаются проказа, малярия и хронический вирусный гепатит (Blackwell et al., 2009). Несмотря на большое количество найденных ассоциаций, все исследования имели ряд ограничений, связанных с объемом выборки и так далее (Меуег et al., 2018).

Помимо взаимосвязи со многими инфекционными заболеваниями, в последнее десятилетие активно ведется изучение аутоиммунных заболеваний, связанных с системой НLА. Так, показан вклад аллелей НLА в развитие ревматоидного артрита (РА). По данным литературы вклад НLА в восприимчивость к РА составляет 50 % (Barton et al., 2009). Также в ряде работ установлено, что генотипы *HLA-DRB1* * *0401* и *HLA-DRB1* * *0404* ассоциированы с повышенным риском развития данного заболевания (Hughes, 2008; Bodis et al., 2018).

Кроме того, на сегодняшний день есть работы, подтверждающие наличие ассоциаций генотипов *HLA-DRB1* с рассеянным склерозом (Bove et al., 2016; Michalik et al., 2016; Gianfrancesco et al., 2018;). В ранее опубликованных работах говорится об ассоциации генов HLA II класса с такими иммунозависимыми заболеваниями, как аутоиммунный тиреодит Хашимото и сахарный диабет 1 типа (Antonelli et al., 2015; Urrutia et al., 2017; Ramgopal et al., 2018).

Особое внимание среди патологий, ассоциированных с молекулами главного комплекса гистосовместимости, уделяется влиянию системы HLA на развитие эмбриона в период эмбригенеза. Исследования о вкладе молекул HLA в развитие плода начались еще в 60-х годах прошлого столетия (Болдырева, 2007). В период с 60-х до 70-х годов неоднократно публиковались работы, подтверждающие, что достоверно чаще рождаются дети, наследующие отцовские HLA. Такое антигены явление В литературе получило «гистонесовместимая беременность» (Christiansen, 1996; Klein et al., 2000). Гистонесовместимая беременность является важным условием для имплантации и роста плода.

Дальнейшие исследования в области репродукции сосредоточены в основном на изучении невынашивания беременности, повторного прерывания беременности, а также бесплодия неясного генеза (Agnaeva et al., 2015).

Таким образом, молекулы HLA системы, обладая высоким полиморфизмом, выполняют различные функции, такие как антигенные ограничения тканевой совместимости, контролирование иммунного ответа на экзогенные и эндогенные антигены, детерминирование иммуновоспалительных заболеваний, участие в иммунных взаимодействиях в системе «мать-плод».

1.3. HLA детерминирование иммунных взаимодействий в системе «мать- плод»

Иммунологические взаимоотношения в системе мать-плод изучаются с 1950 годов. Тем не менее, на сегодняшний день остается много вопросов касаемо механизмов, лежащих в основе этого процесса (Сухих и др., 2005; Tilburgs et al., 2015).

Как уже говорилось выше, иммунные взаимодействия «мать-плод» могут влиять на селекцию HLA в пренатальный период и воздействовать на адаптационные процессы в раннем онтогенезе.

Известно, что физиологическая беременность вызывает у женщин колоссальную перестройку всех систем организма и формирование механизмов адаптации к присутствующему эмбриону, что повышает чувствительность к различным неблагоприятным факторам, которые способствуют развитию перинатальной патологии (Иванов и др., 2012). Становление адаптационных реакций новорожденного напрямую зависит от иммунологических взаимосвязей организмом беременной плодом. Различные И нарушения иммунологического ответа материнского организма неблагоприятно влияют на процесс раннего онтогенеза, что впоследствии вызывает развитие патологий или прерывание беременности (Чистякова, 2005).

Формирование зиготы и дальнейшее развитие плода происходит из яйцеклетки, оплодотворенной сперматозоидом и сочетающей в себе ДНК как матери, так и отца. Клетки плода сами экспрессируют собственные белки и иммунные агенты, которые вступают во взаимодействие с компонентами иммунной системы матери, начиная с самых ранних этапов онтогенеза (Липатов и др., 2016).

Исход беременности во многом зависит от иммуннорегуляторных механизмов, необходимых для развития иммунного ответа материнского организма на полуаллогеный плод. Унаследованные эмбрионом НLА антигены отца вызывают активацию материнской иммунной системы, и в плацентарное русло рекрутируются различные клетки иммунной системы для обеспечения беременности. Немаловажную роль в успешном протекании беременности играют регуляторные CD4⁺ Т-лимфоциты (Tregs) (Craenmehr et al., 2019). Стоит отметить, что при трансплантации органов соответствие по HLA-DR приводит к лучшей выживаемости (Opelz et al., 1999).

Исследование Craenmehr, опубликованное в 2019 году, показало, что несовместимость одного антигена HLA-DR между матерью и плодом приводит к запуску и активации иммунного воспаления (Craenmehr et al., 2019). Установлено, что во время беременности повышенное количество CD4⁺ Tregs действительно

присутствует в децидуальной оболочке и способствует регуляции специфичных в отношении аллогенных антигенов плода реакций (Tilburgs et al., 2008).

Сами по себе клетки трофобласта не экспрессируют молекулы HLA-DR, однако, химерные клетки плода могут проникать через планцетарный барьер, тем самым активируя материнский иммунный ответ. Стоит отметить, что данный процесс является двунаправленным (Adams et al., 2004). Это означает, что через плацентарный барьер могут перемещаться как материнские клетки, так и клетки эмбриона, которые в свою очередь также могут реагировать на материнские аллоантигены (Craenmehr et al., 2019).

Некоторые исследования ассоциаций посвящены поиску между осложнениями беременности И наличием определенных аллелей HLA, материнской гомозиготностью или наличием схожих аллелей в генотипах семейных пар, матерей и плодов. Недавний мета-анализ Meuleman et al. (2015) показал, что наличие общих аллей в генотипах исследуемых пар связано с невынашиванием беременности, что согласуется с полученными ранее данными о том, что общие аллели у матери и плода, как правило, ассоциированы с осложнённой беременностью и пороками развития плода (Hoff et al., 1993; de Luca Brunori et al., 2003;).

Принимая во внимание тот факт, что эмбрион является полуаллогенным по отношению к материнскому организму, не исключена возможность иммунного конфликта между ними с последующим нарушением онтогенеза и, как следствие, развитием различных патологий плода (Erlebacher, 2013). Так, показано, что у спонтанных абортусов в семейных парах, совпадающих по HLA-генотипу, в 98 % случаев обнаруживались фенотипические проявления порока развития или хромосомные нарушения (Meuleman et al., 2015; Kutteh et al., 2019; Craenmehr et al., 2019). Кроме того, стоит отметить, что в изолированных популяциях наблюдается вынашивание беременности без эмбриональных нарушений даже при полном совпадении супругов по аллелям HLA (Ober, 1999). Соответственно, спонтанно прерванная беременность или рождение ребенка с пороком развития, в

частности с ВПС, является проявлением нарушений в раннем онтогенезе и конфликта в системе «мать-плод».

Стоит отметить, что HLA-DR⁺ химерные материнские клетки плода будут взаимодействовать с развивающейся эмбриональной иммунной системой, что приводит к созданию большого пула Tregs плода (Mold et al., 2008).

Наиболее оптимальным условием для успешного протекания беременности является взаимная аллогенность HLA-DR, что говорит о важности активной индукции иммунной толерантности, как со стороны матери, так и со стороны плода.

Резюме

В области НLА II класса находятся гены, детерминирующие рестрикцию презентирующихся Т-хелперным лимфоцитам различных типов. Благодаря этому регулируются сила и эффективность иммунных ответов на действие ксено- и эндобиотиков (ксено-, алло- и изоантигенам). Феномен кодоминантного наследования дает возможность индивидуумам расширять эффективность презентации различных антигенов. Соответственно, процессы, возникновение направленные на гомозиготности В гене *HLA-DRB1* последующих поколений, будут приводить к иммунной дезадаптации популяции к инфекционным и неинфекционным факторам макро- и микроэкологии.

При рассмотрении раннего онтогенеза как периода формирования органов и систем индивидуума, был сделан акцент на ВПС. Данная патология формируются в эмбриональном периоде с 2 по 8 неделю гестации. Частота ВПС остается высокой в популяциях мира и достигает 1 % от всех новорожденных. ВПС являются ведущей причиной перинатальной и младенческой смертности. Мероприятия, направленные на уменьшения детской смертности, не уменьшают удельный вес ВПС в этом показателе. Это указывает на стойкие популяционные механизмы, приводящие к формированию данной патологии.

Значимость локуса *HLA-DRB* в формировании ВПС можно рассматривать с нескольких позиций. Прежде всего, это иммунные взаимодействия в системе «мать-плод», определяющие компенсированность иммунного конфликта и Также иммунного воспаления В данной системе. доказана роль трансплацентарных инфекций в формировании ВПС, прежде всего, в отношении вируса краснухи. Тем самым, локус HLA-DRB может детерминировать данные процессы как со стороны матери, так и со стороны плода. Последнее связано с отцовским локусом HLA-DR.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

Диссертационное исследование одобрено локальными этическими комитетами Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-Федерального сосудистых заболеваний» И государственного бюджетного учреждения высшего образования «Кемеровский государственный университет».

Все участники подписывали информированное согласие на собственное участие и участие своих детей в этом научном исследовании, в том числе и на проведение генетического и иммунологического тестирований.

Исследование выполнено в рамках аспирантуры на биологическом факультете Кемеровского государственного университета и научно-исследовательской темы «Разработка инновационных подходов в прогнозе, диагностике, лечении и реабилитации врожденных пороков сердца у детей в Кузбасском регионе» Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний».

2.1 Характеристика исследуемых групп

В исследование включено несколько групп.

Основная группа включала женщин, имеющих детей с ВПС (n=103), их супругов (мужчин, n=59), а также их детей (n=103) с установленным диагнозом ВПС. Средний возраст женщин составил 26 лет (от 18 до 48 лет), мужчин – 27 лет (от 19 до 53 лет), детей – 6,2 года (от 5 до 8 лет). Набор основной группы проводился в детском кардиологическом отделении ГБУЗ КО Кузбасского областного клинического кардиологического диспансера имени академика Л.С. Барбараша, где дети проходили лечение.

Критериями включения в основную группу исследования для детей были:

- наличие установленного диагноза ВПС;
- средний возраст детей от 1 месяца до 18 лет;
- отсутствие сопутствующих патологий, включая генетические и хромосомные заболевания.

Критериями исключения из основной группы исследования для детей были:

- отсутствие установленного диагноза;
- наличие ВПС в сочетании с другими патологиями, включая генетические и хромосомные заболевания;
- возраст старше 18 лет;
- нежелание родителей принимать участие в исследовании.
 Фенотипы пороков в группе детей представлены в таблице №2.

Таблица 2 – Распределение фенотипов врожденных поркоов сердца

| Фенотип | N (%) |
|----------------------------------|------------|
| Дефект межпресердной перегородки | 23 (22,33) |
| (ДМПП) | |
| Дефект межжелудочковой | 21(20,39) |
| перегородки (ДМЖП) | |
| Открытый артериальный проток | 16 (15,53) |
| (ОАП) | |

Продолжение таблицы 2

| Тетрада Фалло (ТФ) | 7 (6,80) |
|---|----------|
| Критический стеноз легочной артерии | 7 (6,80) |
| Двойное отхождение магистральных сосудов (ДОМС) | 6 (5,83) |
| Двустворчатый АК | 5 (4,85) |
| Коартктация аорты (КоА) | 4 (3,88) |
| Единый желудочек сердца (ЕЖС) | 4 (3,88) |
| Тотальный аномальный дренаж вен (ТАДЛВ) | 2(1,94) |
| Открытый атриовентрикулярный канал (ABK) | 2 (1,94) |
| Дисплазия ТК | 2 (1,94) |
| Аномалия Эбштейна | 2 (1,94) |
| Транспозиция магистральных сосудов (TMC) | 1 (0,97) |
| Стеноз аортального клапана | 1 (0,97) |

Контрольная группа была сформирована из матерей (n = 132), отцов (n = 132) и их детей без ВПС (n = 132). Средний возраст женщин и детей составил 27 лет (от 18 до 47 лет) и 5 лет (от 4 до 8 лет), соответственно. Группа формировалась на базе педиатрических клинических баз Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кемеровского государственного медицинского университета» МЗ

РФ. Всем детям контрольной группы была проведена эхокардиография для исключения ВПС.

Критериями включения в контрольную группу были:

- отсутствие установленного диагноза ВПС, ревматоидного артрита, аутоиммунных заболеваний;
- возраст детей от 1 месяца до 18 лет;
- отсутствие сопутствующих патологий, включая генетические и хромосомные заболевания.

Критериями исключения из основной группы исследования для детей были:

- наличие ВПС в сочетании с другими патологиями, включая генетическими;
- возраст более 18 лет;
- нежелание родителей принимать участие в исследовании.

Подробная характеристика матерей основной и контрольной групп представлена в таблице 3.

Таблица 3 – Характеристика матерей исследуемых групп

| Анамнез | Контрольная группа | Основная группа |
|-----------------------|--------------------|-----------------|
| Анамнез | (n=132) | (n=103) |
| Курение | 10 (7,57) | 17 (16,50) |
| Алкоголизм | 0 | 1 (0,97) |
| Наркомания | 0 | 0 |
| Хронические вирусные | 0 | 9 (8,73) |
| инфекции | | |
| Краснуха во время | 0 | 0 |
| бременности | | |
| Принимаемые | 0 | 10 (9,70) |
| медикаменты | | |
| Сахарный диабет у | 0 | 1 (0,97) |
| матери | | |
| Заболевания сердечно- | 0 | 7 (6,79) |
| сосудистой системы | | |

Для проведения иммунологических исследований отобрана 21 семейная пара, имеющая детей с ВПС и 21 семейная пара, имеющая детей без ВПС.

2.2 Молекулярно-генетические методы исследования

Выделение геномной ДНК. У родителей и детей, поступивших на госпитализацию в детское отделение Государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Кузбасский клинический кардиологический диспансер им. Л.С. Барбараша», проводили сбор венозной крови из локтевой вены в пробирку, содержащую К₃EDTA (3-х замещенная калиевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты). Затем кровь аликвотировали в пробирки типа Эппендорф объемом 1,5 мл по 700 мкл и хранили при температуре -70°С до момента выделения ДНК.

Перед выделением ДНК кровь размораживали при комнатной температуре в течение часа. ДНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции по стандартному протоколу. На начальном этапе проводили лизис клеток путем добавления 270 мкл 0,2 М ацетата натрия к образцу, полученный осадок хорошо ресуспендировали на вортексе и затем добавляли 30 мкл 10 % SDS (додецил сульфат натрия). После чего к полученной смеси добавляли протеиназу «К» и термостатировали образцы при 55°C в течение 3 часов либо при температуре 37°C в течение ночи. По окончании инкубации во все образцы добавляли по 500 мкл смеси фенол-хлороформ, приготовленной в соотношении 1:1, с добавлением изоамилового спирта для избегания пенообразования. Тщательно перемешивали в течение 10 минут на ротамиксе, а затем центрифугировали в течение 20 минут. жидкость переносили в чистую Полученную надосадочную пробирку и проводили осаждение ДНК спиртом разной концентрации. Полученную ДНК растворяли в деонизированной воде в объеме 50 мкл.

Качество экстрагированной ДНК оценивали при помощи спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermofisher scientific, США) путем определения оптической плотности раствора ДНК в области белкового и нуклеинового спектров поглощения. При оценке чистоты, полученной ДНК, использовали 2 показателя. Первый показатель – это отношение поглощения при длинах волн 260 нм и 280 нм (260 нм/280 нм), если отношение приближалось к 1,8, то образец считали чистым. Еще один показатель – это отношение значений поглощения 260 нм/230 нм, если значение данного показателя варьировалось от 1,8 до 2,2, то образец также считался чистым. Средняя концентрация выделенной ДНК из образцов крови была в пределах 200 нг/мкл. Полученные образцы хранили при температуре -20°C, до проведения генотипирования.

Проведение генотипирования. В рамках исследования проводили генетическое типирование аллелей гена *HLA-DRB1* коммерческими наборами тест-систем HLA-ДНК-ТЕХ (ДНК-технология, Россия) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с учетом результатов в режиме реального времени на приборе ДТ-96 (ДНК-технология, Россия) согласно инструкции производителя.

Программа амплификации включала в себя следующие этапы, представленные в таблице 4.

Таблица 4 – Программа амплификации ДНК

| Номер | Температура | Время | | Количество циклов |
|-------|-------------|----------|-----|----------------------|
| блока | томпоратура | МИН | сек | TOSIN ICCIDO MIRSIOD |
| 1 | 80,0 | 2 | 00 | 1 |
| 1 | 94,0 | 5 | 00 | 1 |
| 2 | 94,0 | 0 | 30 | 5 |
| | 64,0 | 0 | 15 | |
| 3 | 94,0 | 0 | 10 | 45 |
| | 64,0 | 0 | 15 | |
| 4 | 94,0 | 0 | 5 | 1 |
| 5 | 25,0 | 0 | 30 | 1 |
| 6 | 25,0 | 0 | 15 | 50 |
| 7 | 10,0 | Хранение | | Хранение |

По завершении программы амплификации на экране монитора отображались результаты проведенного генотипирования, как представлено на рисунке 2.

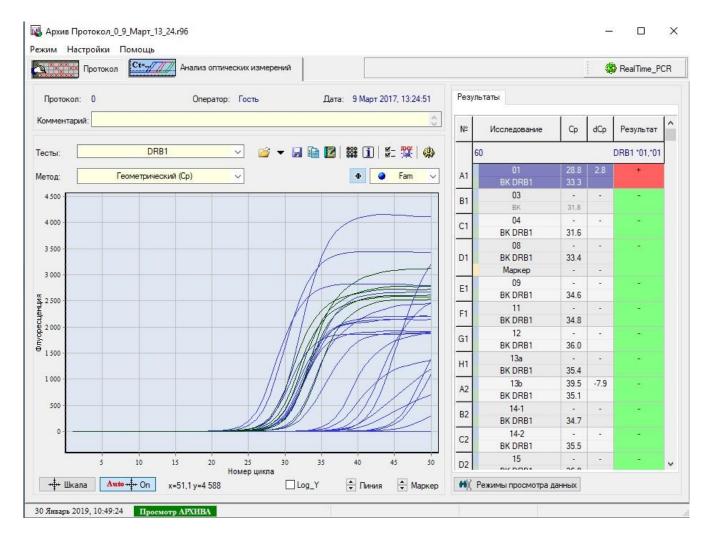


Рисунок 2 – Изображение результатов ПЦР анализа

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 % агарозном геле (рисунок 3).

