

На правах рукописи

ЗИГАНШИНА
Марина Михайловна

**ИММУНОПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ КОНЦЕПЦИЯ РАЗВИТИЯ
ГЛИКОПАТОЛОГИИ В СИСТЕМЕ МАТЬ-ПЛАЦЕНТА-ПЛОД**

3.3.3 Патологическая физиология
3.2.7 Иммунология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные консультанты:

Сухих Геннадий Тихонович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН
Бовин Николай Владимирович – доктор химических наук, профессор

Официальные оппоненты:

Назаров Сергей Борисович – доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора по научной работе, заведующий лабораторией клинической биохимии и генетики Федерального государственного бюджетного учреждения «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Филатов Александр Васильевич – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией иммунохимии Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства

Заморина Светлана Анатольевна – доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук»

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «23» января 2025 г. в 12.00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.180.01, созданного на базе ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»,
по адресу: 125315, г. Москва, ул. Балтийская, д. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «НИИОПП»,
а также на сайте <http://www.niiopp.ru/>

Автореферат разослан

«5» декабря 2024 года

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук



Н.Б Панкова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Преэклампсия (ПЭ) и задержка роста плода (ЗРП), входят в группу больших акушерских синдромов (БАС) и являются важнейшей проблемой современного акушерства, поскольку связаны с высоким уровнем материнской и перинатальной смертности, развитием осложнений в послеродовом и постнатальном периоде, снижением качества жизни матери и ребенка [Сидорова И.С., 2018; Ганичкина М.Б., 2017; Ярыгина Т.А., 2020]. Общеизвестно, что ведущими факторами патогенеза заболеваний данной группы являются дефекты плацентации, развитие системного воспалительного ответа и нарушение формирования иммунологической толерантности к аллоантигенам плода. Механизмы развития этих осложнений и патофизиологические изменения на органном (плацента) и системном (в т.ч. иммунная система) уровнях интенсивно исследуются [Erez O., 2022; Hoffman M.K., 2023]. Однако, в настоящее время, нет общей концепции, которая: объединяет молекулярные механизмы развития больших акушерских синдромов; указывает на маркеры для их ранней предикции и диагностики, в том числе дифференциальной; предлагает методы эффективного и патогенетически обоснованного лечения и профилактики.

Предположения о наличии взаимосвязи между нарушениями плацентации, формированием активационных фенотипов клеток в плаценте и нарушением механизмов развития толерантности к аллоантигенам плода высказываются в ограниченном числе исследований, посвященных углевод-опосредованным взаимодействиям в иммунной и репродуктивной системах при беременности [Kooyk Y. Van., 2008; Amon R., 2014; Clark G. F., 2001, 2014; Huang Z., 2023]. Полагают, что изменения гликома плаценты может быть значимым фактором патогенеза нарушений плацентации при БАС [Jones C.J.P., 2009], однако убедительных доказательств этому еще не получено. Также, пока недоказанной гипотезой являются предположения, что изменения гликома плаценты могут быть одной из причин активации иммунной системы матери и плода. Однако установлено, что иммунный гомеостаз поддерживается специфическими углевод-белковыми взаимодействиями, осуществляемыми между гликанами и эндогенными лектинами иммунных клеток организма [Van Kooyk Y., 2008; Clark G. F., 2014; Huang Z., 2023]. Гликаны могут выступать в качестве молекул, взаимодействие с которыми инициирует как регуляторные процессы, направленные на толерантность к аллоантигенам, так и патогенетические - где гликаны выступают в качестве активирующих “образов опасности”. У здорового человека выявлен баланс между ингибирующими и активирующими сигналами, генерируемыми иммунными клетками вследствие гликан-опосредованных взаимодействий, что реализуется в иммунорегуляторных или эффекторных реакциях [Clark G. F., 2014]. Эти факты могут быть перенесены на иммунное реагирование в аллогенных системах, примером которого является беременность. Поэтому ключевое значение для формирования толерантности к фетальным аллоантигенам может иметь малоизученный фактор гликома, обеспечивающий межклеточные контакты, и инициирующий иммунорегуляторные и толерогенные взаимодействия в плаценте.

Изучение гуморальных факторов, в частности, факторов, регулирующих гликозилирование, а также антигликановых антител (АгАТ), изменение которых отражает патологические преобразования гликома при онкотрансформациях [Tikhonov A, 2020; Temme J.S., 2021], может быть значимым аспектом патофизиологических механизмов развития патологии беременности. До настоящего времени остаются неизвестными эпитопы т.н. “блокирующих антител”, наличие которых в плаценте связывается с развитием толерантности к плоду [Jablonowska B., 2001; Barrientos G., 2009]. Известно, что эти антитела обуславливают не только периферическую, но и центральную толерантность, а также могут быть маркерами развития патологии беременности. Основываясь на том, что подавляющее большинство мембранных рецепторов гликозилировано, блокирующие антитела могут иметь углеводную специфичность.

Так как гликом плаценты при БАС малоизучен, а АгАТ практически не исследованы при беременности (особенно в контексте изменений в системе мать-плацента-плод), полученные данные позволят сформировать и научно обосновать концепцию развития гликопатологии при ПЭ и ЗРП.

Степень разработанности темы исследования

Гипотеза о существовании “гликокода” была сформулирована при изучении плацентации у плацентарных млекопитающих [Jones C.J.P., 2009]. В частности, установлен значительный вклад углевод-опосредованных реакций в межклеточные контакты при оплодотворении, имплантации и плацентации, и показана ключевая роль гликанов при межвидовом скрещивании [Jones C.J.P., 2009; Aplin J.D., 2017]. У человека выполнены единичные исследования на тканях нормальной зрелой плаценты [Tatsuzuki A., 2009] и плаценты беременных с ГСД, ЗРП, ГРБ, включая ПЭ [Marini M., 2011; Sgambati E., 2002, 2007], однако особенности клинических групп, пробоподготовки образцов ткани и узкая панель лектинов и МАТ, использованная для окрашивания плаценты, не позволяют сделать заключение о достаточной степени проработанности темы и дать характеристику гликотипа (углеводного фенотипа) плаценты и ее структур как в норме, так и при патологии беременности, поскольку в некоторых исследованиях имеются противоречивые данные, вследствие чего необходимы дальнейшие исследования в этой области. Понятие о гликопатологии плаценты человека не сформировано и отсутствует в научной литературе на сегодняшний момент, что сужает понимание патофизиологических механизмов развития БАС, поскольку гликаны являются наиболее широко распространенным классом соединений в организме, обеспечивают биоразнообразие белков и липидов, являются составными частями паттернов патогенности и опасности, а также опосредуют межклеточные контакты.

Необходимо отметить, что “блокирующие антитела”, которые позиционируются как обязательный элемент пула гуморальных факторов, требуемых для развития толерантности к плоду и успешного течения беременности, не исследованы в аспекте их специфичности и функциональной активности [Zenclussen A.C., 2001; Barrientos G., 2009]. Их масштабное определение (тестирование на связывание с широким репертуаром антигенов) не проводилось ранее. Отсутствуют данные о содержании АгАТ в крови матери и новорожденного и их функциях в системе мать-плацента-плод. Поскольку АгАТ не только проявляют регуляторные или эффекторные свойства (нельзя исключить также их

потенциальные блокирующие свойства), участвуя в иммунных реакциях, но и могут выступать как конкуренты в связывании гликанов с эндогенными лектинами, то их исследование расширит понимание иммунопатогенеза БАС.

Цель исследования: изучить изменения гликанов и гликан-опосредованных взаимодействий между углевод-связывающими белками и их лигандами-гликанами в системе мать-плацента-плод при больших акушерских синдромах, связанных с дефектами плацентации (ПЭ и ЗРП) для расширения представлений об их патогенезе и разработки эффективного метода лабораторной диагностики осложнений беременности и предикции неонатальных исходов.

Задачи исследования

1. Изучить закономерности изменения экспрессии гликанов в структурах плацентарного барьера при преэклампсии и задержке роста плода;
2. Охарактеризовать развитие периферической толерантности в норме и при плацента-ассоциированных осложнениях: определить в ткани плаценты экспрессию генов иммунорегуляторных белков; идентифицировать резидентные антитела, ассоциированные с тканью плаценты, установить их углеводную специфичность;
3. Провести аффинное выделение резидентных антигликановых антител из ткани плаценты, определить их подклассы и углеводную специфичность, сравнить их репертуар с репертуаром антител периферической крови и выявить мишени в структурах плаценты;
4. Исследовать функциональную активность аффинно выделенных антигликановых антител в модели *in vitro* активации эндотелиальных клеток линии EA hy.926;
5. Охарактеризовать субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови матерей и пуповинной крови младенцев при преэклампсии: Т-, В- и NK-лимфоцитов по экспрессии маркеров CD45, CD3, CD4, CD8, CD16, CD5, CD56, CD25, CD19, IgD, CD38, CD27, CD24;
6. Охарактеризовать репертуар антител к гликанам в периферической крови здоровых беременных, беременных с плацента-ассоциированными осложнениями и гипертензивными расстройствами во время беременности, и изучить эпитопную специфичность антител, ассоциированных с патологией;
7. Охарактеризовать репертуар антител к гликанам в пуповинной крови здоровых новорожденных и новорожденных с перинатальной патологией, рожденных от матерей с преэклампсией, и выявить зависимость между содержанием антигликановых антител пуповинной крови и клинико-биохимическими параметрами матерей с учетом исходов беременности и состояния здоровья новорожденных;
8. Провести исследование углеводной специфичности галектинов человека с помощью высокопредставительного гликанового эррея, идентифицировать гликаны, которые являются общими лигандами для галектинов и антигликановых антител человека;
9. Установить взаимосвязи между клиническими особенностями течения преэклампсии и иммунными факторами, для уточнения ее патогенеза и обоснования оптимального перечня иммунологических показателей, которые войдут в протокол комплексной диагностики и прогнозирования перинатальных исходов.

Научная новизна исследования

В рамках диссертационного исследования:

1. Расширено понятие о гликопаттернах структур плацентарного барьера в норме и при плацента-ассоциированных осложнениях беременности (ПЭ и ЗРП), выявлены особенности экспрессии фукозилированных гликанов разного типа в эндотелии фетальных капилляров терминальных ворсин, уточнены данные об особенностях экспрессии гликоконъюгатов при ранних и поздних формах ПЭ и ЗРП, что позволило впервые сформулировать понятие о развитии гликопатологии плаценты при плацента-ассоциированных осложнениях беременности и уточнить их патогенез.

2. Впервые охарактеризована углеводная специфичность резидентных плацента-ассоциированных антигликановых IgG. Установлено их значимое снижение при ПЭ, проведено сравнение и выявлены особенности углеводной специфичности резидентных плацента-ассоциированных AgAT(IgG) с AgAT(IgG) периферической крови, что позволило предположить их функцию в качестве протективных антител, которые маскируют аллоантигены плаценты и обладают “блокирующими” свойствами.

3. Впервые проведено изотипирование IgG, аффинно выделенных из ткани плаценты, и выявлено преобладание IgG₁ над другими изотипами, по сравнению с антителами аналогичной специфичности периферической крови, где преобладал IgG₂. Продемонстрировано сниженное содержание IgG₁ и, напротив, повышенное содержание других изотипов IgG, в составе антител, выделенных из ткани плаценты беременных с ПЭ, по сравнению с выделенными из ткани нормальной плаценты, что указывает на особую роль AgAT(IgG₁) в плаценте.

4. Впервые установлена различная гистотопография гликотопов анти-Галили антител в ткани нормальной плаценты и патологической плаценты, от беременности, осложненной ПЭ и ЗРП. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии Галили-подобных эпитопов в ткани нормальной плаценты и подтверждают их наличие в плаценте пациенток с ПЭ и ЗРП, что обуславливает реакции хронического отторжения плода при осложненной беременности.

5. Впервые в экспериментальной модели *in vitro*, при моделировании условий активации эндотелиальных клеток, установлен дозозависимый эффект анти-Neu5Ac β антител на экспрессию маркеров активации эндотелия. Сниженное содержание этих антител выявлено в ткани плаценты при ПЭ, что указывает на их регуляторную и блокирующую функцию и значение для развития периферической толерантности при беременности.

6. Впервые охарактеризованы регуляторные фенотипы, уточнены особенности активированных фенотипов Т-, В- и НК-клеток у матерей с ПЭ и их новорожденных и дана детальная характеристика В-клеточного звена: В1; В2; В-клеток памяти и В-клеток с фенотипом регуляторных. Установлено, что сформированный активированный гликотип плаценты при ПЭ влияет на иммунную систему матери и плода по-разному: у матери выражены значительные изменения В-клеточного звена иммунитета (изменения затрагивают В-клетки наивных фенотипов и В-клетки памяти); у новорожденного – активированные Т-хелперы и Т-клетки с фенотипом регуляторных.

7. Впервые при беременности установлены общие гликаны - мишени для антигликановых антител и углевод-связывающих регуляторных белков – галектинов.

8. Впервые охарактеризован репертуар АгАТ при гипертензивных расстройствах во время беременности (ГРБ) и уточнены данные о репертуаре АгАТ при ПЭ и ЗРП, что позволило предложить диагностическую сигнатуру, дифференцирующую ПЭ от ГРБ. Выявлена сигнатура АгАТ неблагоприятная для прогноза состояния новорожденного.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Теоретическая значимость работы заключается в том, что на основании результатов диссертационного исследования сформулирована и научно обоснована новая иммунопатогенетическая концепция развития гликопатологии в системе мать-плацента-плод, описаны измененные гликопаттерны структур плацентарного барьера, ассоциированные с развитием БАС, связанных с дефектами плацентации: ранними и поздними клиническими формами ПЭ и ЗРП. Доказано наличие резидентных плацента-ассоциированных АгАТ(IgG) (плАгАТ), которые связаны с гликанами плаценты. Их сниженное, по сравнению с нормой, количество в плацентарной ткани беременных с ПЭ является патогенетическим фактором, ассоциированным с патологией. Уточнение специфичности плАгАТ позволило выявить антитела, функции которых связаны с блокированием “образов опасности”, поскольку гликаны, с которыми связываются антитела близки по структуре к антигенам, вызывающим отторжение при аллотрансплантациях. Центральная роль развития гликопатологии плаценты в развитии ПЭ доказана от гипотезы до ее клинического и экспериментального подтверждения, поскольку были выполнены этапы: характеристики гликопаттернов; характеристики специфичности АгАТ, связывающихся с сайтами гликопаттернов; выделения АгАТ индивидуальных специфичностей к индивидуальным гликанам и уточнение их эпитопной специфичности; установление факта связывания выделенных АгАТ индивидуальных специфичностей с тканями плаценты в норме и патологии и характеристики особенностей их связывания с тканью. Т.о. идентифицированы гликаны - антигенные мишени, которые в дополнение к антигенам гистосовместимости имеют ключевое значение в иммунном ответе в аллогенных системах, что существенно дополняет понимание механизмов отклонения от иммунного надзора при беременности.

Определена функция анти-Neu5Ac β антител в модели активации эндотелиальных клеток *in vitro*. Установлен их регуляторный эффект в отношении эндотелия, который заключается в уменьшении экспрессии поздних маркеров активации. Исследование функции этих антител при беременности является вектором дальнейшего развития исследования в будущем.

Доказательство развития гликопатологии плаценты обосновало исследование влияния активационного стимула измененных гликопаттернов плаценты на клеточное и гуморальное звено иммунной системы матери и новорожденного при ПЭ. Проведено масштабное исследование больших и малых субпопуляций Т-, В-, НК-клеток с особым акцентом на В-клетки памяти, определенные с использованием различных подходов. Полученные результаты демонстрируют, что активационный стимул измененных гликопаттернов плаценты при ПЭ влияет на клеточный иммунитет матери и новорожденного по-разному: у матери выражено влияние на В-клеточное звено, у новорожденного – на Т-клетки.

Исследование гуморального звена показало, что репертуар АгАТ у беременных с ПЭ изменен. Сравнение репертуара АгАТ при нормальной беременности с репертуаром АгАТ у беременных с осложнениями из группы ГРБ, позволило идентифицировать специфичные для ПЭ антитела. Исследование гуморального иммунитета у новорожденного выявило наличие только АгАТ(IgG) в пуповинной крови. Высокие корреляционные связи между АгАТ(IgG) одинаковой специфичности в пуповинной крови младенца и периферической крови матери подтвердили известный факт об основополагающей роли материнских IgG, получаемых плодом посредством трансплацентарного трансфера. Установлено, что иммунопатология матери, проявляющаяся в значительных нарушениях функционирования В-клеточного звена иммунной системы у пациенток с ПЭ: дисбалансе содержания В-клеток “наивных” фенотипов и В-клеток памяти, изменениях репертуара АгАТ и др. иммуногормональных факторов, регулирующих гликозилирование белков и продукцию протективных при беременности факторов, влияет на новорожденного, поскольку плод получает от матери пул АгАТ(IgG), функции которых могут быть как протективными, так и патологическими. Продemonстрировано, что на развитие иммунной системы новорожденного влияют как активирующие факторы плаценты, так и материнские факторы. Перинатальная патология ассоциирована с наличием АгАТ(IgG), которые получены от матери.

Проведенное исследование углеводной специфичности АгАТ, выявленных у матери и новорожденного, и рекомбинантных галектинов выявило общие гликаны с которыми связываются эти углевод-связывающие белки. Поскольку галектины являются мультифункциональными белками с цитокин-подобным действием на клетки, в том числе клетки репродуктивной и иммунной систем, АгАТ могут влиять на эти взаимодействия, конкурируя за связывание с гликаном-лигандом, что может вносить вклад в регуляцию ими иммунных процессов, морфогенеза плаценты, органов и систем плода. Роль этого феномена в регуляции гликан-опосредованных взаимодействий предстоит исследовать в дальнейшем.

Практическая значимость работы состоит в том, что полученные результаты позволили разработать систему предикции осложнений по анализу антител в материнской и пуповинной крови. На основании полученных (обучающих) данных рассчитаны диагностические сигнатуры, дифференцирующие ПЭ от других нозологий из группы ГРБ, что уточняет диагноз, степень тяжести ПЭ и открывает возможность проводить лечение на ранних этапах развития осложнений.

На основании полученных (обучающих и проверочных данных) рассчитаны диагностические сигнатуры, предназначенные для предикции неонатальных исходов. Диагностическая сигнатура по периферической крови матери рекомендована для использования в дородовом периоде, для прогноза развития перинатальной патологии у новорожденного. Диагностическая сигнатура по пуповинной крови новорожденного рекомендована для предикции тяжести течения раннего неонатального периода.