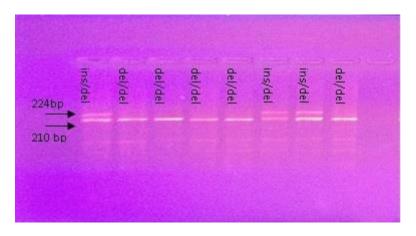


Рисунок 3 – Детекция результатов ПЦР в 3 % агарозном геле.

Оценку качества генотипирования проводили посредством повторного генотипирования 10 % образцов, взятых из общей выборки исследуемых. Воспроизводимость результатов составила 100 %.

2.3. Иммунологические методы исследования в системе «мать-плод»

Определение иммунного ответа женских лимфоцитов на мужские лимфоциты через оценку экспрессии молекулы HLA-DR на их мембране, проводили на основе разработанного ранее метода (Чистякова и др., 2016). Дизайн проведения СКЛ и выведения коэффициентов представлен на рисунке 4.

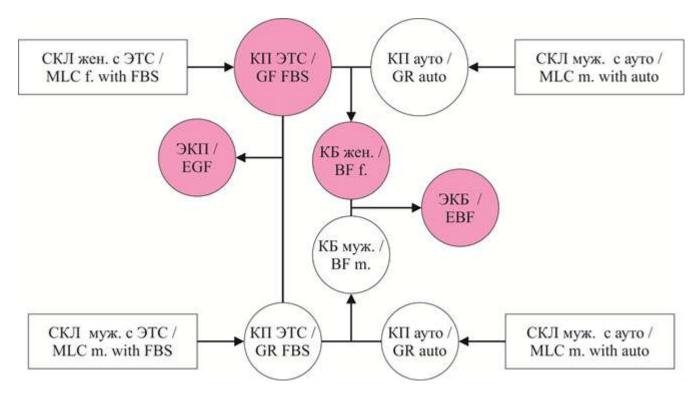


Рисунок 4 – Дизайн проведения смешанной культуры лимфоцитов

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.

Все работы, касаемые подготовки краткосрочной смешанной культуры лимфоцитов супругов, проводились 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 двухкратной отмывки, женские и мужские лимфоциты окрашивали моноклональными антителами к CD45 (Biolegend, США). Для женских лимфоцитов использовали антитела, конъюгированные с флуоресцентным красителем перидинин-хлорофиллом (РС-

5), а для мужских - PC-7 (Biolegend, США). Далее пробирки с женскими и мужскими лимфоцитами и с соответствующими конъюгатами моноклональных антител с флуоресцентными красителями инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре в темноте. После однократной отмывки в пробирки женских и мужских лимфоцитов вносили по 1000 мкл полной среды (RPMI-1640 с 15 % эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС) (Gibco (Thermo Fisher Scientific), США), L-глютамина (Panreac, Испания) из расчета 2 ммоль, 10 ммоль Hepesбуфера (Sigma, США), 5*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 10 % женскую аутосыворотку. 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 двенадцать 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. Все постановки проводились в дублях. Первые две пробирки (№ 1 и № 2) предназначены для смешанной культуры лимфоцитов (СКЛ), поэтому в каждую пробирку (№ 1 и № 2) вносили и смешивали лимфоциты мужчины и женщины в общем объеме по 100 мкл (конечный объем 200 мкл). В пробирки № 3 и № 4 вносили лимфоциты (200 мкл) женщины, и это была монокультура лимфоцитов женщин. В пробирки № 5 и № 6 вносили лимфоциты (200 мкл) мужчины (супруга) – монокультура лимфоцитов мужчины. Аналогичную процедуру проводили для лимфоцитов с добавлением 10 % аутосыворотки. Пробирки № 7 и № 8 – СКЛ с добавлением 10 % аутосыворотки; № 9 и № 10 – женская монокультура с 10 % женской аутосывороткой и № 11 и № 12 — мужская монокультура с 10 % женской аутосывороткой. Далее, закрытые пробирки помещали в СО2-инкубатор на 2 часа при 37°C. После окончания инкубации, проводили однократную отмывку лимфоцитов Ha каждой пробирке. В окончательном 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, CША) и HLA-DR (Biolegend, США), их добавляли в каждую пробирку по 5 мкл. Соотношение объема антител к количеству лимфоцитов, а также время и температура инкубаций соответствовали прилагаемым инструкциям к каждому конъюгированному моноклональному антителу. Инкубирование проводились в течение 15 минут при комнатной температуре в темноте. После окончательной отмывки в каждую пробирку вносили 300 мкл фиксатора OptiLyse (Beckman coulter, США).

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

Для снятия результатов 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 смешанной культуре лимфоцитов, так и в монокультурах. Для каждой женской и мужской субпопуляции лимфоцитов рассчитывали коэффициент прироста (КП) – удельный вес анализируемой субпопуляции лимфоцитов в смешанной культуре по отношению к ее удельному весу в соответствующей монокультуре:

 $K\Pi_{CD3} + HLA-DR+ = ((CD3+HLA-DR^+_{CK7} - CD3+HLA-DR^+_{KOH.}) \times 100) / CD3+HLA-DR^+_{KOH.}$ где: CD3+HLA-DR+ относительное число субпопуляции CD3+HLA-DR+ в смешанной культуре лимфоцитов, %; $CD3^{+}HLA$ - DR^{+}_{KOH} . —относительное число субпопуляции $CD3^{+}HLA$ - DR^{+} в монокультуре анализируемого донора, %;

 $K\Pi_{CD3\text{-}HLA\text{-}DR^+} = ((CD3\text{-}HLA\text{-}DR^+_{c\kappa\pi} - CD3\text{-}HLA\text{-}DR^+_{\kappaon.}) \times 100) / CD3\text{-}HLA\text{-}DR^+_{\kappaon.}, где:$ CD3-HLA-DR $^+_{c\kappa\pi}$ — относительное число субпопуляции CD3-HLA-DR $^+$ в смешанной культуре лимфоцитов, %; CD3-HLA-DR $^+_{\kappaon.}$ —относительное число субпопуляции CD3-HLA-DR $^+$ в монокультуре анализируемого донора, %;

 $K\Pi_{CD45+HLA-DR^+} = ((CD45^+HLA-DR^+_{CKR} - CD45^+HLA-DR^+_{KOH.}) \times 100) / CD45^+HLA-DR^+_{KOH.}$ где: CD45⁺HLA-DR⁺_{CKR} – относительное число субпопуляции CD45⁺HLA-DR⁺ в смешанной культуре лимфоцитов, %; CD45⁺HLA-DR⁺_{KOH.} – относительное число субпопуляции CD45⁺HLA-DR⁺ в монокультуре анализируемого донора, % (рисунок 1, 2, 3).

Кроме коэффициента прироста также оценен блокирующий эффект (коэффициент блокирования — КБ) женской аутосыворотки клеточных взаимодействий в СКЛ, который 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:

$$KE = ((K\Pi_{CKЛB} - K\Pi_{CKЛB}) \times 100) / |K\Pi_{CKЛB}|,$$

где: К $\Pi_{\text{скла}}$ – коэффициент прироста в СКЛ с 10 % женской аутосывороткой; К $\Pi_{\text{склэ}}$ – коэффициент прироста в СКЛ в полной ростовой среде с ЭТС; $|\text{К}\Pi_{\text{склэ}}|$ - 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.

Помимо этого, проводили сравнение 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 сенсибилизированы к женским молекулам тканевой совместимости, а женские растворимые сывороточные факторы не имеют тропизма к клеточным реакциям мужских лимфоцитов к женским, и, соответственно, принимали реакции мужских лимфоцитов к женским как

контрольные для данной семейной пары. Соответствующие коэффициенты обозначали как эффективный коэффициент прироста (ЭКП) и эффективный коэффициент блокирования (ЭКБ). Общая формула эффективных коэффициентов выглядела следующим образом:

$\Im K\Pi(E) = ((K\Pi(E)_{\mathcal{K}} - K\Pi(E)_{\mathcal{M}}) \times 100) / |K\Pi(E)_{\mathcal{M}}|,$

где: $K\Pi(E)_{\mathbb{H}}$ — коэффициент прироста или блокирования в клеточных реакциях «женщина против мужчины»; $K\Pi(E)_{M}$ — коэффициент прироста или блокирования в клеточных реакциях «мужчина против женщины»; $|K\Pi(E)_{M}|$ — модуль коэффициента прироста или блокирования в клеточных реакциях «мужчина против женщины».

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

2.4. Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных проводили при помощи стандартных статистических методов при помощи пакета программ Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США).

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 (Ме), 25-го (LQ) и 75-го (UQ) процентилей.

Для выявления основных иммунологических факторов риска формирования ВПС использовали кластерный и факторный анализ. Для определения соответствия наблюдаемых частот генотипов генов HLA-DRB1 и HLA-G равновесному распределению Харди-Вайнберга использовали χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность (Гланц, 1998). Об ассоциации аллелей и генотипов с предрасположенностью к ВПС судили по величине отношения

шансов (ОШ), рассчитанной по методу Вульфа-Холдейна, который допускает расчеты по таблице 2x2 для случаев, когда одна из ячеек имеет значение 0 при помощи программы GrafPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software, USA). При ОШ = 1 судили об отсутствии каких-либо ассоциаций; если ОШ > 1, то говорили о наличии положительной ассоциации и болезни; ОШ < 1 — означало наличие отрицательной взаимосвязи с заболеванием.

Для оценки наследования аллелей гена *HLA-DRB1* применяли TDT тест (transmission disequilibrium test). Данный тест позволяет оценивать количество переданных и непереданных аллелей «риска» потомству (Sham et al., 1995).

Анализ взаимодействий межаллельных проводили помощи программы MDR v.3.0.2. Данная программа обладает возможностью построения таблиц сопряженности, позволяющих оценивать генотипы высокого риска (темно-серые ячейки) и протективные генотипы (светло-серые ячейки) и их комбинации на основе оценки вклада каждого конкретного генотипа (или их комбинации). Кроме этого, метод MDR позволяет оценивать такие параметры моделей, как точность классификации (Асс. – отношение верно определенных групп «случай» и «контроль» к общему числу наблюдений), чувствительность модели (Se. – доля истинно положительных случаев), специфичность модели (Sp. – доля истинно отрицательных случаев), сбалансированная точность (Bal. Acc. = (Sp + Se) / 2), и точность модели (число верно классифицированных положительных и отрицательных случаев).

ГЛАВА З РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Сравнительная характеристика распределения частот 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 (таблица 5; p<0,05).

Таблица 5 – Частота генотипов *HLA-G* 3'UTR 14-bp ins/del в исследуемых группах

| | Частота генотипа | | | | | | | |
|-----------------------|------------------|------|------|------|------|------|--------------------|--|
| Группа | D/D | | I/D | | I/I | | p x _B * | |
| | Абс. | % | Абс. | % | Абс. | % | | |
| Вся выборка | 84 | 37,3 | 114 | 50,7 | 27 | 12,0 | 0,41 | |
| Основная группа | 44 | 43 | 51 | 49 | 8 | 8 | 0,19 | |
| Контрольная группа | 36 | 35 | 53 | 53 | 12 | 12 | 0,25 | |

Примечание: хв – уравнение Харди-Вайнберга

При анализе возрастного состава женщин наблюдаемых групп не обнаружено статистически значимых различий (р > 0,05). Таким образом можно

предположить, что возраст матерей не являлся дополнительным ограничительным критерием для генетического сопоставления исследуемых групп. Сравнение частот аллелей и генотипов в группе женщин, родивших детей с ВПС и в группе контроля, не выявило значимых различий по пяти моделям наследования (таблица 6).

Таблица 6 – Частоты генотипов *HLA-G* 3'UTR 14-bp ins/del в основной и контрольной группах

| Модель наследования | Генотип | Контрольная Основная группа (n=101) (n=103) | | ОШ (95% ДИ) | p |
|------------------------|---------|---|-------------|--------------------|------|
| | D/D | 36 (35.6 %) | 44 (42.7 %) | 1.00 | |
| Кодоминантна я | I/D | 53 (52.5 %) | 51 (49.5 %) | 0.79 (0.44 – 1.41) | 0.44 |
| | I/I | 12 (11.9 %) | 8 (7.8 %) | 0.55 (0.20 – 1.48) | |
| Доминантная | D/D | 36 (35.6 %) | 44 (42.7 %) | 1.00 | 0.3 |
| | I/D-I/I | 65 (64.4 %) | 59 (57.3 %) | 0.74 (0.42 – 1.31) | |

Продолжение таблицы 6

| Рецесивная | D/D-I/D | 89 (88.1 %) | 95 (92.2 %) | 1.00 | 0.32 |
|--------------------|---------|-------------|-------------|--------------------|------|
| | I/I | 12 (11.9 %) | 8 (7.8 %) | 0.62 (0.24 – 1.60) | 0.52 |
| Сверхдоминан тная | D/D-I/I | 48 (47.5 %) | 52 (50.5 %) | 1.00 | 0.67 |
| | I/D | 53 (52.5 %) | 51 (49.5 %) | 0.89 (0.51 – 1.54) | 0.07 |
| Лог- аддитивная | | | | 0.76 (0.49 – 1.17) | 0.21 |

3.2. Оценка патогенеческих и протекторных аллелей *HLA-DRB1* в семьях, имеющих детей с врожденными пороками сердца

Целью данного этапа исследования стало выявление роли гена *HLA-DRB1* в детерминировании риска формирования ВПС.

Проведенный генетический анализ показал, что частота аллелей и генотипов *HLA-DRB1* во всей выборке, без разделения на группы, соответствовала популяционному равновесию Харди-Вайнберга.

Для реализации поставленной задачи провели сравнение распределения частот аллелей гена *HLA-DRB1* в исследуемых группах. В данном сравнении участвовали следующие группы: родители, имеющие детей с ВПС (основная группа), родители, имеющие условно здоровых детей (контрольная группа). Данные представлены в таблице 7.

Как видно из таблицы 7, лишь для трех частот аллелей обнаружены статистически значимые различия.

Так, HLA-DRB1*09 чаще встречался в контрольной группе семей, имеющих здоровых детей, чем в основной группе (родители, чьи дети имеют ВПС, p = 0.01)

Относительно аллеля HLA-DRB1*10, в основной группе его частота встречаемости была выше, чем в контрольной группе (p = 0,03).

В основной группе частота аллеля HLA-DRB1*12 была ниже, чем в контрольной группе (p = 0,01).

Аллели *HLA-DRB1*09* и *HLA-DRB1*10* с позиции их частоты встречаемости в популяции являются минорными. Это распространяется на все популяции мира, где частота этих аллелей не превышает 2 % (https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/). Эти данные, с учетом данных популяционного равновесия Харди-Вайнберга, указывают на равновесие основных (мажорных) частот аллелей в высоко полиморфном локусе HLA-DR вне зависимости от кластеризации выборки по группам и на отсутствие выраженных факторов динамики в исследуемой когорте индивидуумов, таких как миграция, изоляция, дрейф генов, инбридинг. Тот факт, что в основной группе частота встречаемости *HLA-DRB1*10* выше, чем в

контрольной группе, указывает на роль данного родительского аллеля в развитии риска формирования ВПС в последующем поколении. Напротив, факт увеличения частоты встречаемости аллеля *HLA-DRB1*09* в контрольной группе (родители, имеющие условно-здоровых детей) по отношению как к основной группе, указывает на его особую протективную роль в отношении риска формирования ВПС.

Таблица 7 – Распределение аллелей *HLA-DRB1* в обследованных группах родителей (%)

| Аллели <i>HLA-DRB1</i> | Контрольная группа родителей (n = 528) | Основная группа родителей (n = 384) | p |
|---------------------------|---|--|----------------------|
| HLA-DRB1*01 | 14,39 | 11,06 | > 0,05 |
| HLA-DRB1*03 (17) | 9,47 | 10,10 | > 0,05 |
| HLA-DRB1*04 | 11,93 | 12,98 | > 0,05 |
| HLA-DRB1*07 | 9,28 | 12,98 | > 0,05 |
| HLA-DRB1*08 | 6,43 | 3,85 | > 0,05 |
| HLA-DRB1*09 | 4,16 | 0,96 | = 0,01* |
| HLA-DRB1*10 | 0,18 | 1,44 | = 0,03* OⅢ = 6,04 |
| HLA-DRB1*11 | 10,98 | 12,98 | > 0,05 |
| HLA-DRB1*12 | 5,49 | 1,92 | = 0,01* |
| HLA-DRB1*13 | 9,84 | 13,94 | > 0,05 |
| HLA-DRB1*14 | 2,84 | 2,40 | > 0,05 |
| HLA-DRB1*15 | 11,74 | 13,46 | > 0,05 |
| HLA-DRB1*16 | 3,22 | 1,92 | > 0,05 |

Примечание: * – отмечен р-уровень со значимыми различиями, n – количество полученных аллелей у родителей.

Для уточнения роли материнских и отцовских аллелей *HLA-DRB1* в предрасположенности к развитию ВПС в последующем поколении, провели сравнение частоты встречамости аллелей гена *HLA-DRB1* у мужчин из группы исследования и контрольной группы, а также у женщин в изучаемых группах. Сранения проводили по принципу «случай-контроль», где группы матерей и

отцов, имеющих детей с ВПС, выступали в качестве основных групп, а родители, имеющих условно здоровых детей – контрольных (таблица 8).

Таблица 8 – Сравнительная характеристика аллелей гена *HLA-DRB1* в основной и контрольной группах женщин

| Аллели <i>HLA-DRB1</i> | гру | ольная ппа 264) | группа | | ОШ (ДИ 95 %) | p |
|---------------------------|------|-----------------------|--------|------|----------------------|---------|
| | Абс. | Доля | Абс. | Доля | | |
| HLA-DRB1*01 | 39 | 0,14 | 20 | 0,10 | 0,67 (0,25 – 1,76) | 0,20 |
| HLA-DRB1*03 | 24 | 0,09 | 22 | 0,11 | 1,28 (0,48 – 3,37) | 0,26 |
| HLA-DRB1*04 | 31 | 0,11 | 23 | 0,12 | 1,02 (0,38 – 2,67) | 0,54 |
| HLA-DRB1*07 | 23 | 0,08 | 18 | 0,09 | 1,08 (0,40 – 2,84) | 0,47 |
| HLA-DRB1*08 | 17 | 0,06 | 6 | 0,04 | 0,49(0,18-1,28) | 0,13 |
| <i>HLA-DRB1*09</i> | 11 | 0,04 | 2 | 0,01 | 0,29 (0,10-1,75) | 0,05 |
| HLA-DRB1*10 | 0 | 0,00 | 5 | 0,03 | 15,35 (1,76 – 40,47) | 0,0132* |
| HLA-DRB1*11 | 29 | 0,11 | 30 | 0,15 | 1,48 (0,56 – 3,90) | 0,10 |
| HLA-DRB1*12 | 14 | 0,05 | 4 | 0,02 | 0,41 (0,15-1,07) | 0,061 |
| HLA-DRB1*13 | 26 | 0,1 | 30 | 0,15 | 1,67 (0,63 – 4,40) | 0,083 |
| HLA-DRB1*14 | 6 | 0,02 | 3 | 0,02 | 0,73 (0,27 – 1,91) | 0,42 |
| HLA-DRB1*15 | 33 | 0,12 | 26 | 0,13 | 1,09 (0,41 – 2,86) | 0,44 |
| HLA-DRB1*16 | 11 | 0,04 | 5 | 0,03 | 0,64 (0,24-1,68) | 0,25 |

Примечание: * – отмечен p-уровень со значимыми различиями, n – количество аллелей у женщин.

Выявлено, что у женщин, имеющих детей с ВПС, чаще в генотипе встречался аллель HLA-DRB1*10 (р = 0,0132) гена HLA-DRB1 (таблица 8) 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; р = 0,013), что говорит о том, что данный женский аллель является рисковым в отношении предрасположенности к развитию ВПС в последующем поколении.

Роль женских аллелей *HLA-DRB1* в детерминировании ВПС у плода может быть связана как с рестрикцией иммунных ответов материнского иммунного микроокружения на аллоантигены эмбриона и, через это, с ограничением

иммунного конфликта в системе «мать-плод», так и с наследованием *HLA-DRB1* эмбрионом.

Роль мужских аллелей *HLA-DRB1* в детерминировании риска формирования ВПС сводится к ограничению иммунного конфликта по HLA в системе «матьплод» за счет аллогенных свойств наследованных молекул. Проведенный анализ сравнения частоты встречаемости аллелей *HLA-DRB1* у мужчин основной и контрольной групп показало наличие единственной ассоциации с аллелем *HLA-DRB1*09* (таблица 9). 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.

Принимая во внимание, что мужской аллель *HLA-DRB1*09* обладает протективным эффектом в отношении формирования ВПС в последующем поколении, онжом предположить, ЧТО определенные свойства антигена, детерминированного этим аллелем, могут оказывать влияние на иммунные взаимодействия в системе «мать-плод», причем со стороны плода. Кроме того, протеины HLA относятся к молекулам межклеточных контактов, участвующих в механизмах межклеточного сигналинга, направленного на различные пути жизненного цикла клеток (пролиферация, дифференцировка, апоптоз). Показано, что именно на прогениторных клетках имеется высокая экспрессия мембранных (Ярилин, 2010). Отклонение молекул HLA-DR В жизненных циклах прогениторных клеток от заданного пути эмбриогенеза и будет ассоциировано с формированием врожденного порока развития плода, в том числе ВПС.

Таблица 9 – Сравнительная характеристика аллелей гена *HLA-DRB1* в основной и контрольной группах мужчин

| Аллели | Контрольн ая группа | | | вная ппа | OH (IIII 05 67) | p |
|--------------------|------------------------|------|------|-------------|----------------------|---------|
| HLA-DRB1 | (n = | 264) | (n = | 118) | ОШ (ДИ 95 %) | |
| | Абс. | Доля | Абс. | Доля | | |
| HLA-DRB1*01 | 37 | 0,14 | 14 | 0,12 | 0,84 (0,34 - 2,08) | 0,34 |
| HLA-DRB1*03 | 27 | 0,10 | 11 | 0,08 | 0,92(0,37-2,29) | 0,47 |
| HLA-DRB1*04 | 32 | 0,12 | 19 | 0,16 | 1,40 (0,56-3,47) | 0,18 |
| HLA-DRB1*07 | 26 | 0,09 | 18 | 0,15 | 1,66 (0,66 – 4,10) | 0,08 |
| <i>HLA-DRB1*08</i> | 17 | 0,06 | 5 | 0,04 | 0,69 (0,27 - 1,69) | 0,27 |
| HLA-DRB1*09 | 11 | 0,04 | 0 | 0 | 0,09 (0,038 - 0,231) | 0,0161* |
| HLA-DRB1*10 | 0 | 0 | 2 | 0,02 | 0.98 (0.49 - 238.3) | 0,09 |
| HLA-DRB1*11 | 29 | 0,11 | 12 | 0,10 | 0,94 (0,37 - 2,32) | 0,48 |
| HLA-DRB1*12 | 15 | 0,06 | 2 | 0,02 | 0,35 (0,13-1,85) | 0,06 |
| HLA-DRB1*13 | 26 | 0,09 | 13 | 0,11 | 1,15 (0,46 – 2,85) | 0,3 |
| HLA-DRB1*14 | 9 | 0,03 | 4 | 0,04 | 1,06 (0,42 – 2,61) | 0,62 |
| HLA-DRB1*15 | 29 | 0,10 | 15 | 0,13 | 1,20 (0,48 – 2,96) | 0,37 |
| HLA-DRB1*16 | 6 | 0,02 | 3 | 0,02 | 1,21 (0,48 – 2,98) | 0,56 |

Примечание: * – отмечен p-уровень со значимыми различиями, n – количество полученных аллелей у мужчин.

Необходимо отметить, что при отдельном учете вклада материнских и отцовских аллелей HLA-DRB1 в риск формирования ВПС у их детей, не выявлено положительной ассоциации с HLA-DRB1*12.

В тоже время ранее проведенные исследования показали, что одним из возможных механизмов формирования иммунного конфликта по HLA в системе «мать-плод» является совместимость супругов по HLA. Исходя из этого, провели сравнение частот встречаемости общих для супругов аллелей *HLA-DRB1*. Исследование показало, что частота встречаемости общих алллей для супругов контрольной группы не превышала 10 %, однако в семьях, имеющих детей с ВПС, частота встречаемости общих аллелей составила 41 % (р < 0,05, таблица 10).

Таблица 10 – Сравнение частот встречаемости общих для супругов аллелей *HLA-DRB1* в основной и контрольной группах

| Общие аллели в супружеской паре | - | Основная группа (n = 48), % | ОШ (ДИ 95 %) | p |
|---------------------------------|------|-----------------------------------|---------------------------|--------|
| Всего | 9,09 | 41,5 | 6,65 (2,009 – 22,021) | 0,001* |
| HLA-DRB1*01 | 3,03 | 6,25 | 1,00 | > 0,05 |
| HLA-DRB1*03 | 1,52 | 0,00 | 1,00 | > 0,05 |
| HLA-DRB1*04 | 0,00 | 4,10 | 11,52 (3,479 – 38,135) | 0,03* |
| HLA-DRB1*07 | 0,75 | 4,10 | 1,00 | > 0,05 |
| HLA-DRB1*11 | 0,00 | 6,25 | 21,49 (6,488 – 71,112) | 0,007* |
| HLA-DRB1*12 | 0,75 | 0,00 | 1,00 | > 0,05 |
| HLA-DRB1*13 | 2,27 | 12,50 | 5,29 (1,596 – 17,496) | 0,009* |
| HLA-DRB1*15 | 0,75 | 8,30 | 1,00 | > 0,05 |

Примечание: * – отмечен p-уровень со значимыми различиями, n – количество семей.

Как видно из таблицы 10, в основной группе значимо чаще встречались следующие общие аллели у родителей: *HLA-DRB1*04* (ОШ = 11,52; ДИ 95 % 3,479 – 38,135; р = 0,032), *HLA-DRB1*11* (ОШ = 21,49; ДИ 95 % 6,488 – 71,112; р = 0,007), *HLA-DRB1*13* (ОШ = 5,29; ДИ 95 % 1,596 – 17,496; р = 0,009). Это говорит о том, что вероятность совпадения по *HLA-DRB1* матери и плода в основной группе выше, чем в контроле. Учитывая положительную роль иммунной сенсибилизации материнского микроокружения к алло-HLA трофобласта в ограничении иммунного воспаления в системе «мать-плод», можно сделать вывод о ее нарушениях в основной группе из-за высокой частоты встречаемости общих *HLA-DRB1* у супругов. Кроме того, все ассоциированные с ВПС общие аллели *HLA-DRB1* у супругов относились к «иммунопатологическим» аллелям, то есть связанным с риском формирования иммуновоспалительных заболеваний. Тем самым, как со стороны матери, так и со стороны плода эти анигены могли усиливать воспалительный потенциал в системе «мать-плод».

Далее был проведен сравнительный 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. Характеристика модели представлена в таблице 11.

Таблица 11 – Характеристика модели, определяющая предрасположенность к развитию ВПС в последующем поколении

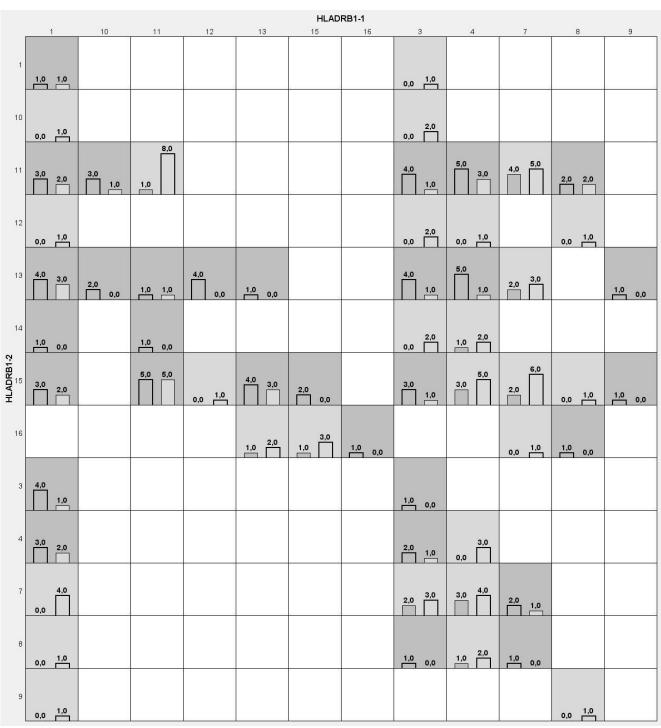
| Модель | Bal. Acc. Tr. | Bal. Acc. Test. | Se. | Sp. | Cons. | Pre. |
|---|---------------------|-----------------------|------|------|-------|------|
| Мультилокусная модель аллелей <i>HLA-DRB1</i> | 0,73 | 0,52 | 0,78 | 0,67 | 10/10 | 0,70 |

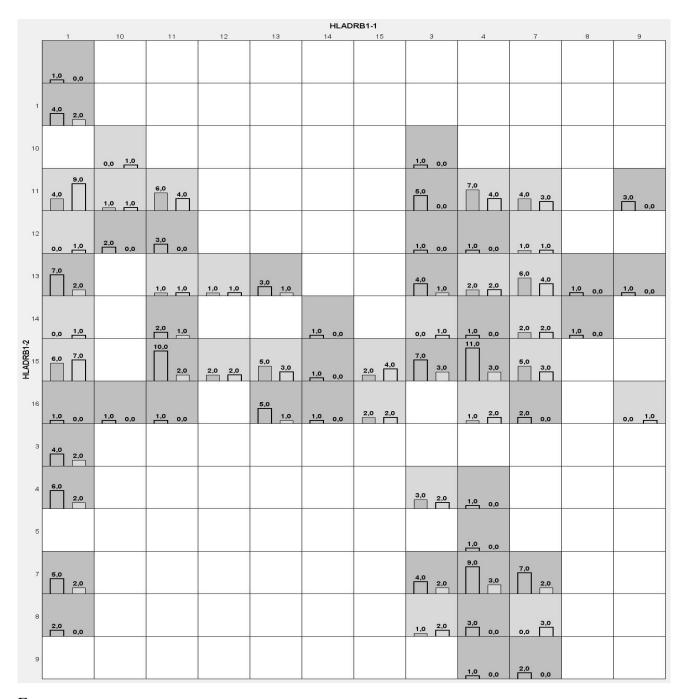
Примечание: Tr.Bal.Acc. – тренировочная сбалансированная точность, Test.Bal.Acc. – тестируемая сбалансированная точность, Se. – чувствительность; Sp. – специфичность, Cons. – повторяемость результата, Pre. – точность модели.

Анализ представленной модели позволил выделить ряд рисковых и протективных генотипов, графическое изображение которых представлено на рисунках (5a, 5б).

Полученные комбинации мужских и женских аллелей ассоциированы 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 выявлено сочетание, обладающее протективным эффектом HLA-DRB1*08/HLA-DRB1*11 (p = 0,038, OШ = 0,13 ДИ 95 % 0,01 – 0,89).





Б

Рисунок 5. Распределение сочетаний генотипов *HLA-DRB1*: 5A – у матерей, имеющих детей с ВПС и матерей, имеющих условно-здоровых детей. Темносерые ячейки – генотипы повышенного риска, светло-серые – генотипы пониженного риска, белые ячейки – отсутствуют сочетания. Левые столбики генотипы матерей, имеющих детей с ВПС, правые – контрольной группы; 5Б – у отцов из семей, имеющих детей с ВПС и мужчин из семей, имеющих условноздоровых детей. Темно-серые ячейки – генотипы повышенного риска, светло-

серые – генотипы пониженного риска, белые ячейки – отсутствуют сочетания. Левые столбики – генотипы детей с ВПС, правые – условно-здоровых детей.

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 дополнительный аллель HLA-DRB1*15 (p = 0,014), положительно 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 (таблица 12).

Таблица 12 – Частота аллелей у детей обследованных групп

| Аллели | Контрольная Аллели группа HLA-DRB1 (n = 264) | | гр | овная уппа = 194) | ОШ (ДИ 95 %) | р |
|-------------|--|--------|--------------|-------------------------|--------------------|--------|
| HLA-DRB1 | М = Aбс. | Доля | (n - Абс. | = 194) Доля | _ | |
| | 7100. | доли | 7100. | доли | | |
| HLA-DRB1*01 | 35 | 13,26 | 22 | 11,34 | 0,83 (0,46 – 1,48) | 0,56 |
| HLA-DRB1*03 | 37 | 14,02 | 19 | 9,79 | 0,67 (0,37 – 1,21) | 0,19 |
| (17) | | 1 1,02 | | <i>-</i> ,,,, | 0,07 (0,27 1,21) | |
| HLA-DRB1*04 | 32 | 12,12 | 25 | 12,89 | 1,07 (0,61 – 1,88) | 0,88 |
| HLA-DRB1*07 | 25 | 9,47 | 26 | 13,40 | 1,48 (0,82 - 2,67) | 0,22 |
| HLA-DRB1*08 | 15 | 5,68 | 6 | 3,09 | 0,52(0,20-1,38) | 0,25 |
| HLA-DRB1*09 | 10 | 3,79 | 3 | 1,55 | 0,39(0,11-1,37) | 0,25 |
| HLA-DRB1*10 | 2 | 0,76 | 2 | 1,03 | 1,36(0,21-8,7) | 0,99 |
| HLA-DRB1*11 | 34 | 12,88 | 31 | 15,98 | 1,46 (0,87 - 2,43) | 0,17 |
| HLA-DRB1*12 | 14 | 5,30 | 4 | 2,06 | 0,39(0,13-1,14) | 0,14 |
| HLA-DRB1*13 | 24 | 9,09 | 11 | 5,67 | 0,60 (0,28 - 1,23) | 0,21 |
| HLA-DRB1*14 | 7 | 2,65 | 7 | 3,61 | 1,37 (0,51 – 3,67) | 0,59 |
| HLA-DRB1*15 | 24 | 9,09 | 33 | 17,01 | 2,05 (1,16 – 3,60) | 0,014* |
| HLA-DRB1*16 | 5 | 1,89 | 5 | 2,58 | 1,37 (0,44 – 4,2) | 0,74 |

Примечание: * – отмечен р-уровень со значимыми различиями, п – количество полученных аллелей у детей.

Надо отметить, что *HLA-DRB1*15* не проявлял себя среди материнских и отцовских аллелей, положительно ассоциированных с риском формирования ВПС. Однако необхдимо подчеркнуть, что при анализе родительских сочетаний *HLA-DRB1*, ассоциированных с ВПС у их детей, выявлены два мужских генотипа, положительно ассоциированные с врожденной патологией сердца у детей, и в оба эти генотипа входил аллель *HLA-DRB1*15*. Частота данного аллеля выше у мужчин основной группы в сочетании с аллелями *HLA-DRB1*01* и *HLA-DRB1*11*. В тоже время, данный аллель не встречался в группе общих супружеских аллелей, частота встречаемости которых в основной группе выше, чем в контроле. Тем самым, *HLA-DRB1*15* мог быть проявлением особенностей наследования *HLA-DRB1* в основной группе преимущественно от отцов. Данные об особенностях наследования *HLA-DRB1* представлены в следующей подглаве.

Таким образом, на данном этапе исследования было показана роль родительских и детских аллелей *HLA-DRB1* в детерминировании риска формирования ВПС. Было показано, что наибольшее отношение шансов риска формирования ВПС выявлено для сочетания общих аллелей *HLA-DRB1*11* в семейной паре. То есть в том случае, если у обоих супругов в семенной паре имеется *HLA-DRB1*11*, риск рождения в последующем поколении ребенка с ВПС возрастает с вероятностью выше 50 %.

Феномен ограничения образования супружеских пар с общими *HLA-DRB1* аллелями представлен ниже.

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

Для оценки переданных и непереданных аллелей *HLA-DRB1* отобрано 48 полных семей, имеющих детей с ВПС. Для проведения анализа использовали ТDТ тест, который позволяет определять количество переданных и непереданных аллелей «риска» потомству. При проведении сравнительного анализа оценивали общее количество переданных и непереданных аллелей от родителей к детям (таблица 13).

Таблица 13 – Сравнительная характеристика переданных и непереданных родительских аллелей детям с ВПС

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

Примечание: * — отмечен р-уровень со значимыми различиями, χ^2 — хи-квадрат с поправкой Йетса, n — количество аллелей.

Установлено, что аллели гена *HLA-DRB1* в равной степени передавались и непередавались потомству. Однако стоит отметить, что только аллель *HLA-*

DRB1*13 чаще не наследовался детьми (p = 0,042). Для этого аллеля выявлено значимое отклонение от равновероятного наследования.

Сравнение особенностей наследования в контрольной группе (таблица 14) также показало, что аллели *HLA-DRB1* в равной степени передавались и непередавались потомству.

Таблица 14 — Сравнительная характеристика переданных и непереданных 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 |
|---------------------------|---|-------------------------|---------------------------|----------|--------|
| HLA-DRB1*01 | 76 | 35 | 41 | 0,5 | 0,23 |
| HLA-DRB1*03 | 51 | 37 | 14 | 11,57 | 0,001* |
| HLA-DRB1*04 | 63 | 32 | 31 | 0,02 | 0,5 |
| HLA-DRB1*07 | 51 | 26 | 25 | 0,08 | 0,47 |
| HLA-DRB1*08 | 34 | 18 | 16 | 0,13 | 0,39 |
| HLA-DRB1*09 | 21 | 12 | 9 | 0,45 | 0,28 |
| HLA-DRB1*10 | 2 | 1 | 1 | 0,01 | 0,5 |
| HLA-DRB1*11 | 58 | 32 | 26 | 0,71 | 0,13 |
| HLA-DRB1*12 | 30 | 14 | 16 | 0,12 | 0,33 |
| HLA-DRB1*13 | 48 | 24 | 24 | 0,01 | 0,5 |
| HLA-DRB1*14 | 15 | 6 | 9 | 0,62 | 0,17 |
| HLA-DRB1*15 | 62 | 24 | 38 | 0,34 | 0,33 |
| HLA-DRB1*16 | 17 | 5 | 12 | 2,97 | 0,063 |

Примечание: * — отмечен р-уровень со значимыми различиями, χ^2 — хи-квадрат с поправкой Йетса, n — количество аллелей.