Методология и методы исследования

В диссертационном исследовании соблюдался принцип этапности: **на первом этапе** проведено исследование плаценты – установлен измененный (активированный) гликотип в структурах плацентарного барьера при патологической беременности, определена экспрессия генов иммунорегуляторных белков, выделены плацента-ассоциированные

антитела, установлена их специфичность, изотипический состав IgG, изучены мишени антител в тканях нормальной и патологической плаценты и функциональная активность антител, что позволило охарактеризовать особенности развития периферической толерантности в норме и ее изменения при патологии. Основываясь на сформированном активированном гликотипе тканей плаценты при патологии беременности, следующие этапы включали исследование: субпопуляций активированных и регуляторных клеток у матери и новорожденного (**второй этап**) и гуморальных иммунных факторов, включая представительный пул АгАТ крови и иммуно-гормональные факторы, регулирующие процессы гликозилирования и развития толерантности (**третий этап**), что позволило охарактеризовать особенности развития системной толерантности к плоду в норме и при патологии. Для каждого этапа использован комплекс современных высокотехнологичных методов исследования: иммуногистохимия, лектиновая гистохимия, метод тканевых матриц, многоцветная проточная цитометрия, ИФА, ОТ-ПЦР, культуральный метод, аффинная хроматография, а также использованы высокопредставительные гликановые эрреи для исследования АгАТ и галектинов. Результаты получены и проанализированы с помощью современных методов статистической обработки данных. Для обсчета результатов по АгАТ был использован метод нормализации данных и введена поправка на множественность, поскольку совокупно было проанализировано более 800 антител.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. При плацента-ассоциированных осложнениях беременности (ПЭ и ЗРП) в структурах плацентарного барьера выявляются измененные гликопаттерны, свидетельствующие о качественных и количественных особенностях экспрессии гликанов, которые специфичны для исследуемой нозологии, и ее фенотипов. Выявленные особенности доказывают развитие гликопатологии плаценты, что имеет патофизиологическое значение, поскольку изменениям подвергаются гликаны рецепторной зоны клеток, регулирующие процессы развития и роста плаценты, а также иммунное реагирование на аллоантигены в зоне непосредственного контакта матери и плода.

2. В ткани плаценты выявляются резидентные антигликановые IgG, содержание которых значимо снижено при осложненной беременности. Эти антитела, имеют особенности эпитопной специфичности и изотипического состава у пациенток с нормальной и осложненной преэклампсией беременностью, которые отличают их от аналогичных антител пула здоровых небеременных доноров, что свидетельствует о гестационных особенностях функционирования врожденного и адаптивного иммунитета при беременности, и позволяет предполагать их протективную функцию.

3. Проведенные тесты по поиску мишеней резидентных плацента-ассоциированных антигликановых антител в плаценте и исследование функциональной активности этих антител *in vitro* продемонстрировали, что:

а) Уровень экспрессии и особенности связывания эпитопа с антителами, а также топография сайтов связывания антител в структурах плаценты различаются в нормальной и патологической ткани, что свидетельствует о патогенетических изменениях гликанов плаценты при осложненной беременности и наличии у пациенток с осложненной

беременностью в ткани плаценты специфических гликанов, обуславливающих активацию иммунной системы;

б) Регуляторный эффект анти-Neu5Ac β антител на клетки эндотелия, проявляется в снижении экспрессии поздних активационных маркеров под воздействием антител в провоспалительных условиях. Низкое содержание резидентных анти-Neu5Ac β антител является индикатором потери контроля за воспалительной реакцией в плаценте при преэклампсии.

4. Активационный стимул измененных гликопаттернов плаценты при преэклампсии влияет на иммунную систему матери и новорожденного по-разному: у матери выражены изменения В-клеточного звена иммунитета, в частности, изменениям подвергаются В-клетки наивных фенотипов и В-клетки памяти; у новорожденного – активированные Т-хелперы и Т-клетки с фенотипом регуляторных.

5. У беременных с преэклампсией активированы гуморальные механизмы иммунной системы, что проявляется в изменении профиля иммуно-эндокринных факторов и антигликановых антител. Формирующаяся иммунная система плода подвергается активационным влияниям как измененных гликопаттернов синцитиотрофобласта, так и материнских факторов, транспортируемых через плацентарный барьер, включая антигликановые антитела матери, которые могут рассматриваться как протективные, так и болезнь-ассоциированные для младенца. Антигликановые антитела периферической и пуповинной крови имеют диагностический и прогностический потенциал для клинической медицины.

6. Наличие общих гликанов-мишеней у антигликановых антител и галектинов человека предполагает конкурирующие взаимоотношения между ними в гликан-опосредованных процессах, в том числе иммунных, что может обуславливать нарушения центральной и периферической толерантности к плоду при преэклампсии.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность полученных результатов и обоснованность выводов диссертационного исследования определяются высоким методическим уровнем работы, что включает отработанные условия проведения экспериментов, учет вмешивающихся факторов и их устранение, использование обоснованных и адекватных контрольных образцов в лабораторных экспериментах, и групп сравнения в клиническом исследовании. Дизайн экспериментов и клинических исследований продуман и обоснован, соблюдалась этапность и логика выполнения исследований. Число наблюдений в группах исследования достаточно, экспериментальные наблюдения выполнены в достаточном числе повторов. Статистические методы исследования адекватны и проводились с учетом массивных данных, полученных с использованием высокопроизводительных гликановых эрреев с введением поправки на множественность сравнений. Выводы и положения диссертационной работы сформулированы на основании полученных результатов и соответствуют цели и задачам исследования.

Полученные результаты диссертационного исследования представлены и обсуждены на: XVII - XXII Всероссийских научно-образовательных форумах “Мать и Дитя” (Москва, 2016 - 2021 г.г.); III Всероссийской конференции “Фундаментальная Гликобиология” (Владивосток, 2016); I и II конференции “аутоиммунные и

иммунодефицитные заболевания” (Москва, 2016, 2017); XIV международном конгрессе РААКИ «Современные проблемы иммунологии, аллергологии и иммунофармакологии» (Москва, 2017); IV Национальном конгрессе “Дискуссионные вопросы современного акушерства” (Санкт-Петербург, 2017); Всероссийской конференции “Клиническая иммунология и аллергология – практическому здравоохранению” (Москва, 2018); 30th European Congress of Pathology (ECP) (Bilbao, Spain, 2018); Национальной конференции “Клиническая иммунология и аллергология – междисциплинарные проблемы” (Москва, 2019); IV Объединенном иммунологическом форуме и VIII Конференции по иммунологии репродукции (Новосибирск, 2019); I и II Национальном конгрессе с международным участием “Лабораторные технологии в репродуктивной медицине и неонатологии: от науки к практике” (ЛАБРИН 2019, 2020) (Москва, 2019, 2020); 31st European Congress of Pathology (ECP) (Nice, France, 2019); III Национальном конгрессе с международным участием «ЛАБРИН-2021. Инфекции. Год с COVID-19: итоги» (ЛАБРИН–2021) (Москва, 2021); Всероссийской научно-практической конференции «Типовые патологические процессы: современные тренды в науке» (Томск, 2020); V Всероссийской конференции “Фундаментальная Гликобиология” (Гатчина, 2021); IX Всероссийской конференции “Иммунология репродукции” (Москва, 2021); XXIII World Congress of International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP-22), (Montpellier, France. 2022); V Объединенном иммунологическом форуме и X Конференции по иммунологии репродукции (Пушкинские Горы, 2024).

Диссертационная работа обсуждена на заседании межотделенческой конференции ФГБУ «НЦАГиП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (24.04.2024, протокол № 2) и апробационной комиссии ФГБУ «НЦАГиП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (22.05.2024, протокол № 8).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Основными принципами при планировании и выполнении исследований были:

1. Тщательный отбор пациенток на основании подробного изучения клинико-анамнестических данных, течения и исходов беременности;
2. Сопоставление клинико-анамнестической характеристики беременных с результатами морфологических исследований плаценты;
3. Комплексное клинико-иммунологическое исследование с выявлением взаимосвязей между исследуемыми факторами.

Основными этапами клинико-иммуно-морфо-гистохимического исследования в соответствии с поставленными задачами явились:

1. Доказательство развития гликопатологии в системе мать-плацента-плод при плацента-ассоциированных осложнениях беременности и связь гликопатологии с нарушениями толерантности к плоду. Для этого исследовалась ткань плаценты: изучался ее гликотип при ПЭ и ЗРП, выделялись антитела из ткани плаценты, определялась их углеводная специфичность, идентифицировались антитела, которые являются резидентными в плаценте (пЛАгАТ) и не встречаются в крови. На

основании идентификации специфичности пЛАгАТ, выделялись из элюатов плаценты и из IgG-препарата (концентрированный раствор очищенной фракции иммуноглобулинов G человека “Иммуноглобулин человека нормальный”, ФГУП “НПО “Микроген”, Россия) антитела аналогичной специфичности, подтверждались их мишени в плаценте; исследовалась эпитопная специфичность этих антител и подклассы IgG, исследовалась их функциональная активность в *in vitro* модели на линии клеток EA *hy*.926. В ткани плаценты оценивался профиль экспрессии иммунных факторов, регулирующих развитие толерантности к аллоантигенам (Рис. 1).