В отличие от основной группы, в контрольной группе ребенком чаще наследовался аллель HLA-DRB1*03, чем не наследовался (p = 0,001).

Таким образом, принципиальным отличием между основной и контрольной группами явились особенности передачи отдельных аллелей от родителей к их детям. Так, в основной группе аллель *HLA-DRB1*13* чаще не наследовался детьми, которые имели ВПС, от их родителей, в тоже время в контрольной группе

аллель HLA-DRB1*03 чаще наследовался от родителей их условно здоровыми детьми.

Далее провели анализ наследования отдельно у женщин и у мужчин из основной и контрольной групп (таблица 15, 16).

Таблица 15 – Сравнение переданных и непереданных аллелей от родителей, имеющих детей с ВПС

| Аллели <i>HLA-DRB1</i> | Родительские | Переданные | Непереданные | χ^2 | р | | | |
|---------------------------|--------------|-------------|--------------|----------|-------|--|--|--|
| Женщины, n=48 | | | | | | | | |
| 01 | 9 | 4 | 5 | 0 | 1 | | | |
| 03 | 10 | 8 | 2 | 2,79 | 0,095 | | | |
| 04 | 10 | 3 | 7 | 1,005 | 0,317 | | | |
| 07 | 9 | 6 | 3 | 1,005 | 0,317 | | | |
| 08 | 3 | 2 | 1 | 0 | 1 | | | |
| 09 | 1 | 1 | 0 | 1,011 | 0,35 | | | |
| 10 | 1 | 0 | 1 | 1,011 | 0,315 | | | |
| 11 | 17 | 10 | 7 | 0,286 | 0,59 | | | |
| 12 | 2 | 1 | 1 | 0,511 | 0,475 | | | |
| 13 | 15 | 5 | 10 | 1,87 | 0,17 | | | |
| 14 | 0 | 0 | 0 | | | | | |
| 15 | 17 | 7 | 10 | 0,286 | 0,593 | | | |
| 16 | 2 | 1 | 1 | 0,511 | 0,475 | | | |
| | | Мужчины, n: | =48 | | | | | |
| 01 | 11 | 8 | 3 | 1,643 | 0,200 | | | |
| 03 | 7 | 3 | 4 | 0 | 1 | | | |
| 04 | 16 | 8 | 8 | 0,075 | 0,785 | | | |
| 07 | 15 | 10 | 5 | 1,264 | 0,261 | | | |
| 08 | 5 | 1 | 4 | 0,814 | 0,359 | | | |
| 09 | 0 | 0 | 0 | | | | | |
| 10 | 1 | 0 | 1 | 1,011 | 0,315 | | | |
| 11 | 8 | 4 | 4 | 0,136 | 0,712 | | | |
| 12 | 4 | 2 | 2 | 0,511 | 0,475 | | | |
| 13 | 10 | 3 | 7 | 1,005 | 0,317 | | | |
| 14 | 3 | 3 | 0 | 1,376 | 0,241 | | | |
| 15 | 14 | 4 | 10 | 2,091 | 0,149 | | | |
| 16 | 2 | 2 | 0 | 0,511 | 0,475 | | | |

Примечание: * — отмечен р-уровень со значимыми различиями, χ^2 — хи-квадрат с поправкой Йетса, n — количество аллелей.

Как видно из таблицы 15, значимых отличий в наследовании аллелей от матерей и от отцов в основной группе не выявлено.

Из этого следует, что дети, имеющие ВПС, с одинаковой вероятностью наследовали аллели *HLA-DRB1* от матерей и от отцов. Феномен уменьшения наследования в последующем поколении аллеля *HLA-DRB1*13* связан с интегративным родительским показателем. Как видно из таблицы 15, из 15 материнских *HLA-DRB1*13* наследовались только 5 аллелей, а из 10 отцовских – 3 аллеля, и для отдельно взятых родителей эти показатели значимо не отличались от расчетных.

В контрольной группе, напротив, показан вклад в наследование HLA-DRB1*03 как отцовского, так и материнского компонента (таблица 16). Как видно из таблицы 16, из 24 материнских аллелей, детьми наследовались 18 аллелей, в то время как при расчетных показателях должно наследоваться только 12 аллелей (р = 0,018). То же самое касалось и отцов. Так, из 27 отцовских HLA-DRB1*03 наследовалось 19 аллелей, в то время как при расчетных показателях должно наследоваться только 13 аллелей (р = 0,020). Для наследования других аллелей в контрольной группе статистически значимых различий не получено.

Таблица 16 – Сравнение переданных и непереданных аллелей в семьях, имеющих условно здоровых детей

| Аллели <i>HLA-DRB1</i> | Родительские | Переданные | Непереданные | χ^2 | р |
|---------------------------|--------------|----------------|--------------|----------|--------|
| | | Женщины, n=132 | 2 | | |
| 01 | 39 | 15 | 24 | 1,93 | 0,16 |
| 03 | 24 | 18 | 6 | 5,55 | 0,018* |
| 04 | 31 | 16 | 15 | 0 | 0,99 |
| 07 | 23 | 12 | 11 | 0 | 0,99 |
| 08 | 17 | 10 | 7 | 0,25 | 0,61 |
| 09 | 11 | 7 | 4 | 0,38 | 0,27 |
| 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 11 | 29 | 17 | 12 | 0,62 | 0,21 |
| 12 | 14 | 6 | 8 | 0,08 | 0,39 |
| 13 | 26 | 13 | 13 | 0,04 | 0,58 |

Продолжение таблицы 16

| 14 | 6 | 1 | 5 | 0 | 0,10 |
|----|----|----------------|----|-------|--------|
| 15 | 33 | 14 | 19 | 0,55 | 0,22 |
| 16 | 11 | 3 | 8 | 0,52 | 0,10 |
| | | Мужчины, n=132 | | | |
| 01 | 37 | 20 | 17 | 0,13 | 0,36 |
| 03 | 27 | 19 | 8 | 4,13 | 0,020* |
| 04 | 32 | 16 | 16 | 0,04 | 0,58 |
| 07 | 26 | 13 | 13 | 0,004 | 0,58 |
| 08 | 17 | 8 | 9 | 0 | 0,49 |
| 09 | 11 | 5 | 6 | 0 | 0,50 |
| 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 11 | 29 | 15 | 14 | 0 | 0,50 |
| 12 | 15 | 8 | 7 | 0 | 0,50 |
| 13 | 26 | 11 | 15 | 0,38 | 0,26 |
| 14 | 9 | 5 | 4 | 0 | 0,49 |
| 15 | 29 | 10 | 19 | 2,48 | 0,057 |
| 16 | 6 | 2 | 4 | 0 | 0,34 |

Примечание: * — отмечен p-уровень со значимыми различиями, χ^2 — хиквадрат с поправкой Йетса, n — количество аллелей.

Исходя из гипотезы о том, что наличие общих аллелей у супругов и плода беременности, нежелательным исходам провели сравнение переданных и непереданных общих для родителей аллелей *HLA-DRB1* их детьми (таблица 17). 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. Принимая в расчет особенности обший кодоминантного наследования, аллель должен передаваться последующее поколение в 75 %. Тем самым, расчетный показатель наследования общего семейного аллелля для последующего поколения статистически значимо не отличался от наблюдаемого. Стоит отметить, что в большинстве случаев общие аллели были унаследованы от матерей, но достоверных различий от расчетных процентов передачи общих семейных аллелей как от матерей, так и от отцов, не получено (p > 0.05).

Таблица 17 – Переданные общие аллели *HLA-DRB1* в основной группе

| | | No | % | Расчетный процент |
|--------------|--------------------------------|----|---|--|
| | Всего | 48 | 100 | передачи общего |
| Семьи | Имеющие общие аллели | 22 | 45,8 %, а для нижележащих строк – 100 % | семейного аллеля для последующего поколения, % |
| Общие аллели | Всего переданных аллелей | 16 | 72,7 | 75,0 |
| | От обоих родителей | 5 | 22,7 | 25,0 |
| | Только от матерей | 8 | 36,4 | 25,0 |
| | Только от отцов | 3 | 13,6 | 25,0 |

В ходе дальнейшего исследования провели сопоставление частоты материнских переданных и не переданных аллелей в исследуемой и контрольной группах. Достоверных различий по частоте встречаемости аллелей *HLA-DRB1* между сравниваемыми группами получено не было (таблица 18).

Таблица 18 – Сравнительная характеристика непереданных аллелей *HLA-DRB1* в исследуемой и контрольной группах женщин

| Аллели <i>HLA-DRB1</i> | гру | ольная ппа 132) | Основная группа (n = 48) | | ОШ (ДИ 95 %) | p |
|---------------------------|------|-----------------------|--------------------------------|-------|--------------------|------|
| | Абс. | Доля | Абс. | Доля | | |
| HLA-DRB1*01 | 24 | 0,18 | 5 | 10,41 | 0,52 (0,20 – 1,41) | 0,15 |
| HLA-DRB1*03 | 6 | 0,05 | 2 | 4,16 | 0,91 (0,18 – 3,79) | 0,63 |

Продолжение таблицы 18

| HLA-DRB1*04 | 15 | 0,11 | 7 | 14,5 | 1,41 (0,56 – 3,57) | 0,30 |
|-------------|----|------|----|------|---------------------|-------|
| HLA-DRB1*07 | 11 | 0,08 | 3 | 6,25 | 0,76 (0,22 – 2,68) | 0,48 |
| HLA-DRB1*08 | 7 | 0,05 | 1 | 2,08 | 0,38 (0,03 – 2,25) | 0,32 |
| HLA-DRB1*09 | 4 | 0,03 | 0 | 0 | 0,26 (0,015 – 5,48) | 0,28 |
| HLA-DRB1*10 | 0 | 0,0 | 1 | 2,08 | 7,98 (0,31 – 199,5) | 0,27 |
| HLA-DRB1*11 | 12 | 0,09 | 7 | 14,5 | 1,7 (0,66 – 4,58) | 0,28 |
| HLA-DRB1*12 | 8 | 0,06 | 1 | 2,08 | 0,32 (0,03 – 2,66) | 0,24 |
| HLA-DRB1*13 | 13 | 0,10 | 10 | 20,8 | 2,4 (0,97 – 5,93) | 0,048 |
| HLA-DRB1*14 | 5 | 0,04 | 0 | 0 | 0,23 (0,012 – 4,40) | 0,20 |
| HLA-DRB1*15 | 19 | 0,14 | 10 | 20,8 | 1,64 (0,7 – 3,85) | 0,17 |
| HLA-DRB1*16 | 8 | 0,06 | 1 | 2,08 | 0,32 (0,03 – 2,66) | 0,24 |

Примечание: * – отмечен p-уровень со значимыми различиями, n – количество аллелей.

Таким образом, проведенный этап исследования показал, что имеются особенности наследования аллелей *HLA-DRB1*. В частности, наблюдается отклонение от равновероятного наследования для некоторых аллелей. В группе родителей, имеющих условно здоровых детей, прослеживается тренд в наследовании аллеля *HLA-DRB1*03*.

При сравнении отношения шансов различных родительских переданных и непереданных аллелей *HLA-DRB1*, а также детских аллелей этого гена, можно говорить об их незначительном вкладе в дерминировании риска формирования спорадических ВПС в последующем поколении, по сравнению с общими *HLA-DRB1* в супружеской паре. Фентопическим проявлением этого феномена будут

нарушения иммунных взаимодействий аллогенных лимфоцитов супругов в их смешанной культуре. Эти данные представлены в следующей подглаве.

3.4. 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, графическое изображение результатов данного метода показано на рисунках 6-8.

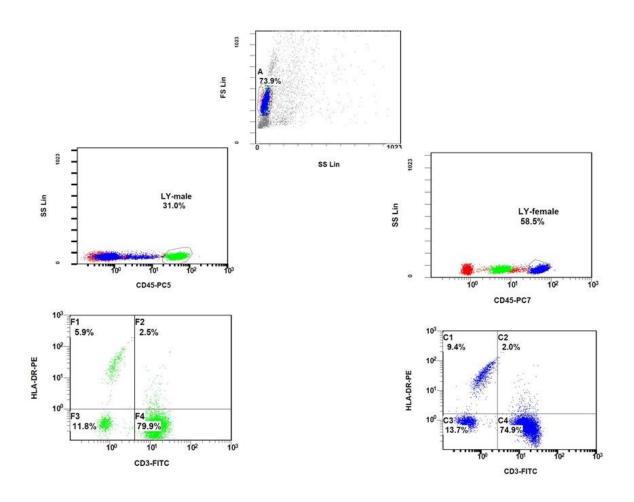


Рисунок 6 — Смешанная культура лимфоцитов супругов, где первично по SSL/FSL гейтированы все лимфоциты участвующие в СКЛ; далее они разделены на мужские (SSL/CD45⁻PC5 и женские (SSL/CD45⁻PC7), в которых проведена оценка субпопуляций CD3⁺HLA-DR⁺ и CD3⁻HLA-DR⁺

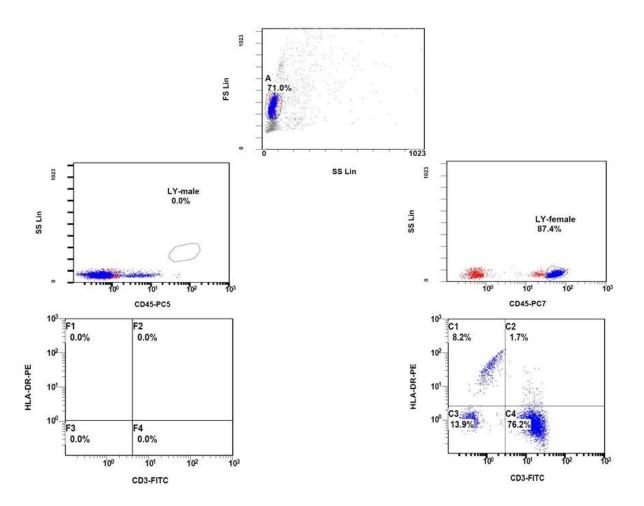


Рисунок 7 — Спонтанная культура лимфоцитов женщины, где первично по SSL/FSLгейтированы все лимфоциты; далее они разделены по тому же протоколу, что и СКЛ, на мужские (SSL/CD45⁻PC5 и женские (SSL/CD45⁻PC7). В спонтанной культуре нет мужских лимфоцитов, и проведена оценка субпопуляций женских CD3⁺HLA-DR⁺ и CD3⁻HLA-DR⁺.

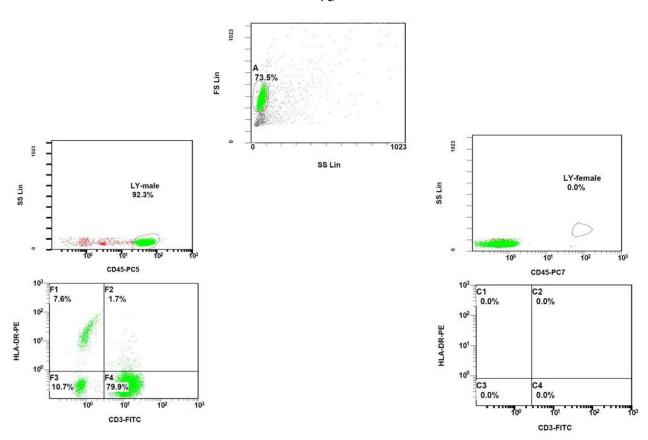


Рисунок 8 — Спонтанная культура лимфоцитов мужчины, где первично по SSL/FSL гейтированы все лимфоциты; далее они разделены по тому же протоколу, что и СКЛ, на мужские (SSL/CD45⁻PC5 и женские (SSL/CD45⁻PC7). В спонтанной культуре нет женских лимфоцитов и проведена оценка субпопуляций мужских CD3⁺HLA-DR⁺ и CD3⁻HLA-DR⁺

Проведенное исследование показало, что по иммунным показателям, отражающим взаимодействия по HLA в системе «мать-плод», группа семей с ВПС отличалась от контрольной группы (таблица 19). В таблице представлены только показатели, по которым получены значимые различия. Полные результаты показаны в приложениях 1, 2. Представленные данные продемонстрировали, что основные 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 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).

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, имеющих детей с пороками сердца, данный КП выше, чем в группе контроля (p = 0,002).

Таблица 19 – Аллоиммунные взаимодействия лимфоцитов супругов по HLA в основной и контрольной группах (иммунный ответ женских лимфоцитов на лимфоциты супруга)

| Аналиты | Контрольная группа | | | Осн | n | | |
|---------------------------------------|--------------------|---------|---------|----------|----------|---------------------|--------|
| | Me | LQ | UQ | Me | LQ | UQ | р |
| КП СКЛ ауто | 28,41 | 15,43 | 41,38 | -50,75 | -63,32 | -38,18 | 0,008 |
| CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ | 20,41 | 15,45 | 41,36 | -50,75 | -03,32 | -30,10 | 0,000 |
| КП СКЛ ауто | 24.45 | -10,97 | 59,87 | 359,34 | 254,77 | 463,92 | 0,002 |
| CD3-HLA-DR+ | 24,45 | | | | | | |
| КБ СКЛ | 644,52 | -66,84 | 1355,89 | -1049,52 | -1809,82 | -289,21 | 0,0008 |
| CD3+HLA-DR+ | | | | | | | |
| КБ СКЛ | -406,63 | -985,21 | 193,95 | 14361,35 | 5992,95 | 22729,75 | 0,0001 |
| CD3 ⁻ HLA- DR ⁺ | | | | | | | |
| КБ СКЛ | 38,69 | -22,64 | 100,01 | 6562,22 | -1663,77 | 14788,21 | 0,0003 |
| HLA-DR+ | | | | | | | |
| ЭКП ауто | 70,74 | 20,76 | 120,72 | -106,00 | -490,67 | 278,67 | 0,02 |
| CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ | | 20,70 | | | | | |
| ЭКБ | 54,06 | -13,80 | 121,92 | -747,69 | -1317,14 | -178,24 | 0,002 |
| CD3 ⁺ HLA -DR ⁺ | JT,00 | -13,00 | 121,72 | -171,09 | -1317,14 | -170 ,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, Ме — медиана, LQ — 25-й квартиль, UQ = 75-й квартиль

Как уже отмечено, КП отражает изменение 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 аутосыворотки на аллогенные по HLA клеточные иммунные реакции.

Подтверждением этого предположения являются статистически значимые различия в блокирующем эффекте женской аутосыворотки на аллогенные по HLA клеточные реакции женских лимфоцитов в СКЛ супругов. 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). По этому показателю между группами получено достоверное различие (р = 0,0008). В отношении субпопуляции лимфоцитов (CD3-HLA-DR+), эффект женской аутосыворотки в сравниваемых группах прямо противоположный. Так, СКЛ супругов, имеющих детей с ВПС, женская аутосыворотка активировала, а в контрольной группе – блокировала. Различия между группами статистически значимы (р = 0,0001). В целом для всех женских эффект лимфоцитов, экспрессирующих HLA-DR, активирующий положительный) женской аутосыворотки выше в основной группе по отношению к контрольной (р = 0,0003). Выраженная активация женскими сывороточными факторами Т- и В-лимфоцитов материнского иммунного микроокружения эмбриона может быть основой для усиления альтерирующего компонента воспаления в системе «мать-плод» с последующей индукцией тератогенеза в формирующейся сердечно-сосудистой системе эмбриона (плода).

Роль факторов женской аутосыворотки 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 сенсибилизации к женским НLA и поэтому данные клеточные реакции могут выступать в качестве контрольных. 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 аутосыворотки. Так в группе семей, имеющих детей с пороками сердца, этот показатель отрицательный, а в группе контроля (имеющих здоровых детей) – положительный (р = 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 сывороточных факторов в моделировании клеточных аллогенных по HLA реакций в системе «мать-плод», приводящих к индукции формирования пороков сердца у эмбриона.

ЭКБ По получено единственное достоверное различие между сравниваемыми группами в отношении женских активированных Т-лимфоцитов. Блокирующий эффект женской аутосыворотки 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 пороками (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 в последующем поколении провели регрессионный анализ, где зависимой переменной было наличие (1 балл) или отсутствие (0 баллов) пороков сердца у детей. Данные представлены в таблице 20.

В таблице 20 представлены статистически значимые Бэта-коэффициенты (отражают относительное влияние предиктора на зависимую переменную) и Б-коэффициенты (отражают прогностическую значимость предиктора).

КП экспрессии HLA-DR на женских активированных Т-лимфоцитах (CD3⁺ HLA-DR⁺) в СКЛ с ЭТС имел положительную ассоциацию с риском

формирования порока сердца. То есть, чем выше экспрессия HLA-DR на женских активированных Т-лимфоцитах в СКЛ с ростовыми факторами и без добавления женской аутосыворотки, тем выше риск формирования ВПС в последующем поколении.

Напротив, КП экспрессии HLA-DR на женских активированных Т-лимфоцитах (CD3+HLA-DR+) в СКЛ с добавлением женской аутосыворотки имел отрицательную ассоциацию с риском формирования ВПС в последующем поколении.

Таблица 20 – Множественный линейный регрессионный анализ иммунных предикторов риска формирования врожденных пороков

| Регрессия ВПС / контроль | Бэта- коэффици- ент | Стандартная ошибка бэта- коэффициен- та | Б- коэффи- циент | Стандартная ошибка Б-коэффи- циента | p |
|---|---------------------------|---|------------------------|--|--------|
| КП СКЛ ЭТС CD3 ⁺ HLA- DR ⁺ | 0,79828 | 0,24716 | 0,00648 | 0,00201 | 0,0028 |
| КП СКЛ ауто CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ | -0,72841 | 0,21795 | -0,00609 | 0,00182 | 0,0021 |
| КБ СКЛ CD3+HLA- DR+ | -0,77770 | 0,38038 | -0,00002 | 0,00001 | 0,0489 |
| ЭКБ CD3 ⁺ HLA- DR ⁺ | -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.

Кроме того, КБ экспрессии HLA-DR на женских активированных Т-лимфоцитах (CD3+HLA-DR+) в СКЛ и ЭКБ экспрессии HLA-DR на женских активированных Т-лимфоцитах (CD3+HLA-DR+) в СКЛ отрицательно ассоциированы с риском формирования пороков в последующем поколении. Эти

данные свидетельствуют о том, что чем сильнее подавляется экспрессия HLA-DR на женских активированных Т-лимфоцитах (CD3⁺HLA-DR⁺) гуморальными факторами женской аутосыворотки, тем выше риск формирования порока в эмбриональном периоде.

Полученные результаты указывают на дисбаланс женских клеточных и гуморальных факторов в регуляции иммунных взаимодействий по HLA в системе «мать-плод» в патогенезе формирования ВПС. Особое значение имеет выраженная активность жеснкой аутосыворотки, которая проявляется в подавлении экспрессии HLA-DR на женских активированных Т-лимфоцитах. Именно эти лимфоциты могут относиться к регуляторной субпопуляции, ограничивающей клеточные реакции, направленные на полуаллогенный плод. Также показано, что уровень экспрессии молекулы HLA-DR на лимфоцитах супругов ассоциирован с формированием ВПС у их детей.

Далее была оценена взаимосвязь генетических локусов с иммунными показателями мужчин и женщин основной группы. Анализ показал, что с более высокими уровнями экспрессии молекулы HLA-DR на поверхности лимфоцитов связано с наличием в генотипе женщин аллеля HLA-DRB1*8 (p = 0,01), а также аллеля HLA-DRB1*11 (p = 0,04). В тоже время, стоит отметить, что для мужчин КП экспрессии HLA-DR на активированных Т-лимфоцитах в СКЛ с добавлением женской аутосыворотки статистически значимо выше у отцов, которые были носителями аллеля HLA-DRB1*4 (p = 0,03) в генотипе. С другими аллелями статистически значимых различий получено не было (Таблица 21).

Таблица 21 – Взаимосвязь генетических локусов с иммунными показателями мужчин и женщин основной группы

| | К | Кенщин | Ы | Мужчины | | | |
|------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---|--------------------------|---------------------------|-----------------------------------|--|
| Аллели HLA- DRB1 | 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 | 062 | 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 | |

Примечание: * – отмечен р-уровень со значимыми различиями

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

$$Y = (EXP(Z) / (1 + EXP(Z)) \times 100 \%$$
, 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 аутосывороткой 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).

Значимость вклада трех иммунологических предикторов высокая (р < 0,001). Эти три коэффициента на 99,9 % определяют риск формирования спорадических ВПС в последующих поколениях.

Элементы основной формулы рассчитываются из первичных коэффициентов прироста (КП) экспрессии HLA-DR в СКЛ на лимфоцитах супругов.

Для выявленных в логистической регрессии предикторов ВПС была определена чувствительность и специфичность как для отдельных предикторов, так и для уравнения определения риска формирования ВПС в целом (все предикторы). Диагностическая эффективность теста (формулы) в целом составила 94,9 %.

Среднее популяционное значение коэффициента вероятности риска формирования ВПС в последующих поколениях находится в пределах 19,23 % [0,00; 49,72]. Для прегравидарного скрининга ВПС учитываются величины индивидуальных коэффициентов вероятности риска превышающих 50 %.

В таблице 22 представлены нормативные показатели коэффициентов аллогенных иммунных взаимодействий в краткосрочной СКЛ супругов.

Таблица 22 — Нормативные показатели коэффициентов аллогенных иммунных взаимодействий в краткосрочной СКЛ супругов

| Коэффициент | M | Нижняя граница | Верхняя граница |
|--|------|----------------|-----------------|
| КБ СКЛ женской | | | |
| аутосывороткой | 100 | -90 | 200 |
| CD3 ⁺ HLA DR ⁺ , % | | | |
| ЭКП в СКЛ с ЭТС | | | |
| женщ/муж | -100 | -170 | -20 |
| CD3 ⁺ HLA DR ⁺ , % | | | |
| ЭКП в СКЛ с ЭТС | | | |
| женщ/муж | -250 | -500 | -100 |
| CD3-HLA DR+, % | | | |

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное исследование показало ассоциации иммунных и иммуногенетических показателей с предрасположенностью к развитию ВПС. В работе представлены данные о взаимосвязи аллелей и генотипов гена *HLA-DRB1* родителей с риском развития ВПС в последующих поколениях.

ВПС – одна из ведущих патологий сердечно-сосудистого континуума и основная причина инвалидизации и смертности в детском возрасте. Несмотря на достигнутые успехи в области диагностики и хирургической коррекции пороков, проблема ВПС остаётся актуальной среди исследователей во всем мире, ввиду разнообразия причин своего развития. Неоднократно показано, что данная патология имеет мультифакториальную основу, включающую в себя совокупность взаимовлияющих факторов.

Генетические механизмы развития пороков сердца до сих пор не ясны, что объясняется трудностью реализации наследственной информации в предрасположенности к ВПС из-за взаимодействия комплекса факторов (Швецов, 2014). Важное значение при исследовании факторов, которые влияют на предрасположенность к развитию ВПС, уделяется состоянию здоровья матери и отца, планирующих рождение ребенка. Так, многие исследователи отмечают ряд факторов, влияющих на будущее потомство. К таковым можно отнести курение как матери, так и отца (Dev et al., 2018), употребление алкоголя (Wen et al., 2016) и наркотических веществ (Lind et al., 2017), сахарный диабет матери (Oyen et al., 2016), прием фолиевой кислоты (Øyen et al., 2019) и других препаратов (Lennestal, et al., 2009).

Известно, что нейро-иммуно-эндокринная перестройка организма матери во время беременности способствует нормальному развитию плода. Нарушение в

одной из систем организма матери может нарушать эмбриональный морфогенез, что в конечном итоге приведет к формированию различных пороков.

Успешный исход беременности зависит во многом от иммунорегуляторных механизмов, контролирующих иммунный ответ матери, направленный на эмбрион, который рассматривается как естественный аллотрансплантат. Унаследованные от отца антигены HLA вызывают активацию иммунной системы матери, которая в свою очередь активирует различные клетки иммунной системы, необходимые для поддержания беременности (Craenmehr et al., 2019).

Гены главного комплекса гистосовместимости, именуемые HLA у человека, являются ключевым звеном иммунной системы человека, выполняя функцию распознавания чужого. Иммуногенетические исследования последнего десятилетия выявили множество ассоциаций молекул комплекса HLA с различными заболеваниями, что позволяет на сегодняшний день использовать их в качестве биомаркера для оценки риска развития того или иного патологичсекого состояния.

Ассоциации гена HLA-DRB1 выявлены с широким спектром патологий. Так, неоднократно показана взаимосвязь аллелей HLA-DRB1 репродуктивными нарушениями. Мешета Т. с соавторами в своем мета-анализе выявили четыре аллеля, которые непосредственно связаны с выкидышами, а именно HLA-DRB1*04 (ОШ = 1.41, 95 % ДИ 1.05 – 1.90), HLA-DRB1*13 (ОШ = 0.63, 95 % ДИ 0.45 – 0.89), HLA-DRB1*14 (ОШ = 0.54, 95 % ДИ 0.31 – 0.94), HLA-DRB1*15 (ОШ = 1.57, 95 % ДИ 1.15 – 2.14) (Meuleman, 2015). Кроме того, ряд исследований указывает на связь HLA-DRB1 с репродуктивными потерями, связанными с HLA-совместимостью супругов (Grimstad et al., 2016; Singh et al., 2018; Kutteh et al., 2019). Кроме ассоциаций с репродуктивными неудачами, авторы подтверждают наличие ассоциаций аллелей и генотипов HLA-DRB1 с рядом других заболеваний.

В 2014 году S. Meisgen опубликовал работу, в которой отмечена роль *HLA-DRB1* в развитии врожденной блокады сердца (Meisgen et al., 2014). Известно, что у беременных женщин, которые имеют аутоиммунные заболевания, повышается риск развития осложнений и гибели плода (Sultana et al, 2017).

Атриовентрикулярная блокада развиватеся на 18-24 неделе внутриутробного развития, когда аутоантитела воздействуют на плод, вследствие чего развивается воспаление сердца, фиброз и кальцификация (Salomonsson et al., 2005). В исследовании выявлено два аллеля *HLA-DRB1*04* и *HLA-DRB10*3*, которые ассоциированы с развитием атриовентрикулярной блокадой сердца. При том, что *HLA-DRB1*04* увеличивает риск развития атриовентрикулярной блокады у ребенка в ответ на воздействие аутоантител Ro / SSA, а *HLA-DRB1*3* наоборот, обладает протективным эффектом.

При нормальной беременности в организме матери срабатывают механизмы толерантности к аллотрансплантанту для того, чтобы блокировать иммунный ответ матери на эмбрион в целях сохранения беременности (Mallia et al., 2012).

МНС-ассоциированного предпочтения у супругов обсуждается последнее десятилетие, включая предпочтения в отношении разнообразия (МНС-гетерозиготность) и совместимость родительских генотипов (Lie et al., 2010). Так, например, в ряде работ (Tregenza et al., 2000; Ziegler et al., 2005) показано, дисасотртативное предпочтение предполагает, что индивидуумы предпочитают партнера, отличающегося от себя по аллелям HLA, для избежания инбридинга и получения преимущества гетерозиготного потомства и устойчивости к инфекционным заболеваниям. Тенденция к увеличению гетерозиготного потомства у родителей показана в данном исследовании. Предпочтение МНС отличающегося партнера носит адаптивный характер, увеличивая генетическое разнообразие потомства, в виду того, что в большинстве случаев гетерозиготность наследуема (Hoffman et al., 2007).

С учетом ассоциаций аллелей *HLA-DRB1* с иммуновоспалительными заболеваниями, обращает внимание на себя приверженность в этой группе к образованию супружеских пар с общим *HLA-DRB1*04*. Неоднократные исследования показали, что данный аллель ассоциирован с иммунопатологией: ревматоидный артрит, инсулинозависимый сахарный диабет, псориаз и другие заболевания (Болдырева и др., 2006; Шабалдин, 2007). Высказано мнение, что презентация антигенов молекулой HLA-DR, кодируемой этим аллелем,

ассоциирована с выраженной активацией Т-хелперов, в том числе с частичной аутонаправленностью. Транспорируя это положение на иммунный ответ к ауто- и аллоантигенам в системе «мать-плод», можно предположить декомпенсацию воспалительного процесса в этой системе и развитие порока сердца у эмбриона как воспалительную эмбриопатию.

Надо отметить, что в отношении полиморфизма HLA чувствительность или устойчивость к инфекционному и паразитарному микроокружению оказывает селективное влияние. Так, формирование полиморфизмов антигенраспознающих сайтах молекул HLA I и II классов связано с естественным c отбором, ассоциированным инфекционным, паразитарным микроокружением (Болдырева, 2007). Особое значение имеет гетерозиготное предпочтение, реализующееся через сверхдоминантную селекцию резистентных к HLA инфекционным агентам аллелей. Ограничивающее действие на возрастающую популяционную гетерозиготность оказывает частотно-зависимая селекция. Учитывая феномен контролирования HLA через иммунного распознавания патогена, были получены эмпирические доказательства частотнозависимой селекции, которая реализуется таким образом, что специфические HLA гаплотипы, резистентные к одним инфекционным агентам, в то же время оказываются чувствительными к другим (Хаитов и др., 2006). Надо отметить, что ассоциированная чувствительность и резистентность к инфекционным агентам внутриутробно начинается К резидентным вирусам материнскому И К микробиому.

С позиции современного представления об иммунных механизмах формирования беременности, создание толерантности к полуаллогенному эмбриону связано с активацией Т-регуляторных маточных лимфоцитов (Т-reg utero), которые сенсибилизируются аллоантигенами отцовского происхождения посредством их распознавания совместно с собственными HLA II класса (HLA-DR, HLA-DQ) (Neefjes et al., 2011). Именно через этот феномен может происходить ограничение или активация эффекторного иммунного ответа цитотоксическими или киллерными лимфоцитами на полуаллогенный эмбрион.

Многочисленные исследования в рамках проекта «HLA и болезни» показали ассоциативные связи аллеля *HLA-DRB1*13* со слабыми собственными свойствами (Хаитов и др., 2016). Именно антигенными недостаточное представление «своего» может угнетать активацию T-reg utero. Данная лимфоцитов аллоспецифическое действие субпопуляция ограничивает Тцитоксических лимфоцитов. Кроме того, IL-10 и TGF-b, синтезируемые регуляторными Т-лимфоцитами, влияют на врожденный иммунитет, а значит на воспаление (Ярилин, 2010). Соответственно, недостаточная активация этой субпопуляции Т-хелперов будет влиять и на декомпенсацию воспалительного процесса в системе «мать-плод» и индукцию тератогенеза в сердечно-сосудистой системе.

Для *HLA-DRB1*10* значимых ассоциаций с иммунопатологией не выявлено. Вполне вероятно, что роль этого неунаследуемого материнского аллеля в детерминировании ВПС у плода связана также с его участием в презентации аллоантигенов иммуноцитам материнского микроокружения.

Надо отметить, что в настоящем исследовании частота встречаемости совместимости супругов, имеющих детей с ВПС, по *HLA-DRB1* была сопоставима с супругами, имеющими здоровых детей. Тем самым, факт нарушенного иммунного распознавания по HLA в системе «мать-плод» не ассоциирован с формированием ВПС.

Роль мужского *HLA-DRB1*09* как протективного генетического фактора в отношении риска формирования ВПС в последующем поколении остается не ясной, так как данный аллель не проявил себя при учете его наследования и ненаследования.

Регуляция иммунных взаимодействий в системе «мать-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 бэта (TGF-b) (Singh et al., 2013; Li, 2014; Chatterjee et al., 2014). Эти цитокины связаны с аутокринной регуляцией с особой субпопуляцией маточных Т-регуляторных лимфоцитов, которые непосредственно участвуют в торможении иммунного воспаления на ранних этапах беременности (Ширшев, 2005). 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 (Kowalik et al., 2018). Одна из важных функций ЭТИХ клеток связана, с одной стороны, со способностью распознавать эмбриональные HLA, экспрессируемые на полуаллогенном зародыше и эмбрионе, другой стороны, с супрессорным эффектом по отношению к цитотоксическим лимфоцитам (Mjosberg et al., 2010).

Несмотря на то, что в настоящем исследовании напрямую не была определенна роль данных лимфоцитов в торможении клеточных реакций материнских лимфоцитов против аллогенных по HLA супружеских лимфоцитов, менее продемонстрирован эффект женской аутосыворотки тем субпопуляции лимфоцитов. Если принять во внимание, что формирование ВПС связано с нарушенными иммунными взаимодействиями в системе «мать-плод», 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 нарушения в синтезе цитокинов могут определять данное 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-b), что позволяет ограничить иммунный конфликт в системе «мать-плод» (Газиева и др., 2014). IL-10 подавляет экспрессию HLA-DR на всех субпопуляциях лимфоцитов, в том числе, и на Т-лимфоцитах. Супрессорной функцией обладает и TGF-b (Ярилин, 2010).