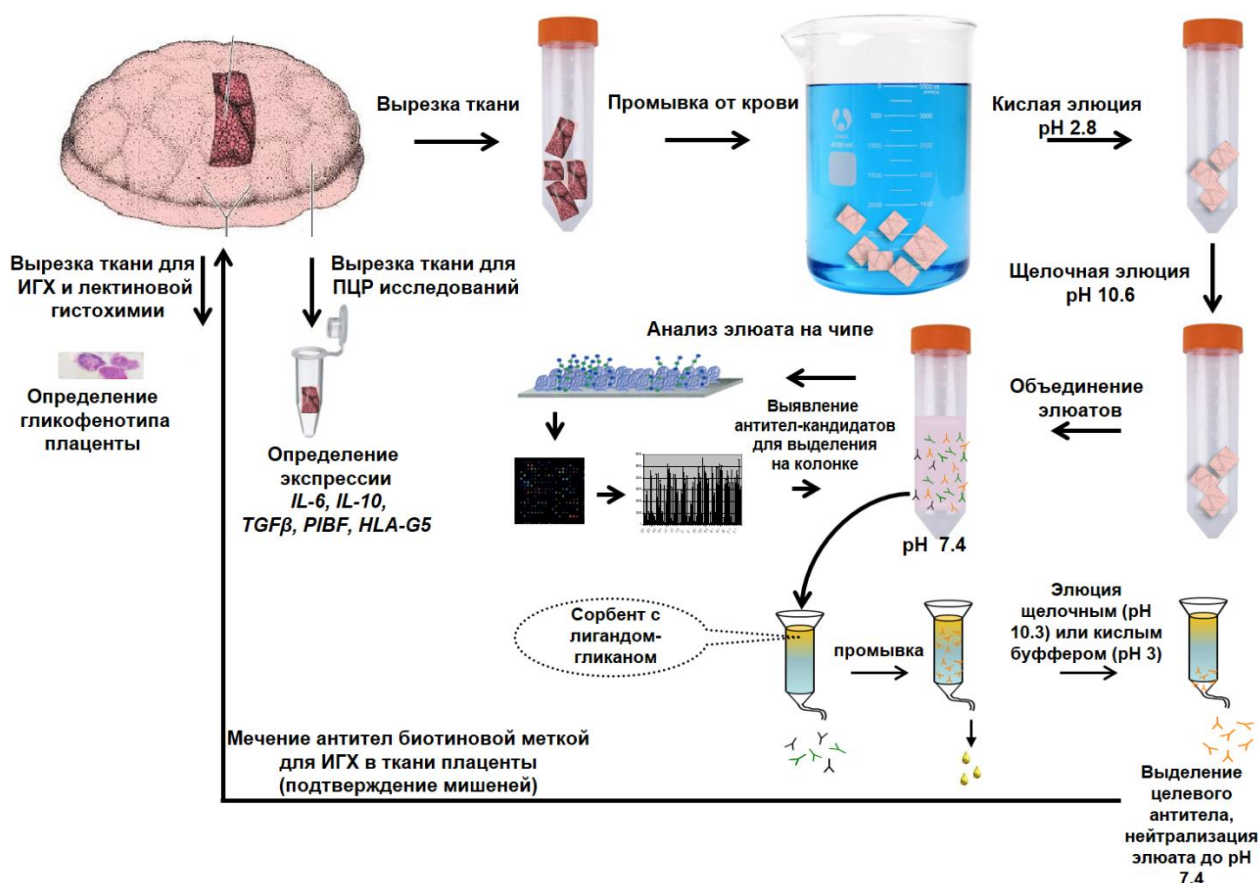


Рисунок 1. Исследование гликопатологии плаценты, включающее: изучение экспрессии мРНК генов факторов, регулирующих толерантность и связанных с гликозилированием, исследование гликотипа ткани плаценты, выделение и экспериментальное исследование пЛАгАТ и подтверждение их мишеней в плаценте (схема).

2. Изучение комплекса клеточных факторов иммунитета, участвующих в механизмах развития толерантности на аллоантигены, для подтверждения дезрегуляции иммунных процессов, приводящих к повышенной реактивности матери и плода при осложненной беременности.

3. Изучение комплекса гуморальных факторов иммунитета (цитокинов, гормонов), а также выполнялось исследование:

а) АгАТ периферической крови при плацента-ассоциированных осложнениях беременности для выявления гликопатологии, специфичной для ПЭ и ЗРП. Проводилось комплексное исследование репертуара АгАТ(IgM) и АгАТ(IgG); устанавливались различия в профилях антител при ГРБ и ЗРП, выявлялись сигнатуры АгАТ, дифференцирующие одно патологическое состояние от другого, что позволило установить патогенетическую роль АгАТ, обосновать их участие в формировании толерантности к плоду и предложить маркеры для дифференциальной диагностики нозологий группы ГРБ, уточнения степени тяжести ПЭ.

б) АгАТ пуповинной крови для выявления гликопатологии иммунной системы новорожденного и влияния гликопатологии, развивающейся в плаценте и у матери на новорожденного. В рамках данного этапа проводилось изучение связи клинко-иммуно-гормональных факторов матери и новорожденного с АгАТ(IgG) пуповинной крови. По результатам исследования пуповинной крови были определены сигнатуры АгАТ для прогноза течения раннего неонатального периода у новорожденного.

в) специфичности углеводов-связывающих белков (АгАТ периферической и пуповинной крови и рекомбинантных галектинов человека) для выявления общих углеводных лигандов, и обоснования конкурирующих взаимодействий между углевод-связывающими белками двух типов.

В соответствии с поставленными задачами в исследование были включены 399 проспективно обследованных пациенток II-го и III-го триместров беременности (Рис. 2). Беременные включались в исследование по методу подбора пар. Основными критериями для подбора “контролей” для каждого “случая”, включенного в группу явились: возраст беременной и срок беременности. На каждом этапе в исследование для решения поставленных задач было включено разное число “случаев”, но принцип подбора “контролей” соблюдался в соответствии с указанными критериями.

Критерии включения в исследование: (для всех групп): одноплодная беременность в естественном цикле; возраст 18-40 лет; информированное согласие; (для группы сравнения): неосложненное течение данной беременности; (для основной группы): беременность, осложненная ХАГ или ГАГ, ПЭ или ЗРП, в соответствии с критериями диагностики. Критерии исключения: беременность, наступившая в результате ВРТ; резус конфликт; острые и хронические заболевания в стадии обострения; тяжелая экстрагенитальная патология; вращение плаценты; хромосомные аномалии у плода; дисплазия соединительной ткани; трансплантации внутренних органов и гемотрансфузии в анамнезе; иммунотерапия; прием ЛС, влияющих на выработку или маскировку антител. Исследование было одобрено этическим комитетом при ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (протокол № 3 от 21.03.2019 г.).

Материалом исследования служила ткань плаценты после оперативного родоразрешения, сыворотка периферической крови матери, сыворотка пуповинной крови, аффинно выделенные анти-Галили, анти-Tn, анти-Neu5Ac β антитела, клетки линии EA hy.926, которые воспроизводят основные морфологические, фенотипические и функциональные характеристики эндотелия крупных сосудов человека [Edgell C.J., 1983].



Рисунок 2. Дизайн исследования: характеристика выборки и схема экспериментального исследования.

Методы исследований включали:

1. Стандартные методы исследования.

Общеклинические, клинико-лабораторные и инструментальные методы: клиническое, гормональное, биохимическое, ультразвуковое и доплерометрическое обследование, на основании которых устанавливали срок беременности и диагноз (ЗРП, заболевания группы ГРБ).

2. Специальные методы исследования.

Были использованы морфогистохимические, молекулярно-генетические, биохимические, иммунологические методы (Таблица 1).

Таблица 1. Специальные методы исследования

№	Метод исследования	Исследуемые параметры
1	Лектиновая гистохимия (ЛГХ) , микроскоп Nikon ECLIPSE, ПО NIS Elements Advanced Research 3.2 (Laboratory Imaging LTD, Чешская Республика), с помощью панели биотинилированных лектинов Vector Labs, США.	Количественное содержание гликоконъюгатов, имеющих в составе группы: $\alpha 2,3'SiaLN-$; $\alpha 2,6SiaGal-$; $\alpha Man-$; $\alpha 1,2Fuc$; $\alpha 1,4Fuc-$; $\alpha 1,6Fuc-$; $Gal\beta 1,4GlcNAc\beta 1-$; $\alpha Gal-$; $\alpha GalNAc-$; $\alpha-/ \beta- GlcNAc-$; $\alpha-/ \beta- GalNAc$; $(GlcNAc)_n$ ($n=1-4$); гликан Н тип 2 ($Fuc\alpha 1-2Gal\beta 1-4GlcNAc\beta-$) и гликан Le^Y ($Fuc\alpha 1-2Gal\beta 1-4(Fuc\alpha 1-3)GlcNAc\beta-$), оцениваемые по интенсивности окрашивания продукта реакции в структурных элементах терминальных
2	Иммуногистохимия (ИГХ) , оборудование и ПО аналогично ЛГХ, с помощью, МАТ (J. Bara (CNRS, Villejuif, Франция)) и аффинно выделенных из IgG-препарата,	