Стимулировать экспрессию HLA-DR на лимфоцитах за счет аутокринного эффекта может IL-3 (Robertson et al., 2013). Тем самым, в отношении экспрессии HLA-DR на активированных женских Т-лимфоцитах при их взаимодействии с аллогенными по HLA лимфоцитами супруга, возможно, оказывают эффект и цитокины женской аутосыворотки. Рассматривая КБ женской аутосыворотки на субпопуляции лимфоцитов в СКЛ, можно сделать вывод о чрезмерной экспрессии и синтезе всех вышеописанных цитокинов, в частности IL-10, TGF-b и IL-3. Эта гиперсекреция усиливает иммунный конфликт в системе «мать-плод» 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-плод» (Koichi et al.,1999). Определение в настоящем исследовании КБ женской аутосыворотокой 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, женской сыворотке отсутствуют что в контрольной группе в факторы, блокирующие аллогеные ПО HLA-DR иммунные реакции женских активированных Т-лимфоцитов в СКЛ супругов, в то время как в отношении Влимфоцитов этот эффект присутствует. Не исключено, что подавление экспрессии HLA-DR на B-лимфоцитах женской аутосывороткой обусловлено наличием в ней аутоиммунных антител к собственным HLA-DR. Положительный эффект в контрольной группе женской аутосыворотки в отношении экспрессии HLA-DR на Т-лимфоцитах женских активированных предположительно связан преимущественным праймингом T2-Т3-хелперных лимфоцитов И интерлейкинов. секретируемых ИМИ Вполне вероятно, что женские активированные Т-лимфоциты в контрольной группе являются Т3-хелперами (Тактивация связана с регуляторным действием Т2-хелперных reg),

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 ВПС, нет ассиметричных антител к ауто HLA-DR, но есть выраженный синтез цитокинов как T2-, так и T3-хелперными лимфоцитами. IL-10 и TGF-b аутокринно угнетают Т3- хелперные лимфоциты, а IL-13, IL-4, IL-14 и IL-3 аутокринно чрезмерно активируют Т2-хелперные лимфоциты и через них В-лимфоциты. Одним из клинических эффектов этой стимуляции будет нарастание гуморальных факторов, вмешивающих 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 иммунных причин значением ДЛЯ диагностики риска формирования спорадических ВПС в эмбриональном периоде (Беленкова и др., 2013; Беленкова и др., 2014).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем диссертационном исследовании впервые изучена связь родительских иммуногенетических маркеров с предрасрасположенностью к развитию врожденных пороков сердца. Для того чтобы решить поставленные задачи, были использованы современные молекулярно-генетические и иммунологические методы исследования.

На первом этапе исследования проведен сравнительный анализ частоты встречаемости генотипов HLA-G 3UTR, в результате которого не было определено их патогенетической значимости в предрасположенности к развитию врожденных пороков сердца.

На следующем этапе исследования были определены рисковый женский аллель HLA-DRB1*10 и протективный мужской аллель HLA-DRB1*9. Кроме того установлено, что комбинации мужских и женских аллелей обладают патогенетической значимостью в отношении предрасположенности к развитию врожденных пороков сердца. Так, наиболее значимыми сочетаниями аллелей у мужчин оказалились 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), обладающие рисковым потенциалом, а для женщин выявлено сочетание HLA-DRB1*08/HLA-DRB1*11 (p = 0,038, ОШ = 0,13 ДИ 95 % 0,01 – 0,89), обладающее протективным эффектом.

Исходя из гипотезы о том, что совместимость супругов по HLA является одним из механизмов формирования иммунного конфликта по HLA в системе «мать-плод», было проведено сравнение частот встречаемости общих для супругов аллелей *HLA-DRB1*. Выявили, 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 %.

Используя современные иммунологические методы исследования была установлена следующая закономерность: уровень экспресии молекулы HLA-DR на активированных лимфоцитах различного фенотипа (CD3-HLA-DR+, CD3-HLA-DR+), культивированных в отличающихся условиях, может служить маркером риска развития врожденных пороков сердца.

Таким образом, в результате проведенного исследования определены основные маркеры, на основании которых разработана схема, показывающая роль иммунногенетических факторов в предрасположенности к развитию врожденных пороков сердца (рисунок 9).

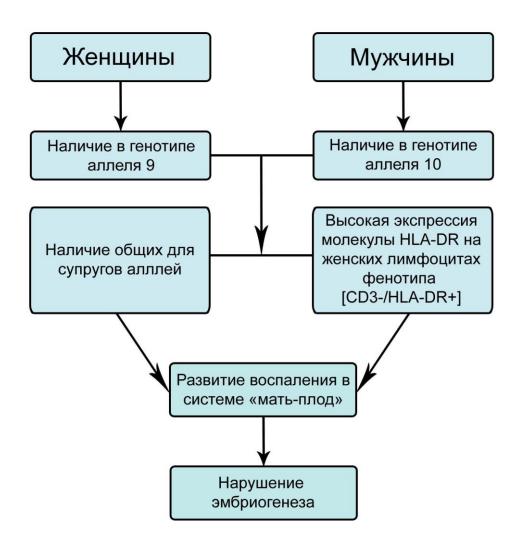


Рисунок 9 — Схема, показывающая влияние иммунногенетических факторов на предрасположенность к развитию врожденных пороков сердца

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 аллей для супругов контрольной группы не превышала 10 %; в семьях, имеющих детей с врожденными пороками сердца, частота встречаемости общих аллей составила 41 %.
- 3. Наследование рисковых и протективных аллелей *HLA-DRB1* от родителей к их 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.

приложение 1

Показатели коэффециента прироста и коэффециентов блокирования для женщин

| A | Контрольная группа | | | Основная группа | | | |
|--|--------------------|--------|-------|-----------------|--------|-------|------|
| Аналиты | Me | LQ | UQ | Me | LQ | UQ | р |
| КП СКЛ ЭТС CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ | -11,62 | -32,84 | 6,25 | -12,44 | -42,92 | 23,73 | 0,90 |
| КП СКЛ ЭТС CD3 ⁻ HLA-DR ⁺ | 16,2 | 1,28 | 77,34 | 7,25 | -4,28 | 54,4 | 0,38 |
| КП СКЛ ЭТС CD3 ⁻ HLA-DR ⁺ | 10,86 | -13,08 | 29,12 | 6,27 | -7,81 | 19,61 | 0,84 |
| КП СКЛ ayтo HLA-DR ⁺ | 6,757 | -0,12 | 23,39 | 18,89 | -2,64 | 46,34 | 0,38 |
| КБ СКЛ ЭТС/ ауто HLA-DR ⁺ | -44,69 | -93,29 | 122 | 75,08 | -66,8 | 379,7 | 0,11 |

приложение 2

Показатели коэффециента прироста и коэффециентов блокирования для мужчин

| | Контрольная группа | | | Основная группа | | | |
|--|--------------------|--------|-------|-----------------|--------|--------|------|
| Аналиты | Me | LQ | UQ | Me | LQ | UQ | p |
| КП СКЛ ЭТС CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ | 7,60 | -11,3 | 47,96 | 4,61 | -23,08 | 88,65 | 0,63 |
| КП СКЛ ЭТС CD3 ⁻ HLA-DR ⁺ | 14,03 | -8,30 | 46,27 | 5,91 | -5,54 | 13,1 | 0,19 |
| КП СКЛ ЭТС CD3 ⁻ HLA-DR ⁺ | 12,68 | 0,01 | 28,94 | 6,37 | -1,13 | 20,46 | 0,37 |
| КП СКЛ ауто CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ | -3,62 | -23,16 | 25,08 | -3,92 | -46,96 | 14,93 | 0,37 |
| КП СКЛ ауто CD3 ⁻ HLA-DR ⁺ | 18,58 | 3,16 | 60,58 | 0,82 | -3,60 | 32,08 | 0,03 |
| КП СКЛ ауто HLA-DR ⁺ | 14,31 | 1,02 | 27,7 | 2,19 | -2,05 | 15,23 | 0,10 |
| КБ СКЛ ЭТС/ауто CD3 ⁺ HLA DR ⁺ | -65,89 | -179,3 | 101,8 | -95,42 | -164,1 | -24,46 | 0,37 |
| КБ СКЛ ЭТС/ауто CD3 ⁻ HLA-DR ⁺ | -12,78 | -72,49 | 184,4 | -67,52 | -131,9 | 268,9 | 0,35 |
| КБ СКЛ ЭТС/ ауто HLA-DR ⁺ | 24,25 | -62,34 | 153,3 | -84,8 | -122,1 | 228,1 | 0,23 |

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

MHC – главный комплекс гистосовместимости (major histocompatibility complex)

HLA – главный комплекс гистосовместимости человека (Human Leucocyte

Antigens)

PLC – пептидный комплекс

АПК – антигенпрезентирующие клетки

TNF – фактор некроза опухоли

HSP – белки теплового шока

CD8+ – кластер дифференцировки 8

CD4+ - кластер дифференцировки 4

ВПС – врожденные пороки сердца

КЗЕДТА –3-х замещенная калиевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ПЦР – полимеразная цепная реакция

SDS – додецил сульфат натрия

РС-5 – перидинин-хлорофилл

РС-7 – перидинин-хлорофилл

CD45 – кластер дифференцировки 45

СКЛ – смешанная культура лимфоцитов

CD3 – кластер дифференцировки 3

FITS – флуорисцеин изотиоцианат

РЕ – фикоэритрин

КП – коэффициент прироста

КБ – блокирующий коэффициент

ЭКП – эффективный коэффициент прироста

ЭКБ – эффективный коэффициент блокирования

ОШ – отношение шансов

ДИ – доверительный интервал

SSI – боковое светорассеяние (side scatter)

FSL – прямое (малоугловое) светорассеяние (forward scatter)

ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Анализ антенатальных факторов риска формирования врожденных пороков внутренних органов у детей / Д. О. Иванов, Ю. В. Петренко, О. О. Шемякина, А. Ю. Фот // Бюллетень Федерального Центра сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова. 2012. Т. 1. С. 66-72.
- 2. Антонова, В.И. Роль экзогенных факторов в формировании врожденных пороков развития / В.И. Антонова, Е.В. Богачева, Ю.Ю. Китаева // Экология человека. 2010. Т. 6. С. 30-35.
- 3. Баклейчева, М.О. Роль экспрессии HLA I класса (G, E и C) в ранних репродуктивных потерях / М.О. Баклейчева, О.Н. Беспалова, Т.Э. Иващенко // Акушерство и гинекология. 2020. Т. 2. С. 30–36. DOI: 10.18565/aig.2020.2.30-36
- 4. Белозеров, Ю. М. Детская кардиология: рук-во / Ю. М. Белозеров. М.: МЕДпресс–информ, 2004. 600 с.
- 5. Белозеров, Ю. М. Распространенность врожденных пороков сердца у детей на современном этапе / Ю. М. Белозеров, Л. В. Брегель, В. М. Субботин // Российский вестник перинатологии и педиатрии. − 2014. − № 6. − С. 7–11.
- 6. Бокерия, Е. Л. Перинатальная кардиология: настоящее и будущее. Часть I: врожденные пороки сердца/ Е.Л. Бокерия // Российский вестник перинатологии и педиатрии. -2019. Т. 64, №. 3. С.5-10. DOI: 10.21508/1027-4065-2019-64-3-5-10
- 7. Бокерия, Л. А. Сердечно-сосудистая хирургия 2017. Болезни и врожденные аномалии системы кровообращения / Л. А. Бокерия, Р. Г. Гудкова. М.: Изд-во НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН, 2016. 100 с.
- 8. Бокерия, Л. А. Хирургическое лечение болезней системы кровообращения в Российской Федерации (2010–2014 гг.) / Л. А. Бокерия, И. Н. Ступаков, Р. Г. Гудкова // Вестн. Росздравнадзора. 2016. № 1. С.63–69.

- 9. Болдырева, М. Н. HLA (класс II) и естественный отбор. «Функциональный» генотип, гипотеза преимущества «функциональной» гетерозиготности: дис. ... д-ра мед. наук. / М. Н. Болдырева. Москва, 2007 318 с.
- 10. Болдырева, М.Н. HLA и естественный отбор. Гипотеза «преимущества функциональной гетерозиготности» / М.Н. Болдырева, Л.П. Алексеев // Иммунология. 2006. Т.27, №3. С. 172–176.
- Газиева, И.А., Роль нарушений продукции цитокинов в генезе плацентарной недостаточности и ранних репродуктивных потерь / И.А. Газиева, Г.Н. Чистякова, И.И. Ремизова // Медицинская иммунология. 2014. –Т.16, № 6. С. 539–550.
- 13. Гордеева, Л.А. Влияние неунаследованных родительских HLA на иммунный ответ у потомства / Л.А. Гордеева, А.В. Шабалдин, А.Н.Глушков // Медицинская Иммунология. 2006. Т 8, № (5-6). С.587–596.
- 14. Демикова, Н. С. Врожденные пороки развития в регионах Российской Федерации (итоги мониторинга за 2000–2010 гг.) / Н. С. Демикова, А. С. Лапина// Рос. вестн. перинатологии и педиатрии. -2012. -№ 2. -С. 91–98.
- 15. Иммунология / Д. Мейл, Дж. Бростофф, Д.Б. Рот, А.Ройт. 7-е изд. М.,2007. 568 с.
- 16. Клинические рекомендации по ведению детей с врожденными пороками сердца / под ред. Л. А. Бокерия. Москва: НЦССХ им. А.Н. Бакулева; 2014. 342 с.
- 17. Ляпин, В. А. Социально значимая патология детского населения промышленного центра Западной Сибири / В. А. Ляпин // Сибирь—Восток. -2005. N $\underline{\ }$ $\underline{\ }$ 3. С 9–11.
- 18. Маянский, Н. А., Маянский, А. Н. Номенклатура и функции главного комплекса гистосовместимости человека / Н. А. Маянский, А. Н. Маянский // Иммунология. 2006. Т. 27, № 1. С. 43–46.
- 19. Мирзаян, Э. И. Структура инвалидности вследствие врожденных аномалий (пороков развития) у детей с учетом тендерных особенностей / Э. И. Мирзаян //

- Вестн. Всероссийского общества специалистов по медико—социальной экспертизе, реабилитации и реабилитационной индустрии. М., 2011. № 3. С. 31–36.
- 20. Мутафьян, О. А. Пороки и малые аномалии сердца у детей и подростков / О. А. Мутафьян. СПб.: СПбМАПО, 2005. 479 с.
- 21. Особенности течения физиологической беременности на ранних сроках / И. С. Липатов, Ю. В. Тезиков, Н. А. Краснова // Здоровье женщины-основа здоровья будущих поколений. 2016. С. 87–90.
- 22. Показатели аллогенных взаимодействий лимфоцитов супругов как дополнительные диагностические и прогностические критерии иммунных форм репродуктивных потерь / О.В. Беленкова, В.Г. Мозес, А.В. Шабалдин, Г.В. Лисаченко // Саратовский научно-медицинский журнал. − 2013. Т. 4, № 9. − С.649−652.
- 23. Пол У. Иммунология. Том 1. Иммунология: В 3-х т. 1. Пер. с англ. /Под ред. У. Пола. М.: Мир, 1987 1988. 472 с
- 24. Саперова, Е.В. Врожденные пороки сердца у детей: распространенность, факторы риска, смертность / Е.В. Саперова, И.В. Вахлова // Вопросы современной педиатрии. 2017. Т.16, № 2. С. 126–133.
- 25. Сухих, Г.Т. Иммунные механизмы в физиологии и патологии беременности / Г.Т. Сухих, Л.В. Ванько // Russian journal of immunology. 2005. Т. 9, № 2. С. 24–25.
- 26. Фальковский, Г.Э. Сердце ребенка: книга для родителей о врожденных пороках сердца / Г.Э. Фальковский, С.М. Крупянко. М.: Никея, 2011. 232 с.
- 27. Хаитов, Р.М. Генетика иммунного ответа / Р.М. Хаитов, Л.П. Алексеев // Internat. J. Immunorehab. 1998. № 10. С. 30–37.
- 28. Хаитов, Р.М. Новые представления о функции главного комплекса генов иммунного ответа человека (HLA и естественный отбор) / Р.М. Хаитов, Л.П. Алексеев, М.Н. Болдырева // Физиологический журнал им. Сеченова. 2006. Т. 92, \mathbb{N} 4. С. 393—401.
- 29. Характер аллогенных взаимодействий супругов в кратковременной смешанной культуре при иммунных формах репродуктивных потерь / О.В.