№	Метод исследования	Исследуемые параметры
	биотинилированных анти-Галили; анти-Tn и анти-Neu5Ac β антител	ворсин (синцитиотрофобласте и эндотелии капилляров) центральной и парацентральной зон плаценты
3	Метод тканевых матриц (ТМА) Nanozoomer slide scanner (Hamamatsu, Hamamatsu City, Japan), микроскоп, ПО, лектины и МАт аналогично ЛГХ и ИГХ (см.п.1 и п.2.)	
4	ОТ-ПЦР-РВ , амплификатор «ДТ-964», с помощью коммерческих реактивов («ДНК-Технология», Россия)	Уровень экспрессии мРНК генов <i>IL-6</i> , <i>IL-10</i> , <i>TGFβ</i> , <i>PIBF1</i> , <i>HLA-G</i> в ткани плаценты
5	Элюция антител по методу [Игнатъева Н.В. и соавт., 2018]	Элюция плацента-ассоциированных антител с ткани плаценты
6	Аффинная хроматография по методике, описанной в [Обухова П.С., 2011]	Аффинное выделение антител (IgG) против Галили, Tn, Neu5Ac β -Bn из IgG-препарата и элюатов плаценты
7	Мечение аффинно выделенных антител с помощью биотин-сукцинимидного эфира в безводном DMSO (Merck, Германия)	Биотинилирование аффинно выделенных антител для окраски ткани плаценты
8	Иммуноферментный анализ (ИФА) Labsystems Multiskan Ascent, Финляндия) с использованием наборов (Вектор – Бест, Россия) и тест-наборов (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Австрия)	Определение IL-6 (сыворотка пуповинной крови и периферической крови матери); определение изотипов IgG аффинно выделенных антител
9	Иммунохемилюминесцентный анализ (ИХЛА) , cobas e 411 (Rack/Disk), наборы (Progesterone III Elecsys, Roche, Франция)	Уровень прогестерона в периферической крови матери
10	Метод высокопроизводительных гликановых эрреев по методике [Хасбиуллина Н.Р., 2019], InnoScan 1100 AL (Innopsys, Франция) программа ScanArray Express 4.0, с помощью гликочипов (Семиотик, Россия)	Уровень АгАТ в сыворотке периферической и пуповинной крови, элюатах плаценты; Специфичность аффинно выделенных АгАТ(IgG) и рекомбинантных галектинов
11	Проточная цитометрия (ПЦМ) , Navios (Beckman Coulter, Франция), ПО Kaluza 2.0 (Beckman Coulter, Франция) с помощью МАт BD Pharmingen™, IOTest Beckman Coulter, BioLegend™	Относительное содержание (%) и СИФ клеток, экспрессирующих поверхностные маркеры: а) клеток периферической крови матери и пуповинной крови с оценкой больших и малых субпопуляций Т-, В- и НК-клеток (в соответствии с Рис. 3); б) клеток линии EAhy.926,

№	Метод исследования	Исследуемые параметры
		экспрессирующих CD62E, CD106, CD54 (в соответствии с Рис. 11)

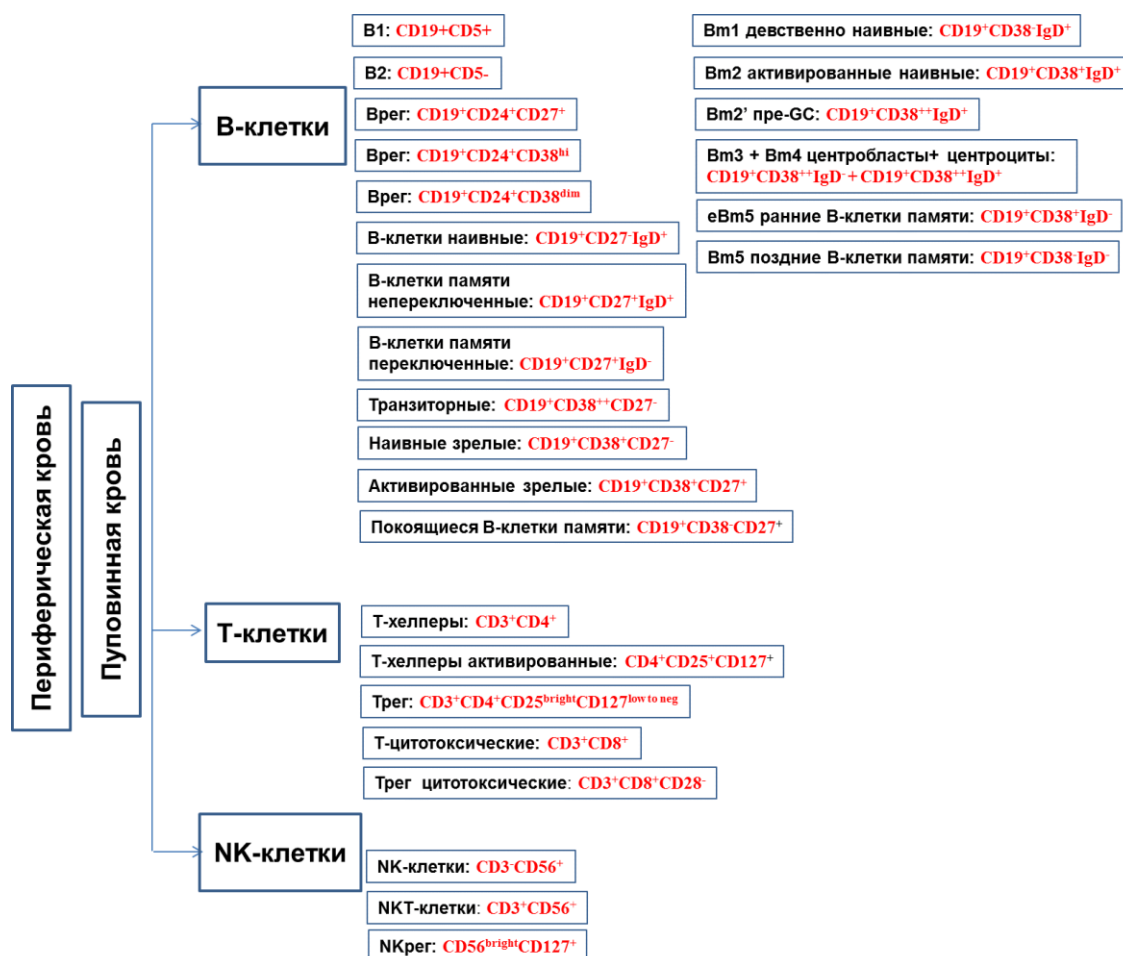


Рисунок 3. Субпопуляции иммунных клеток, определяемые в периферической крови матери и пуповинной крови новорожденного.

3. Статистические методы

Использованы методы вариационной статистики и пакеты прикладных программ Microsoft Office Excel 2010, Statistica for Windows версия 10, MedCalc версия 12 и программа R. Количественные данные представлены в виде медианы (Me) и максимального и минимального значения (Q0 0-й процентиль; Q4 100-й процентиль). Использованы: критерий Шапиро-Уилка (нормальность распределения); критерий Краскелла-Уоллиса с поправкой Бонферрони при $p < 0,025$ (межгрупповые различия при сравнении трех и более групп); U-критерий Манна-Уитни (апостериорные сравнения); коэффициент ранговой корреляции Спирмена (корреляционный анализ). Различия считали значимыми при $p < 0,050$.

Для математической обработки данных гликанового эррея проводили анализ с помощью программы R, включающий в себя процедуры контроля качества данных: нормализацию данных и их нормализующую трансформацию, расчет межгрупповых

отличий по АгАТ (классов М и G). Полученные результаты представлены в виде медианы преобразованных сигналов в группах и ее отклонения. Для установления межгрупповых различий был использован непараметрический тест Вилкоксона-Манна-Уитни. Значимыми считали отличия, для которых величина $p < 0,00017$ (что соответствует уровню значимости 0,050 после поправки на множественность). Поиск диагностических сигнатур, основанных на АгАТ, осуществляли с помощью модифицированного блочного гибридного генетического алгоритма с методом оптимизации Тагучи как описано в [Tsai J.-T., 2004].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Патофизиологические изменения гликанов плаценты при плацента-ассоциированных осложнениях беременности

Анализ гликанов в синцитиотрофобласте и эндотелии терминальных ворсин плаценты показал, что гликотип синцитиотрофобласта при рЗРП ($n=10$) характеризуется значительными изменениями терминальных гликанов (изменены практически все исследуемые группы гликанов по сравнению с их экспрессией в норме ($n=11$)), при этом, субтерминальные гликаны не изменены (Рис. 4, А). При пЗРП ($n=10$) изменения терминальных гликанов синцитиотрофобласта менее выражены, чем при рЗРП но фиксируется больше изменений в составе субтерминальных структур (Рис. 4, А). Аналогичная закономерность установлена для терминальных гликанов эндотелия при рЗРП и пЗРП, но более выражены изменения субтерминальных структур (Рис. 5, А).