- Беленкова, В.Г. Мозес, А.В. Шабалдин, Е.В. Шабалдина // Журнал теоретической и клинической медицины (Узбекистан). 2014. Т. 3, № 1. С. 219–222.
- 30. Характер распределения антигенов системы HLA у супружеских пар с репродуктивными расстройствами / А.Н. Киселева, Е.В. Бутина, Н.В. Исаева и др. // Акушерство, Гинекология и Репродукция. 2019. Т.13, № 2. С. 111-118.
- 31. Чистякова Г.Н., Шабалдин А.В., Беленкова О.В., Мозес В.Г., Матвеева В. Г., Шабалдина Е. В., Ремизова И. И., Газиева И. А. Патент РФ №2581925 «Способ определения аллогенного иммунного ответа в кратковременной смешанной культуре лимфоцитов неродственных доноров», опубликовано 20.02.2016, бюл. №5;
- 32. Шабалдин, А. В. Иммуногенетические аспекты раннего онтогенеза: автореф. дис. . . . д–ра мед. наук: 14.00.36 / А. В. Шабалдин. Челябинск, 2007. 38 с.
- 33. Швецов, Я.Д. Полиморфизм генов сигнального каскада арилгидрокарбонового рецептора и его вклад в формирование врожденных дефектов межпредсердной и межжелудочковой перегородки сердца: дис. ...канд-та мед. наук: 03.02.07 / Я.Д. Швецов. Курск, 2014. 131 с.
- 34. Ширшев, С.В. Гормональные механизмы регуляции иммунной системы в период беременности / С.В. Ширшев // Успехи соврем. биологии. 2005. Т. 6. С. 555—566
- 35. Школьникова, М. А. Основные тенденции заболеваемости и смертности от сердечно–сосудистых заболеваний детей и подростков в Российской Федерации / М. А. Школьникова, И. В. Абдулотипова, С. Ю. Никитина // Рос. вестнперинатологии и педиатрии. − 2008. − № 4. − С. 4–14.
- 36. Эпидемиологическая характеристика врожденных пороков сердца и крупных сосудов у детей города Омска / Е. В. Богачев, О. В.Антонов, С. И. Артюкова, Г. П. Филиппов // Сибирский медицинский журнал. 2011. Том 26, №1(1). С 154—158.
- 37. Ярилин А. А. Иммунологии: учебник / А.А. Ярилин.М: Изд-во «ГЭОТАР-Медиа», 2010: 740 с

- 38. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts / S. Kovats, E. K. Main, C. Librach, et al. // Science. 1990. Vol. 248, № 4952. P. 220–223. DOI: 10.1126/science.2326636
- 39. A genomic perspective on HLA evolution / D. Meyer, V. R. Aguiar, B. D. Bitarello, et.al. // Immunogenetics. 2018. Vol. 70, № 1. P. 5-27. DOI: 10.1007/s00251-017-1017-3
- 40. A role for both HLA-F and HLA-G in reproduction and during pregnancy? / G. Persson, N. Jørgensen, L. L. Nilsson, et al. // Human immunology. 2020. Vol.81, № 4. P. 127-133. DOI: 10.1016/j.humimm.2019.09.006
- 41. Adams, K.M. Microchimerism: an investigative frontier in autoimmunity and transplantation/ K.M. Adams, J.L. Nelson // JAMA. 2004. Vol.291, № 9. P.1127–1131. DOI: 10.1001/jama.291.9.1127
- 42. Agnaeva, A. O. Early embryonic losses at HLA compatibility in married couples / A. O. Agnaeva, O. N. Bespalova // Journal of obstetrics and woman disease. 2015. Vol. 64, № 3. P. 69–80.
- 43. Alecsandru, D. Immunology and human reproduction / D. Alecsandru, J. A. García-Velasco //Current Opinion in Obstetrics and Gynecology. − 2015. − Vol. 27,№. 3. − P. 231–234. DOI: 10.1097/GCO.000000000000174.
- 44. Amodio, G. (2020). HLA-G genotype/expression/disease association studies: success, hurdles, and perspectives / G. Amodio, S. Gregori // Frontiers in Immunology. 2020. Vol.11. P.1178. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01178
- 45. Andrews, R.C. Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets / R.C. Andrews, B.R.Walker // Clin Sci Lond. 1999. Vol. 96. P. 513–523. DOI: 10.1042/cs0960513
- 46. Antibacterial medication use during pregnancy and risk of birth defects: the National Birth Defects Prevention Study / K.S. Crider, M.A. Cleves, J. Reefhuis, et al. // Arch Pediatr Adolesc Med. − 2009. − Vol.163, № 11. − P. 978–985. DOI: 10.1001/archpediatrics.2009.188

- 47. Antihypertensive medication use during pregnancy and the risk of cardiovascular malformations / A.R. Caton, E.M. Bell, C.M. Druschel, et al. // Hypertension. 2009. Vol. 54, № 1. P. 63–70. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.129098
- 48. Congenital heart disease in the general population. Changing prevalence and age distribution / A J. Marelli, A.S. Mackie, R. Ionescu-Ittu, et al. // Circulation. 2007. Vol. 115. P. 163–172. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.627224
- 49. Assisted reproductive technology and major structural birth defects in the United States / J. Reefhuis, M.A. Honein, L.A.Schieve, et al. // Human reproduction. 2009. Vol. 24, № 2. P. 360–366. DOI: 10.1093/humrep/den387
- 50. Association between alcohol consumption during pregnancy and risks of congenital heart defects in offspring: meta-analysis of epidemiological observational studies / Z. Wen, D. Yu, W. Zhang, et al. // Italian journal of pediatrics. -2016. Vol. 42, Nole 1. P. 12. DOI: 10.1186/s13052-016-0222-2
- 51. Association Between Maternal Folic Acid Supplementation and Congenital Heart Defects in Offspring in Birth Cohorts From Denmark and Norway / N. Øyen, S. F. Olsen, S. Basit, et al. // Journal of the American Heart Association. − 2019. − Vol. 8, № 6. − P. e011615. DOI: 10.1161/JAHA.118.011615
- 52. Association between maternal-fetal HLA-DR relationships and fetal growth / C. Hoff, K. J. Peevy, J. A. Spinnato // American Journal of Reproductive Immunology. 1993. Vol. 30, № 4. P. 246–253. DOI: 10.1111/j.1600-0897.1993.tb00626.x
- 53. Autoimmune thyroid disorders / A. Antonelli, S.M. Ferrari, A. Corrado, et al. // Autoimmunity reviews. − 2015. − Vol. 14, №2. − P. 174–180. DOI: 10.1016/j.autrev.2014.10.016
- 54. Barton, A. Genetic susceptibility to rheumatoid arthritis: an emerging picture / A. Barton, J. Worthington // Arthritis and rheumatism. 2009. Vol. 61, № 10. P. 1441–1446. DOI: 10.1002/art.24672
- 55. Birth prevalence of congenital heart disease worldwide: a systematic review and meta-analysis / D. Van der Linde, E. E. Konings, M. A. Slager, et al. // J Am. Coll. Cardiol. 2011. Vol. 58, № 21. P. 2241–2247. DOI: 10.1016/j.jacc.2011.08.025

- 56. Blackwell, J.M. HLA and infectious diseases / J.M. Blackwell, S.E. Jamieson, D. Burgner // Clinical microbiology reviews. 2009. Vol.22, № 2. P.370–385. DOI: 10.1128/CMR.00048-08
- 57. Bodis, G. Role of human leukocyte antigens (HLA) in autoimmune diseases / G. Bodis, V. Toth, A. Schwarting // Rheumatology and therapy. 2018. Vol. 5, № 1. P. 5–20. DOI: 10.1007/s40744-018-0100-z
- 58. Botto, L.D. Occurrence of congenital heart defects in relation to maternal mulitivitamin use / L.D. Botto, J. Mulinare, J.D. Erickson // Am J Epidemiol. 2000. Vol. 151, №9. P. 878–884. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a010291
- 59. Carlson, B. M. Human Embryology and Developmental Biology / B.M. Carlson // Elsevier Health Sciences. 2018. 520 p.
- 60. Carmichael, S.L. Maternal life event stress and congenital anomalies / S.L. Carmichael, G.M. Shaw // Epidemiology. 2000. Vol. 11, №1. P. 30–35. DOI: 10.1097/00001648-200001000-00008
- 61. Changes in maternal serum transforming growth factor beta-1 during pregnancy: a cross-sectional study / M. Singh, N. C. Orazulike, J. Ashmore, J. C.Konje // BioMed research international. 2013. Vol. 2013. DOI: 10.1155/2013/318464
- 62. Christiansen, O.B. A fresh look at the causes and treatments of recurrent miscarriage, especially its immunological aspects / O.B. Christiansen // Human Reproduction Update. 1996. Vol.2, № 4. P.271–293. DOI: 10.1093/humupd/2.4.271
- 63. Chronic hypertension with related drug treatment of pregnant women and congenital abnormalities in their offspring: a population based study / F. Banhidy, N. Acs, E.H. Puho, A.E. Czeizel // Hypertension research: official journal of the Japanese Society of Hypertension. − 2011. − Vol. 34, № 2. − P.257–263. DOI: 10.1038/hr.2010.227
- 64. Complex relation of HLA-DRB1* 1501, age at menarche, and age at multiple sclerosis onset / R. Bove, A. S. Chua, Z. Xia, et al. // Neurology Genetics. -2016. Vol. 2, N 4. P. e88. DOI: 10.1212/NXG.0000000000000088

- 65. Congenital abnormalities in the offspring of pregnant women with type 1, type 2, and gestational diabetes mellitus: a population-based case-control study / F. Banhidy, N. Acs, E.H. Puho, et al. // Congenital anomalies. -2010. Vol. 50, N 2. P. 115–121.
- 66. DOI: 10.1111/j.1741-4520.2010.00275.x
- 67. Congenital heart defects and maternal genetic, metabolic, and lifestyle factors / C.A. Hobbs, S.L. MacLeod, S. Jill James, et al. // Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology. − 2011. − Vol. 91, № 4. − P. 195–203. DOI: 10.1002/bdra.20784
- 68. Dausset, J. The birth of MAC / J. Dausset // Vox Sang. 1984. Vol. 46, № 4. P. 235–237. DOI: 10.1111/j.1423-0410.1984.tb00080.x
- 69. Dev, D. Maternal tobacco consumption during pregnancy and risk of congenital heart diseases in offspring / D. Dev, R. Sharma, M. Sharma // International Journal of Contemporary Pediatrics. − 2018. − Vol. 5, № 3. − P. 1023. DOI: http://dx.doi.org/10.18203/2349-3291.ijcp20181534
- 70. Diabetes mellitus and birth defects / A. Correa, S. M. Gilboa, L. M. Besser, et al. // American journal of obstetrics and gynecology. − 2008. − Vol. 199, № 3. − P. 237.e1-9. DOI: 10.1016/j.ajog.2008.06.028
- 71. Diagnosis and treatment of fetal cardiac disease: a scientific statement from the American Heart Association / M. T. Donofrio, A. J. Moon-Grady, L. K. Hornberger, et al. // Circulation. − 2014. − Vol. 129, № 21. − P. 2183–2242. DOI: 10.1161/01.cir.0000437597.44550.5d
- 72. Effect of family socioeconomic status on the prognosis of complex congenital heart disease in children: an observational cohort study from China / L. Xiang, Z. Su, Y. Liu, et al. // The Lancet Child & Adolescent Health. − 2018. − Vol. 2, №. 6. − P. 430–439. DOI: 10.1016/S2352-4642(18)30100-7
- 73. Environmental risk factors for congenital heart disease in the Shandong Peninsula, China: a hospital-based case-control study / S. Liu, J. Liu, J. Tang, et al. // J Epidemiol. 2009. Vol. 19. P. 122–130. DOI: 10.2188/jea.je20080039

- 74. Erlebacher, A. Immunology of the maternal-fetal interface / A. Erlebacher // Annu Rev Immunol. 2013. Vol.31. P. 387-411. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032712-100003
- 75. Evaluation of HLA-G 14-bp ins/del and+ 3142G> C polymorphisms with susceptibility to recurrent spontaneous abortion / M. Hashemi, M. Mokhtari, S. Khazaeian, et al. // Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology. − 2017. − Vol.56, №3. − P. 276-280. DOI: 10.1016/j.tjog.2017.04.002
- 76. Evidence for a selective migration of fetus-specific CD4+ CD25bright regulatory T cells from the peripheral blood to the decidua in human pregnancy / T. Tilburgs, D. L. Roelen, , B. J. van der Mast, et al. // The Journal of Immunology. − 2008. − Vol. 180, № 8. − P. 5737–5745. DOI: 10.4049/jimmunol.180.8.5737
- 77. Favier, B. Functions of HLA-G in the immune system / B. Favier, J. LeMaoult, E. D.Carosella // Tissue Antigens. 2007. Vol. 69. P. 150-152. DOI: 10.1111/j.1399-0039.2006.763_6.x
- 78. First-trimester use of paroxetine and congenital heart defects: a population-based case-control study / M.K. Bakker, W.S. Kerstjens-Frederikse, C.H. Buys, et al. // Birth Defects Res A. 2010. Vol. 88. P. 94–100. DOI: 10.1002/bdra.20641
- 79. Foissac, A. Microsatellites in the HLA region: 1999 update / A. Foissac, M. Salhi, A. Cambon-Thomsen // Tissue antigens. 2000. Vol. 55, № 6. P.477–509. DOI: 10.1034/j.1399-0039.2000.550601.x
- 80. Folate deficiency and folic acid supplementation: the prevention of neural-tube defects and congenital heart defects / A. E. Czeizel, I. Dudas, A. Vereczkey, F. Banhidy // Nutrients. 2013. Vol. 5, № 11. P. 4760–4775. DOI: 10.3390/nu5114760
- 81. Folate deficiency and folic acid supplementation: the prevention of neural-tube defects and congenital heart defects / A.E. Czeizel, I. Dudas, A. Vereczkey, F. Banhidy // Nutrients. 2013. Vol.5, № 11. P. 4760–4775. DOI: 10.3390/nu5114760
- 82. FOXP3+ regulatory T cells and T helper 1, T helper 2, and T helper 17 cells in human early pregnancy deciduas / J. Mjosberg, G. Berg, M.C. Jenmalm, J. Ernerudh // Biol Reprod. 2010. Vol. 82, № 4. P. 698–705. DOI: 10.1095/biolreprod.109.081208

- 83. Functional characterization of HLA-F and binding of HLA-F tetramers to ILT2 and ILT4 receptors / E. J. Lepin, J. M. Bastin, D. S. Allan, et al. // European journal of immunology. 2000. − Vol. 30, № 12. − P. 3552-3561. DOI: 10.1002/1521-4141(200012)30:12<3552::AID-IMMU3552>3.0.CO;2-L
- 84. Gelb, B. D. History of our understanding of the causes of congenital heart disease / B. D. Gelb // Circulation: Cardiovascular Genetics. 2015. Vol. 8, № 3. P. 529–536. DOI: 10.1161/CIRCGENETICS.115.001058
- 85. Genetic risk factors for pediatric-onset multiple sclerosis / M. A. Gianfrancesco, P. Stridh, X. Shao, et al. // Multiple Sclerosis Journal. 2018. Vol. 24, № 14. P. 1825–1834. DOI: 10.1177/1352458517733551
- 86. Gerlinskaya, L. Allogenic stimulation in early pregnancy improves pre-and postnatal ontogenesis in BALB/cLac mice / L. Gerlinskaya, M. Moshkin, V. Evsikov // Journal of Reproduction and Development. 2000. Vol. 46, № 6. P. 387–396.
- 87. Glushkov, A. N. Immunological mechanisms of adaptation to the low-weight chemical compounds in ontogenesis / A. N. Glushkov // Medical Hypotheses. 2003. Vol. 61, № 3. P. 405–411.
- 88. Goldberg, A. C. MHC structure and function—antigen presentation. Part 1 / A. C. Goldberg, L. V. Rizzo // Einstein (Sao Paulo). 2015. Vol.13, №1. P. 153–156. DOI: 10.1590/S1679-45082015RB3122
- 89. Gras, S. A structural voyage toward an understanding of the MHC-I-restricted immune response: lessons learned and much to be learned / S. Gras, S.R. Burrows, S. J.Turner // Immunological reviews. − 2012. − Vol. 250, № 1. − P. 61–81. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2012.01159.x
- 90. Grimstad, F. Immunogenetic contributions to recurrent pregnancy loss / F. Grimstad, S. Krieg // Journal of assisted reproduction and genetics. 2016. Vol. 33, № 7. P. 833–847. DOI: 10.1007/s10815-016-0720-6
- 91. Herskind, A. M. Increased prevalence of congenital heart defects in monozygotic and dizygotic twins / A. M. Herskind, D. A. Pedersen, K. Christensen // Circulation. 2013. Vol. 128, № 11. P. 1182–1188.

DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002453

- 92. HLA associations and HLA sharing in recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis / T. Meuleman, L. E. Lashley, O. M. Dekkers, et. al. // Human immunology. 2015. Vol. 76, № 5. P. 362–373. DOI: 10.1016/j.humimm.2015.02.004
- 93. HLA compatibility and organ transplant survival. Collaborative Transplant Study / G. Opelz, T. Wujciak, B. Döhler, et al. // Reviews in immunogenetics. − 1999. − Vol.1, № 3. − P. 334–342.
- 94. HLA mismatches that are identical for the antigen recognition domain are less immunogenic / D. Roelen, Y. de Vaal, C. Vierra-Green, et al. // Bone marrow transplantation. 2018. Vol.53, №6. P. 729. DOI: 10.1038/s41409-018-0108-6
- 95. HLA-DR in couples associated with preeclampsia: background and updating by DNA sequencing / I. de Luca Brunori, L. Battini, M. Simonelli, et al. // Journal of reproductive immunology. − 2003. − Vol. 59, № 2. − P. 235–243. DOI: 10.1016/s0165-0378(03)00050-0
- 96. HLA-G and HLA-E: fundamental and pathophysiological aspects / E. D. Carosella, P. Paul, P. Moreau, N. Rouas-Freiss // Immunology today. − 2000. − Vol.21, № 11. − P 532-534.
- 97. HLA-G: At the interface of maternal–fetal tolerance / L. M. Ferreira, T. B. Meissner, T. Tilburgs, J. L. Strominger // Trends in immunology. 2017. Vol. 38, № 4. P. 272–286. DOI: 10.1016/j.it.2017.01.009
- 98. Holoshitz, J. The quest for better understanding of HLA-disease association: scenes from a road less travelled by / J. Holoshitz // Discovery medicine. -2013. Vol. 16, N87. P. 93-101.
- 99. Howell, W. M. The HLA system: immunobiology, HLA typing, antibody screening and crossmatching techniques / W. M. Howell, V. Carter, B. Clark // Journal of Clinical Pathology. 2010. Vol.63, №5. P. 387–390. DOI: 10.1136/jcp.2009.072371
- 100. Hrusca A. Congenital heart defects and associated comorbidities -5 years of experience / A. Hrusca, S. Cainap, A. L. Rachisan, et al. // HVM Bioflux. -2013. Vol. 5, No. 2. P. 62–65.

- 101. http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html
- 102. http://www.eurocat-network.eu/content/Special-Report-Env-Risk-I-and-II.pdf
- 103. Hughes, A. L., Nei, M. Evolutionary relationships of the classes of major histocompatibility complex genes / A. L. Hughes, M. Nei // Immunogenetics. 1993. Vol. 37, № 5. P. 337–346. DOI: 10.1007/BF00216798
- 104. Human HLA-G+ extravillous trophoblasts: Immune-activating cells that interact with decidual leukocytes / T. Tilburgs, Â. C. Crespo,A. van der Zwan, et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2015. Vol. 112, № 23. P. 7219–7224. DOI: 10.1007/BF00216798
- 105. Incidence of congenital heart disease in Beijing, China / X. Y. Yang, X. F. Li, X. D. Lu, et al. // Chin. Med. J (Engl). 2009. Vol. 122, № 10. P. 1128–1132.
- 106. Innate immune cells in reproduction / Y. Negishi, H. Takahashi, Y. Kuwabara, T. Takeshita // Journal of Obstetrics and Gynaecology Research. 2018. Vol. 44, № 11. P. 2025–2036. DOI: 10.1111/jog.13759
- 107. Interaction of HLA-DRB1* alleles and CTLA4 (+ 49 AG) gene polymorphism in autoimmune thyroid disease / S. Ramgopal, C. Rathika, M. R. Padma, et al. // Gene. 2018. Vol.642. P. 430–438. DOI: 10.1016/j.gene.2017.11.057
- 108. Is maternal parity an independent risk factor for birth defects? / H. T. Duong, A. T. Hoyt, S. L. Carmichael, et al. // Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology. 2012. Vol. 94, № 4. P. 230–236. DOI: 10.1002/bdra.22889 109. Is maternal smoking during pregnancy associated with an increased risk of congenital heart defects among offspring? A systematic review and meta-analysis of observational studies / D. Zhang, H. Cui, L. Zhang, et al. //The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine. 2017. Vol. 30, № 6. P. 645–657. DOI: 10.1080/14767058.2016.1183640
- 110. Källén, B. A. J. Maternal drug use in early pregnancy and infant cardiovascular defect / B. A. J. Källén, P. O. Olausson // Reprod Toxicol. 2003. Vol. 17, № 3. P. 255–261. DOI: 10.1016/s0890-6238(03)00012-1

- 111. Klein, J., Sato, A. The HLA system / J. Klein, A. Sato // The New England Journal of Medicine. 2000. Vol. 343, № 11. P. 782–786. DOI: 10.1056/NEJM200009073431006
- 112. Koichi, I. Possible mechanisms of immunotherapy for maintaining pregnancy in recurrent spontaneous aborters: analysis of anti-idiotypic antibodies directed against autologous T-cell receptors / I. Koichi, T. Tadao, T. Norio // Human Reproduction. − 1999. Vol. 14, № 3. P. 650–655. DOI: 10.1093/humrep/14.3.650
- 113. Kousseff, B.G. Diabetic embryopathy / B.G. Kousseff // Current opinion in pediatrics. -1999. Vol. 11, № 4. P. 348–352. DOI: 10.1097/00008480-199908000-00014
- 114. Kowalik, M. K. Expression of membrane progestin receptors (mPRs) in the bovine corpus luteum during the estrous cycle and first trimester of pregnancy / M. K. Kowalik, R. Rekawiecki, J. Kotwica // Domestic animal endocrinology. 2018. Vol. 63. P. 69–76. DOI: 10.1016/j.domaniend.2017.12.004
- 115. Kuciene, R. V Maternal socioeconomic and lifestyle factors during pregnancy and the risk of congenital heart defects / R. Kuciene, V. Dulskiene // Medicina Kaunas . 2009. Vol. 45. P. 904–909.
- 116. Kutteh, W. H. Immunology and reproduction / W. H. Kutteh, A. K. Stanic, D. J.Schust // Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology. Content Repository Only!, 2019. P. 301-321. e3.
- 117. Lennestal, R. Maternal use of antihypertensive drugs in early pregnancy and delivery outcome, notably the presence of congenital heart defects in the infants / R. Lennestal, O. P. Olausson, B. Kallen // Eur J Clin Pharmacol. 2009. Vol. 65. P. 615–625. DOI: 10.1007/s00228-009-0620-0
- 118. Li, Q. Transforming growth factor β signaling in uterine development and function / Q. Li // J Anim Sci Biotechnol. 2014. Vol. 5, No 1. P. 52. DOI: 10.1186/2049-1891-5-52
- 119. Li, X.C. Structure and function of major histocompatibility complex class I antigens / X.C. Li, M. Raghavan // Current opinion in organ transplantation. 2010. Vol. 15, № 4. P. 499–504. DOI: 10.1097/MOT.0b013e32833bfb33

- 120. Lie, H. C. Genetic dissimilarity, genetic diversity, and mate preferences in humans / H. C. Lie, L. W. Simmons, G. Rhodes // Evolution and Human Behavior. $2010. \text{Vol.}\ 31$, No $1. \text{P.}\ 48-58$. DOI: $10.1016/\text{j.evolhumbehav.}\ 2009.07.001$
- 121. Lower frequency of HLA-DRB1 type 1 diabetes risk alleles in pediatric patients with MODY / I. Urrutia, R. Martínez, T. López-Euba, et al. // PloS one. 2017. Vol. 12, № 1. P. e0169389. DOI: 10.1371/journal.pone.0169389
- 122. Major congenital malformations after first-trimester exposure to ACE inhibitors / W. O. Cooper, S. Hernandez-Diaz, P. G. Arbogast, et al. // N. Engl. J. Med. 2006. Vol. 354, № 23. P. 2443–2451. DOI: 10.1056/NEJMoa055202
- 123. Mallia, J. V. Role of HLA in human pregnancy / J. V. Mallia, D. K. Das, A. Maitra // International Journal of Human Genetics. 2012. Vol. 12, № 1. P. 33–36. DOI: 10.1080/09723757.2012.11886159
- 124. Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero / J. E. Mold, J. Michaëlsson, T. D. Burt, et al. // Science. 2008. Vol. 322, № 5907. P. 1562–1565. DOI: 10.1126/science.1164511
- 125. Maternal cocaine administration during pregnancy induces apoptosis in fetal rat heart / Y. Xiao, D. Xiao, J. He, L. Zhang // J Cardiovasc Pharmacol. 2001. Vol. 37. P. 639–648. DOI: 10.1097/00005344-200106000-00001
- 126. Maternal exposure to angiotensin converting enzyme inhibitors in the first trimester and risk of malformations in offspring: a retrospective cohort study / D. K. Li, C. Yang, S. Andrade, et al. // Bmj. 2011. Vol. 343. d5931. DOI: 10.1136/bmj.d5931
- 127. Maternal folic acid supplementation and the risk of congenital heart defects in offspring: a meta-analysis of epidemiological observational studies / Y. Feng, S. Wang, R. Chen, et al. // Scientific reports. 2015. Vol. 5. P. 8506. DOI: 10.1038/srep08506
- 128. Maternal hyperhomocysteinaemia is a risk factor for congenital heart disease / A.C. Verkleij-Hagoort, M. Verlinde, N.T. Ursem, et al. // BJOG: an international journal of obstetrics and gynaecology. − 2006. − Vol. 113, № 12. − P. 1412–1418.

DOI: 10.1111/j.1471-0528.2006.01109.x

- 129. Maternal lead exposure and risk of congenital heart defects occurrence in offspring / Z. Liu, Y. Yu, X. Li, et al. // Reproductive Toxicology. 2015. Vol. 51. P.1–6. DOI: 10.1016/j.reprotox.2014.11.002
- 130. Maternal periconceptional alcohol consumption and risk for conotruncal heart defects / S.L. Carmichael, G.M. Shaw, W. Yang, E.J. Lammer // Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2003. Vol.67, № 10. P.875–878. DOI: 10.1002/bdra.10087
- 131. Maternal smoking and congenital heart defects in the Baltimore-Washington Infant Study / C. J. Alverson, M. J. Strickland, S. M. Gilboa, A. Correa // J. Pediatr. 2011. Vol. 127, № 3. P. e647–e653. DOI: 10.1542/peds.2010-1399
- 132. Maternal Socioeconomic Status and the Risk of Congenital Heart Defects in Offspring: A Meta-Analysis of 33 Studies / D. Yu, Y. Feng, L. Yang, et al. // PLoS ONE. 2014. Vol.9, № 10. P.e111056. DOI: 10.1371/journal.pone.0111056
- 133. Maternal stressful life events and risks of birth defects / S.L. Carmichael, G.M. Shaw, W. Yang, et al. // Epidemiology. 2007. Vol. 18, № 3. P. 356–361. DOI: 10.1097/01.ede.0000259986.85239.87
- 134. Maternal use of bupropion and risk for congenital heart defects / S. Alwan, J. Reefhuis, L.D. Botto, et al. // Am J Obstet Gynecol. 2010. Vol.203. P. 52 e51–52 e56. DOI: 10.1016/j.ajog.2010.02.015
- 135. Maternal use of opioids during pregnancy and congenital malformations: a systematic review / J. N. Lind, J. D. Interrante, E. C. Ailes, et al. // Pediatrics. 2017. Vol. 139, № 6. P. e20164131. DOI: 10.1542/peds.2016-4131
- 136. National Birth Defects Prevention Study: Association between reported venlafaxine use in early pregnancy and birth defects: the National Birth Defects Prevention Study, 1997–2007 / K.N. Polen, S.A. Rasmussen, T. Riehle-Colarusso, J. Reefhuis // Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2013. Vol. 97. P. 28–35. DOI: 10.1002/bdra.23096
- 137. Nelson, J. L. HLA relationships of pregnancy, microchimerism and autoimmune disease / J. L. Nelson //Journal of reproductive immunology. − 2001. − Vol. 52, № 1-2. − P. 77–84. DOI: 10.1016/s0165-0378(01)00116-4

- 138. Noninherited risk factors and congenital cardiovascular defects: current knowledge: a scientific statement from the American Heart Association Council on Cardiovascular Disease in the Young: endorsed by the American Academy of Pediatrics / K. J. Jenkins, A. Correa, J. A Feinstein , et al. // Circulation. 2007. Vol. 115, № 23. P. 2995–3014. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.183216
- 139. Ober, C. Studies of HLA, fertility and mate choice in a human isolate / C. Ober // Hum. Reprod. 1999. Vol. 5, № 2. P. 103–107. DOI: 10.1093/humupd/5.2.103
- 140. Pos, W. Mechanisms of peptide repertoire selection by HLA-DM / W. Pos, D. K. Sethi, K. W. Wucherpfennig //Trends in immunology. 2013. Vol. 34, №. 10. P. 495–501. DOI: 10.1016/j.it.2013.06.002
- 141. Prenatal alcohol exposure and congenital heart defects: a meta-analysis / J. Yang, H. Qiu, P. Qu, et al. // PLoS One. 2015. Vol. 10, № 6. P. e0130681. DOI: 10.1371/journal.pone.0130681
- 142. Prepregnancy diabetes and offspring risk of congenital heart disease: a nationwide cohort study / N. Oyen, L. J. Diaz, E. Leirgul, et al. // Circulation. 2016. Vol. 133, № 23. P. 2243–2253. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.017465
- 143. Protective effect of periconceptional folic acid supplements on the risk of congenital heart defects: a registry-based case-control study in the northern Netherlands / I.M. van Beynum, L. Kapusta, M.K. Bakker, et al. // Eur Heart J. 2010. Vol.31. P. 464–471. DOI: 10.1093/eurheartj/ehp479
- 144. Proximity of residence to trichloroethylene-emitting sites and increased risk of offspring congenital heart defects among older women / J.S. Yauck, M.E. Malloy, K. Blair, et al. // Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology. − 2004. − Vol. 70, № 10. − P.808–814. DOI: 10.1002/bdra.20060
- 145. Reciprocal HLA-DR allogenicity between mother and child affects pregnancy outcome parameters / M.H.C. Craenmehr, A. van Egmond, G.W. Haasnoot //Journal of reproductive immunology. 2019. Vol. 133. P. 15–17. DOI: 10.1016/j.jri.2019.04.002

- 146. Regulation of the Anti-Inflammatory Cytokines Interleukin-4 and Interleukin-10 during Pregnancy / P. Chatterjee, V.L. Chiasson, K.R. Bounds, B.M. Mitchell // Front Immunol. 2014. Vol. 5. P. 253. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00253
- 147. Reis, M. Delivery outcome after maternal use of antidepressant drugs in pregnancy: an update using Swedish data / M. Reis, B. Kallen // Psychol Med. 2010. Vol. 40. P. 1723–1733. DOI: 10.1017/S0033291709992194
- 148. Risk and Prevalence of Developmental Delay in Young Children with Congenital Heart Disease / K. A. Mussatto, R. G. Hoffmann, G. M. Hoffman, et al. // Pediatrics. 2014. Vol. 133, № 3. P. 570–577. DOI: 10.1542/peds.2013-2309
- 149. Risk of congenital heart defects associated with assisted reproductive technologies: a population based evaluation / K. Tararbit, L. Houyel, D. Bonnet, et al. // European heart journal. − 2011. − Vol. 32, №4. − P. 500–508. DOI: 10.1093/eurheartj/ehq440
- 150. Ro/SSA autoantibodies directly bind cardiomyocytes, disturb calcium homeostasis, and mediate congenital heart block / S. Salomonsson, S.E. Sonesson, L. Ottosson. et al. //J Exp Med. -2005.Vol. 201. P. 11-17.DOI: 10.1084/jem.20041859
- 151. Rock, K. L. Present yourself! By MHC class I and MHC class II molecules / K. L. Rock, E.Reits, J. Neefjes // Trends in immunology. 2016. Vol. 37, №. 11. P. 724–737. DOI: 10.1016/j.it.2016.08.010
- 152. Second trimester corticotropin-releasing hormone levels in relation to preterm delivery and ethnicity / C. Holzman, J. Jetton, T. Siler-Khodr, et al. // Obstetrics & Gynecology. − 2001. − Vol. 97, № 5. − P. 657–663. DOI: 10.1016/s0029-7844(00)01209-6
- 153. Selective serotonin reuptake inhibitors and risk for major congenital anomalies / H. Malm, M. Artama, M. Gissler, A. Ritvanen // Obstet Gynecol. 2011. Vol. 118. P.111–112. DOI: 10.1097/AOG.0b013e318220edcc
- 154. Seminal fluid and the generation of regulatory T cells for embryo implantation / S.A. Robertson, J. R. Prins, D. J. Sharkey, L.M. Moldenhauer //Am J Reprod Immunol. 2013. Vol.69, № 4. P. 315–303. DOI: 10.1111/aji.12107

- 155. Sham, P. C. An extended transmission/disequilibrium test (TDT) for multi-allele marker loci / P. C. Sham, D. Curtis // Annals of human genetics. 1995. Vol. 59, № 3. P. 323–336. DOI: 10.1111/j.1469-1809.1995.tb00751.x
- 156. Shankarkumar, U. The human leukocyte antigen (HLA) system / U.Shankarkumar //International Journal of Human Genetics. 2004. Vol. 4, №. 2. P. 91–103.
- 157. Shastri, N. Producing nature's gene-chips: the generation of peptides for display by MHC class I molecules / N. Shastri, S. Schwab, T. Serwold // Annual review of immunology. 2002. Vol. 20, № 1. P. 463–493. DOI: 10.1146/annurev.immunol.20.100301.064819
- 158. Singh, A. Background, Epidemiology and Definition of Recurrent Pregnancy Loss / Singh, A., Khatuja, R., Verma, M. // In Recurrent Pregnancy Loss. 2018. P. 3-12. DOI: 10.1007/978-981-10-7338-0_1
- 159. Singh, S. Genetics of juvenile idiopathic arthritis / S. Singh, S. Bhattad, D. Danda // Int J Rheum Dis. 2014. Vol. 17, № 3. P. 233–236. DOI: 10.1111/1756-185X.12345
- 160. Sliwa, K. Possible joint pathways of early pre-eclampsia and congenital heart defects via angiogenic imbalance and potential evidence for cardio-placental syndrome / K. Sliwa, A. Mebazaa // European Heart Journal. − 2014. − Vol. 35, № 11. − P. 680–682. DOI: 10.1093/eurheartj/eht485
- 161. Socioeconomic status in relation to selected birth defects in a large multicentered US case-control study / J. Yang, S.L. Carmichael, M. Canfield, et al. //Am J Epidemiol. 2008. Vol.167. P. 145–154. DOI: 10.1093/aje/kwm283
- 162. Spectrum of congenital anomalies in pregnancies with pregestational diabetes / E. Garne, M. Loane, H. Dolk, et al. // Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology. − 2012. −Vol. 94, № 3. − P. 134–140. DOI: 10.1002/bdra.22886 163. Status report from 'double agent HLA': health and disease / P. Dyer,
- R.McGillivray, V.Robertson, et al. // Molecular immunology. 2013. Vol. 55, № 1. P. 2–7. DOI: 10.1016/j.molimm.2012.08.016

- 164. The 14 bp deletion-insertion polymorphism in the 3' UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability / P. Rousseau, M. Le Discorde, G. Mouillot, et al. // Hum. Immunol. 2003. Vol. 64, № 11. P. 1005-1010. DOI: 10.1016/j.humimm.2003.08.347
- 165. The association of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 alleles with genetic susceptibility to multiple sclerosis in the Slovak population / J. Michalik, D. Čierny, E. Kantorová, et al. // Neurological research. − 2015. − Vol. 37, № 12. − P. 1060–1067. DOI: 10.1080/01616412.2015.1115212
- 166. The congenital heart disease genetic network study: cohort description / T. T. Hoang, E. Goldmuntz, A. E. Roberts, et al. // PloS one. 2018. Vol. 13, № 1. P. e0191319. DOI: 10.1371/journal.pone.0191319
- 167. The epidemiology of congenital heart diseases in Saudi Arabia: a systematic review / A. M. Alenezi, N. M. Albawardi, A. Ali, et al. // J. Pub Health Epidemiol. 2015. Vol. 7, № 7. P. 232–240. DOI: 10.5897/JPHE2015.0723
- 168. The HLA factsbook / S. Marsh, P. Parham, L. D. Barber. Elsevier: 1999. 416 p.
- 169. The HLA locus contains novel foetal susceptibility alleles for congenital heart block with significant paternal influence / S. Meisgen, T. Östberg, S. Salomonsson, et al. // Journal of internal medicine. − 2014. − Vol. 275, № 6. − P. 640–651. DOI: 10.1111/joim.12179
- 170. The HLA-DRB1 shared epitope is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in African Americans through European genetic admixture / L.B. Hughes, D. Morrison, J.M. Kelley, et al. //Arthritis & rheumatology. − 2008. − Vol. 58, № 2. − P. 349–358. DOI: 10.1002/art.23166
- 171. Thyroid Autoimmunity is a Risk Factor for Recurrent Pregnancy Loss / S. Sultana, M. N. Shamima, S. Jesmin, et al. // TAJ: Journal of Teachers Association. 2017. Vol. 30, № 1. P. 49–55. DOI: 10.3329/taj.v30i1.39123
- 172. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation / J. Neefjes, M. L. Jongsma, P. Paul, O. Bakke // Nature Reviews Immunology. 2011. Vol.11, №12. P. 823. DOI: 10.1038/nri3084

- 173. Tregenza, T. Genetic compatibility, mate choice and patterns of parentage: Invited review / T. Tregenza, N. Wedell // Molecular Ecology. 2000. Vol. 9, №8. P. 1013–1027. DOI: 10.1046/j.1365-294x.2000.00964.x
- 174. Uranium and other cjntaminants in hair from the parents of children with congenital anomalies in Fallujah, Irag / S. Alaani, M. Tafash, C. Busby, et al. // Confl. Health. 2011. Vol. 5. P. 1–15. DOI: 10.1186/1752-1505-5-15
- 175. Use of corticosteroids in early pregnancy is not associated with risk of oral clefts and other congenital malformations in offspring / A. M. B. Bjørn, V. Ehrenstein, H. H. Hundborg, et al. // American journal of therapeutics. 2014. Vol. 21, № 2. P. 73–80. DOI: 10.1097/MJT.0b013e3182491e02
- 176. Use of selective serotonin-reuptake inhibitors in pregnancy and the risk of birth defects / S. Alwan, J. Reefhuis, S.A. Rasmussen, et al. // N Engl J Med. 2007. Vol. 356, №26. P. 2684–2692. DOI: 10.1056/NEJMoa066584
- 177. Ziegler, A. Female choice and the MHC / A. Ziegler, H. Kentenich, B. Uchanska-Ziegler // Trends in Immunology. 2005. Vol. 26, № 9. P. 496–502. DOI: 10.1016/j.it.2005.07.003