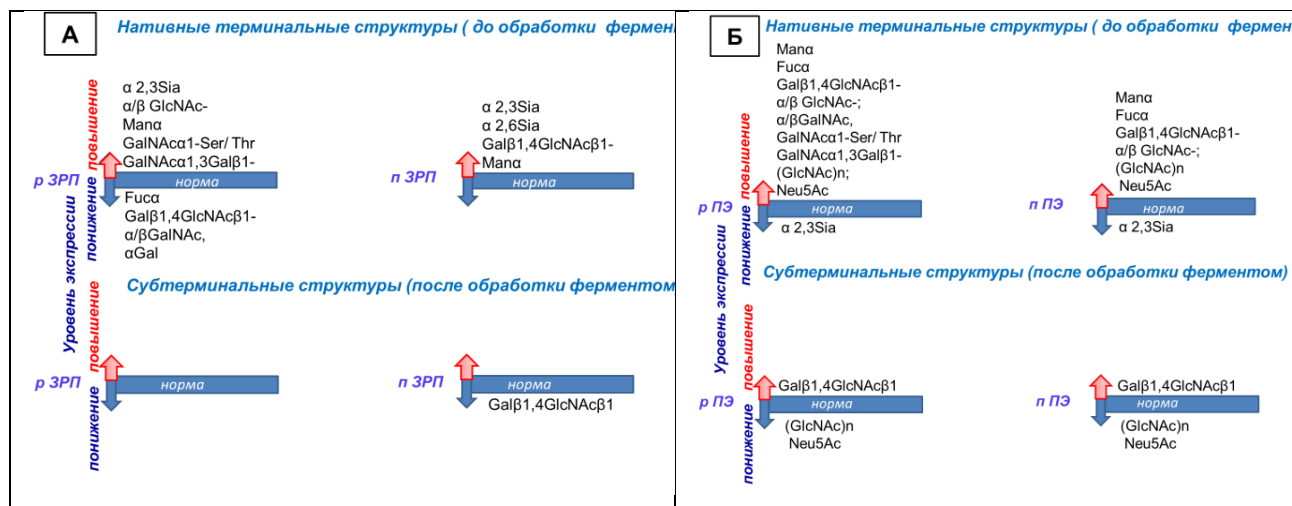


Рисунок 4. Изменения содержания терминальных гликанов (нативные структуры) и субтерминальных фрагментов гликанов синцитиотрофобласта терминальных ворсин плаценты при рЗРП и пЗРП (А) и рПЭ и пПЭ (Б).

*Представлены изменения (повышение/снижение) содержания гликанов по отношению к их содержанию при нормальной беременности.

Особенностью паттернов гликозилирования синцитиотрофобласта (Рис 4, Б) и фетального эндотелия терминальных ворсин плаценты (Рис. 5, Б) при ПЭ (рПЭ (n=15); пПЭ (n=15)) является схожий характер изменений терминальных гликанов по отношению к норме (n=15): повышена экспрессия манно- и фукогликанов, гликанов терминированных остатками Gal β 1,4GlcNAc β 1-, олиго-N-ацетилглюкозамина, N-ацетилнейраминовой кислоты, а также снижены α 2,3-сиалогликаны. Специфичные изменения фиксируются в каждой структуре плаценты, но они единичные (Рис. 4, Б, Рис. 5, Б). Субтерминальные фрагменты гликанов синцитиотрофобласта также изменены единообразно (Рис. 4, Б). В фетальном эндотелии – при схожих изменениях подавляющего числа субтерминальных фрагментов гликанов выявляется снижение содержания Gal α - и N-ацетилгалактозамина в тканях плацент при рПЭ (Рис. 5, Б).

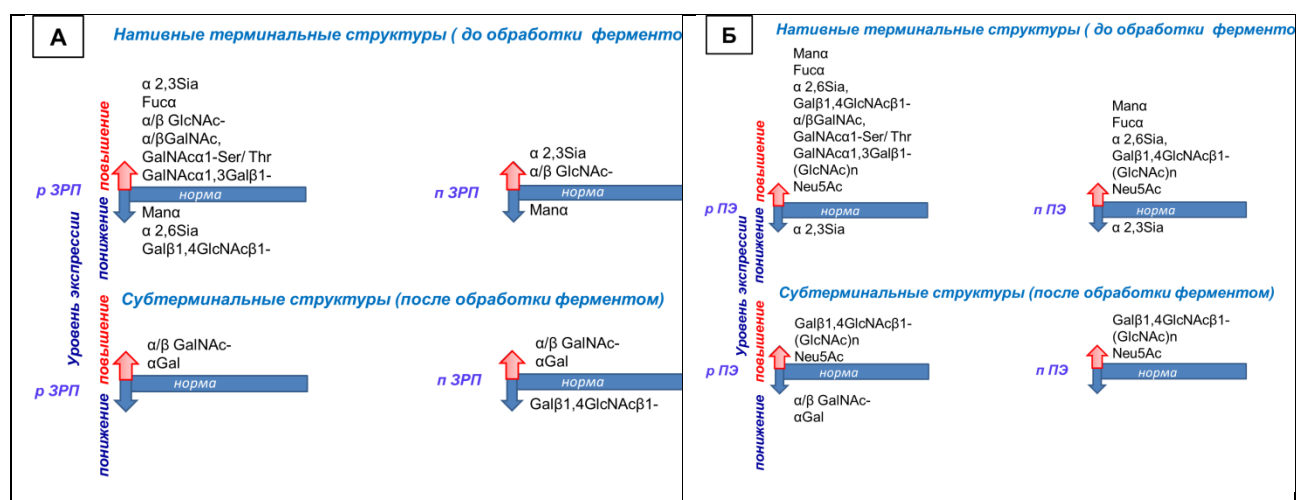


Рисунок 5. Изменения содержания терминальных гликанов (нативные структуры) и субтерминальных фрагментов гликанов эндотелия терминальных ворсин плаценты при рЗРП и пЗРП (А) и рПЭ и пПЭ (Б).

*Представлены изменения (повышение/снижение) содержания гликанов по отношению к их содержанию при нормальной беременности.

Анализ состава гликопаттернов в основных функциональных единицах плацентарного барьера свидетельствуют, что, несмотря на выявленное, в ряде случаев, сходство, они специфичны для отдельной нозологии, и ее фенотипа. Результаты демонстрируют общие и индивидуальные изменения гликозилирования в структурах плацентарного барьера терминальных ворсин и свидетельствуют о развитии гликопатологии плаценты при ПЭ и ЗРП. Выявляемые фрагменты гликанов имеют высокую распространенность в составе сложных гликанов мембранных рецепторов, регулирующих рост и развитие плаценты. Образованные ими гликопаттерны могут формировать “образы опасности”, которые служат фактором активации иммунной системы матери и плода и вызывают нарушения толерантности.

2. Патогенетические особенности продукции факторов периферической толерантности при плацента-ассоциированных осложнениях беременности

Установленный факт развития гликопатологии в ключевых структурах, составляющих плацентарный барьер у беременных с ПЭ и ЗРП, позволяет

предполагать, что измененные гликаны плаценты стимулируют клеточный и гуморальный иммунный ответ, а также являются мишенями АгАТ. Это предположение обосновало формулирование гипотезы о наличии в тканях плаценты резидентных антител, направленных к гликанам, которые воспринимаются иммунной системой матери как “образы опасности”, и могут выступать в качестве мишеней для этих антител. Для подтверждения гипотезы, было проведено исследование комплекса иммунологических факторов, которые регулируют формирование толерантности к плоду на системном (в крови) и локальном (в плаценте) уровнях с акцентом на факторах, влияющих на гликозилирование и стимулирующих продукцию антител с блокирующими свойствами.

Экспрессия мРНК генов иммунорегуляторных факторов в плаценте

Результаты свидетельствуют, что из панели иммунорегуляторных факторов, исследованных в плаценте, значимые различия выявлялись только по экспрессии мРНК гена *PIBF* (Таблица 2), который регулирует протективный для плода Th2-иммунный ответ [Raghupathy R., 2009], способствуя стимуляции экспрессии Th2-цитокинового паттерна, в частности IL-4 и IL-10 [Piccinni M.P., 2021], а также регулирует N-гликозилирование IgG и синтез антител В-лимфоцитами [Prados M.B., 2011].

Таблица 2. Уровень экспрессии мРНК генов факторов, регулирующих периферическую толерантность в плаценте в норме, при ПЭ и ЗРП.

Гены	НБ (n=38)	ПЭ (n=36)	ЗРП (n=13)	p ₁	p ₂	p ₃
<i>PIBF1</i>	1,0E ⁻⁰¹ (0,8E ⁻⁰¹ – 1,3E ⁻⁰¹)	0,7E ⁻⁰¹ (0,4E ⁻⁰¹ – 0,9E ⁻⁰¹)	0,8E ⁻⁰¹ (0,6E ⁻⁰¹ – 1,1E ⁻⁰¹)	<0,001	0,115	0,001
<i>HLA G</i>	0,8E ⁻⁰⁴ (0,08E ⁻⁰⁴ – 2,8E ⁻⁰⁴)	1,0E ⁻⁰⁴ (0,2E ⁻⁰⁴ – 4,5E ⁻⁰⁴)	2,3E ⁻⁰⁴ (0,8E ⁻⁰⁴ – 9,0E ⁻⁰⁴)	0,500	0,086	0,178
<i>TGF β</i>	1,1E ⁻⁰¹ (0,3 ⁻⁰¹ – 1,9E ⁻⁰¹)	0,6E ⁻⁰¹ (0,9E ⁻⁰¹ – 1,3E ⁻⁰¹)	1,5E ⁻⁰¹ (0,07E ⁻⁰¹ – 3,7E ⁻⁰¹)	0,126	0,957	0,305
<i>IL-6</i>	0,4E ⁻⁰⁵ (0,0 – 1,9E ⁻⁰⁵)	0,2E ⁻⁰⁵ (0,0 – 1,8E ⁻⁰⁵)	0,8E ⁻⁰⁵ (0,0 – 2,0E ⁻⁰⁵)	0,481	0,877	0,690
<i>IL-10</i>	2,6E ⁻⁰⁵ (0,8E ⁻⁰⁵ – 5,0E ⁻⁰⁵)	2,5E ⁻⁰⁵ (1,0E ⁻⁰⁵ – 4,5E ⁻⁰⁵)	1,8E ⁻⁰⁵ (1,2E ⁻⁰⁵ – 3,4E ⁻⁰⁵)	0,570	0,589	0,786

данные представлены в виде медианы с интерквартильным размахом.

p₁ – сравнение ПЭ с нормальной беременностью (НБ), тест Манна-Уитни; p₂ – сравнение ЗРП с НБ, тест Манна-Уитни; p₃ – тест Краскелла-Уоллеса (p=0,025).

Характеристика пЛАГАТ(IgG)

Одной из причин нарушений развития толерантности к плоду считается недостаточная продукция т.н. “блокирующих антител”, которые связываются с аллоантигенами плода в плаценте и маскируют их от распознавания иммунными

клетками матери и развития эффекторных реакций. Их наличие в плаценте было продемонстрировано при нормальной беременности [Borel I.M. et al., 1991], а снижение – при патологии [Eblen A.C., et al., 2000, Barrientos G. et al., 2009]. Однако их эпитопная специфичность не исследована, как не изучены и системные функции в организме, что важно, поскольку они были выявлены не только в ткани плаценты, но и в периферической крови матери [Borel I.M. et al., 1989. Zenclussen A.C., et al., 2001].

В диссертационном исследовании проведено выделение резидентных антител (связанных с антигенами) из ткани плаценты последовательной элюцией кислым и щелочным буферными растворами. Выбор условий элюции антител был произведен на основании оценки выхода антител (в элюате, с помощью гликанового эррея). Из четырех апробированных протоколов был выбран один, по которому производилось выделение антител стандартно [Игнатьева Н.В., 2018]. Для стандартизации результатов были оценены влияние: условий выделения антител, условий их хранения (добавление ингибиторов протеаз, температуры, времени хранения до анализа) и выбраны параметры, которые использовались в каждом эксперименте по выделению антител. С помощью гликанового эррея элюаты анализировали на содержание АгАТ (совокупно было проанализировано 800 антител, представленных иммуноглобулинами М и G).

При анализе полученных данных: а) рассчитывалась встречаемость конкретного антитела в элюатах пациенток с нормальной беременностью и осложненной ПЭ, и проводилось сопоставление с его встречаемостью в периферической крови; б) для наиболее часто встречающихся в элюатах плАгАТ определяли их значимость в межгрупповом сравнении - в когортах “здоровые беременные” и “беременные с ПЭ”.

В элюатах выявлялись только АгАТ (IgG), но не АгАТ(IgM). Количество специфичностей антител, детектируемых в крови, значительно выше, чем в элюатах плаценты (Рис. 6). В периферической крови число выявленных специфичностей (профиль) антител в норме и при ПЭ было сопоставимо. В элюатах профиль антител оказался значительно уже, чем в крови. Самый узкий профиль был в элюатах плаценты при ПЭ (Рис. 6).

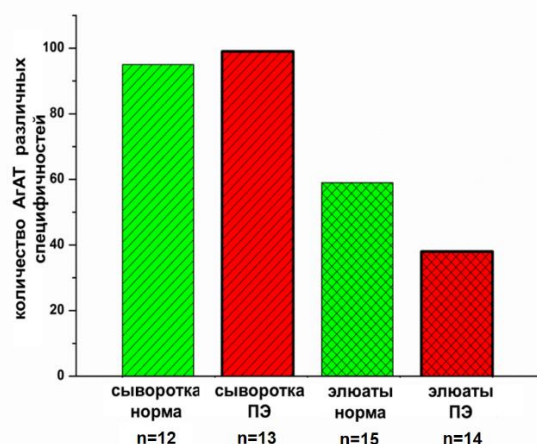


Рисунок 6. Количество специфичностей значимых АгАТ (выше порогового уровня, за который принимался сигнал 5 значений фонового связывания – т.е. сигнал от сайта, где отсутствовали гликаны – величина порогового уровня составила 465 УЕФ), обнаруженных в сыворотке крови и элюатах плаценты здоровых беременных и беременных с ПЭ.

Часто встречающимися считали антитела, которые имели сигнал выше порогового уровня у 75% индивидуумов в группе. На основании этого из 400 гликанов эррея, было выявлено 30, представленных в Таблице 3. Из 30 гликанов жирным цветом обозначены те, антитела к которым присутствуют в элюатах, но практически

отсутствуют в периферической крови. Т.е. эти антитела можно назвать истинными пЛАГАТ.

Таблица 3. Гликаны, с которыми связываются пЛАГАТ

№	Гликан (тривиальное название)	№	Гликан (тривиальное название)
1	<u>GalNAcα-OSer (Tn)* #</u>	16	Galα1-3(Galα1-4)Galβ1-4GlcNAcβ-sp*
2	ManNAc β -sp	17	Gal β 1-3GlcNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp
3	<u>Neu5Acβ-Bn* #</u>	18	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β -sp (LNnT)
4	Gal α 1-3GlcNAc β -sp	19	(GlcNAc β 1)3-3,4,6GalNAc α -sp
5	GalNAc α 1-3GalNAc β -sp (Fs) *	20	Gal β 1-3GlcNAc α 1-3Gal β 1-3GlcNAc β -sp
6	Gal β 1-4Glc β -sp-Trp (Lac)	21	Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β -sp (Галили (penta)) #
7	GlcNAc β 1-4[3-O-CH(CH ₃)CO-L-Ala-D-i-Gln-Lys]GlcNAcOH (GMDP)	22	GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-sp (chitopentaose)*
8	GalNAc α 1-3GalNAc β -sp	23	Gal α 1-6Glc α -sp
9	Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAcβ-sp (LeA)*	24	Gal α 1-6Glc β -sp (melibiose)
10	GlcNAc β 1-2Gal β 1-3GalNAc α -sp	25	Galβ1-3GalNGcα-sp (TF(Gc))*
11	GlcNAc β 1-4(GlcNAc β 1-6)GalNAc α -sp	26	Gal α 1-4GalNAc α -sp
12	GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-6)GlcNAc β -sp	27	GalNAc β 1-4GalNAc α -sp
13	GlcNAc β 1-4Gal β 1-4GlcNAc β -sp	28	GlcNAc β 1-4GalNAc α -sp
14	Gal β 1-3GlcNAc α 1-3GalNAc α -sp	29	Glc β 1-3GalNAc β -sp
15	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β -sp-Trp (3'SL)	30	GlcNAc β 1-2Gal β -sp

Примечание: *Жирным цветом обозначены гликаны, антитела к которым часто встречаются в элюатах, но практически отсутствуют в крови; синим цветом отмечены гликаны, антитела к которым выявлены при межгрупповых сравнениях у новорожденных и входят в состав диагностических сигнатур (см. ниже); # подчеркиванием выделены гликаны, антитела к которым аффинно выделялись на сорбенте. sp* –аминоэтильный, аминопропильный или глицильный спейсер.

Статистический анализ показал, что из АГАТ, которые связываются с гликанами, представленными в Таблице 3, только по трем антителам, выявляются значимые различия. Их уровень у здоровых беременных был выше, чем у беременных с ПЭ (Рис.7).

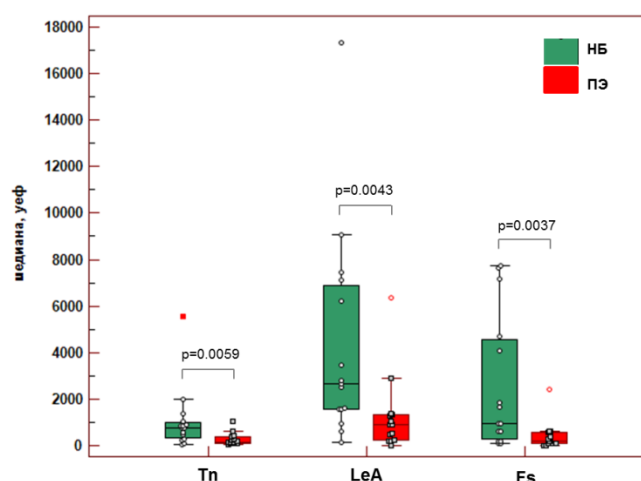


Рисунок 7. Содержание плАГAT(IgG) в элюатах плаценты пациенток с нормальной беременностью (НБ, n=15) и ПЭ (n=14).

Tn - коровый фрагмент О-цепей;

Fs - терминальный дисахарид гликолипида Форссмана (антиген системы групп крови FS);

LeA - антиген системы групп крови Lewis.

На основании анализа: 1) профиля специфичности плАГAT(IgG) (Таблица 3), 2) их относительного количественного содержания в ткани плаценты, 3) содержания антител исследуемых специфичностей в IgG-препарате, была оценена возможность выделения антител из IgG-препарата и элюатов плаценты в количествах, необходимых для проведения функциональных тестов и окрашивания ткани плаценты. Самое высокое содержание антител в IgG-препарате выявлено для анти-Галили, анти-Neu5Ac β -Bn и анти-Tn антител, которые были выделены из него в достаточных количествах для окраски ткани плаценты и проведения функциональных тестов. Из элюатов в значимом количестве были выделены только анти-Галили антитела (в норме и при патологии) и анти-Tn антитела (только в норме). Для выделенных антител была дана характеристика эпитопной специфичности (для всех антител) и проведено изотипирование IgG (только для анти-Галили). Окраска ткани плаценты и проведение функциональных тестов на клетках линии EAhy 926 производились только для аффинно выделенных из IgG-препарата антител в связи с невозможностью выделить из ткани плаценты антитела в количествах, необходимых для этих тестов.

Характеристика эпитопной специфичности плАГAT(IgG)

При обработке данных гликанового эррея для каждого аффинно выделенного антитела был получен профиль специфичности (Рис. 8), который сравнивался с профилем исходного IgG-препарата (колонка 1), где сигналы, отражающие активность связывания лигандов эррея с антителами, были отсортированы по принципу от самых высоких к низким (на Рис. 8 представлены топовые лиганды, связывающие антитела). Как демонстрирует Рис. 8 А, профиль специфичности аффинно выделенных из IgG-препарата анти-Галили антител на колонке с сорбентом, несущим трисахарид Галили (Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β), был самым широким. В профиле связывания представлены преимущественно антигены Галили (три-, тетра- и пентасахариды), α Gal-терминированные (не Галили) гликаны, а также олигосахариды, не имеющие структурного сходства с исследуемым антигеном. Профиль специфичности анти-Tn антител, выделенных на аффинной колонке с сорбентом, несущим моносахарид Tn (GalNAc α -), демонстрирует связывание преимущественно с гликанами, имеющими GalNAc α в коре, причем максимальная активность связывания установлена с 6-O-Su-

GalNAcα (Рис. 8 Б). Анти-Neu5Acβ антитела, аффинно выделенные на сорбенте, несущем моносахарид Neu5Acβ-Bn (Neu5Acβ-OCH₂C₆H₄-p-NHCOCH₂NH₂), обладали узкой специфичностью – гликаны, содержащие в составе нейраминовую кислоту в β-конфигурации (Рис. 8 В). Продemonстрировано, что профили анти-Галили антител, выделенных из элюатов плаценты здоровых беременных и беременных с ПЭ, имеющих разные группы крови, совпадают частично (Рис. 8 А, колонки 3, 4 и 5, 6, соответственно). Также продemonстрировано, что антитела одной специфичности, выделенные из IgG-препарата и элюатов значительно различаются по гликтопам, с которыми связываются антитела на гликановом эррее Рисунок 8 А, Б, В).

А	Структура гликана	1	2А	3	4	5	6
149	GlcNAcβ1-4(6-O-Su)GlcNAcβ-						
246	GlcNAcβ1-2Galβ1-3GalNAcα-						
820	GlcNAcβ1-4GalNAcα-						
168	GlcNAcβ1-4Mur-L-Ala-D-i-Gln-Lys						
256	GlcNAcβ1-6(GlcNAcβ1-4)GalNAcα-						
279	Galβ1-3GlcNAcα1-3GalNAcα-						
410	Galβ1-3GlcNAcα1-3Galβ1-3GlcNAcβ-						
378	Galβ1-3GlcNAcα1-3Galβ1-4GlcNAcβ-						
808	Galα1-6Glcβ-						
815	Galα1-4GalNAcα-						
817	GalNAcβ1-4GalNAcα-						
828	GlcNAcβ1-2Galβ-						
126	6-Bn-Galα1-4(6-Bn)GlcNAcβ-						
80	Galα1-3GlcNAcβ-						
167	GlcNAcβ1-4[HOOC(CH ₃)CH ₂ -3-O-GlcNAcβ-						
855	maltose persulfate						
481	Galα1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ-						
137	Galβ1-4Glcβ--Nle						
251	GlcNAcβ1-4Galβ1-4GlcNAcβ-						
276	GlcNAcβ1-4Galβ1-4GlcNAcβ-						
82	Galα1-6Glcβ-						
536	Neu5Acα2-3Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ-						
82	Galα1-4GlcNAcβ-						
294	Neu5Acα2-3Galβ1-4Glcβ-						
73	Fucα1-4GlcNAcβ-						
272	Neu5Acα2-3Galβ1-4Glcβ--Cit						

Б	Структура гликана	1	2Б	4
149	GlcNAcβ1-4(6-O-Su)GlcNAcβ-			
246	GlcNAcβ1-2Galβ1-3GalNAcα-			
820	GlcNAcβ1-4GalNAcα-			
168	GlcNAcβ1-4Mur-L-Ala-D-i-Gln-Lys			
256	GlcNAcβ1-6(GlcNAcβ1-4)GalNAcα-			
279	Galβ1-3GlcNAcα1-3GalNAcα-			
410	Galβ1-3GlcNAcα1-3Galβ1-3GlcNAcβ-			
378	Galβ1-3GlcNAcα1-3Galβ1-4GlcNAcβ-			
808	Galα1-6Glcβ-			
815	Galα1-4GalNAcα-			
817	GalNAcβ1-4GalNAcα-			
828	GlcNAcβ1-2Galβ-			
126	6-Bn-Galα1-4(6-Bn)GlcNAcβ-			
80	Galα1-3GlcNAcβ-			
167	GlcNAcβ1-4[HOOC(CH ₃)CH ₂ -3-O-GlcNAcβ-			
855	persulfate maltose			
481	Galα1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ-			
137	Galβ1-4Glcβ--Nle			
251	GlcNAcβ1-4Galβ1-4GlcNAcβ-			
276	GlcNAcβ1-4Galβ1-4GlcNAcβ-			
24	GlcNAcα-			
818	GalNAcα1-4GalNAcα-			
136	Galβ1-4Glcβ--Ile			
102	GalNAcα1-3Galβ-			
512	GalNAcα1-3Galβ1-4GlcNAcα1-3Galβ1-4GlcNAcβ-			
41	6-O-Su-GalNAcα-			

Рисунок 8. Характеристика эпитопной специфичности аффинно выделенных AgAT(IgG) из IgG-препарата и элюатов плаценты здоровых беременных и беременных с ПЭ*.

(А) – профиль анти-Галили;
(Б) -профиль анти Tn;
(В) - профиль анти-Neu5Acβ-Bn антител.

1. IgG препарат
2. аффинно выделенные IgG из IgG-препарата:
2А - анти-Галили IgG;
2Б - анти-Tn IgG;
2В - анти-Neu5Acβ-Bn IgG
3. аффинно выделенные анти-Галили IgG из элюата плаценты пациентки с нормальной беременностью I (0) гр. крови
4. аффинно выделенные IgG из элюата плаценты пациентки с нормальной

В	Структура гликана	1	2В
149	GlcNAcβ1-4(6-O-Su)GlcNAcβ-		
246	GlcNAcβ1-2Galβ1-3GalNAcα-		
820	GlcNAcβ1-4GalNAcα-		
168	GlcNAcβ1-4Mur-L-Ala-D-i-Gln-Lys		
256	GlcNAcβ1-6(GlcNAcβ1-4)GalNAcα-		
279	Galβ1-3GlcNAcα1-3GalNAcα-		
410	Galβ1-3GlcNAcα1-3Galβ1-3GlcNAcβ-		
378	Galβ1-3GlcNAcα1-3Galβ1-4GlcNAcβ-		
808	Galα1-6Glcβ-		
815	Galα1-4GalNAcα-		
817	GalNAcβ1-4GalNAcα-		
828	GlcNAcβ1-2Galβ-		
126	6-Bn-Galα1-4(6-Bn)GlcNAcβ-		
80	Galα1-3GlcNAcβ-		
167	GlcNAcβ1-4-(HOOC(CH ₃)CH ₂ -3-O-GlcNAcβ-		
855	persulfate maltose		
481	Galα1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ-		
137	Galβ1-4Glcβ--Nle		
251	GlcNAcβ1-4Galβ1-4GlcNAcβ-		
276	GlcNAcβ1-4Galβ1-4GlcNAcβ-		
51	Neu5Acβ-sp9		
173	Neu5Acβ2-6GalNAcα-		
188	Neu5Acα2-8Neu5Acβ-sp9		
50	Neu5Acβ-		
344	Neu5Acβ2-3Galβ1-4GlcNAcβ-		
340	Galα1-3(Neu5Acβ2-6)GalNAcβ-		

беременностью II гр
.крови

4(А) анти-Галили IgG

4(Б) анти-Tn IgG

5. аффинно выделенные
анти-Галили IgG из
элюата плаценты
пациентки с ПЭ I (0) гр.
крови

6. аффинно выделенные
анти-Галили IgG из
элюата плаценты
пациентки с ПЭ II (А) гр.
крови

*в каждом профиле
представлены 26 топовых
антител

Изотипический состав A₂AT(IgG) выделенных из разных источников (IgG-препарат, элюаты плаценты)

Соотношения изотипов IgG выражали в %, принимая общее содержание всех изотипов IgG в образцах антител за 100%. На Рис. 9 продемонстрирован изотипический состав IgG антител, выделенных из IgG-препарата (Рис. 9 А) и изотипический состав анти-Галили IgG, выделенных из элюатов плаценты (Рис. 9 Б). В качестве контрольного образца №1 был использован IgG-препарат (исходный IgG-препарат) с нормальным распределением изотипов IgG: 66% IgG₁, 23% IgG₂, 7% IgG₃ и 4% IgG₄. В исследуемых образцах анти-Галили, анти-Tn и анти-Neu5Acβ-Bn антител, аффинно-выделенных из IgG-препарата (контрольного образца №1), изотип IgG₂ преобладал над IgG₁, IgG₃ и IgG₄ (Рис. 9 А). Относительные соотношения изотипов IgG в контрольном образце №1 отличались от определенных в дополнительном контрольном образце №2 анти-Btri антител, хорошо изученных антител системы АВ0, аффинно-выделенных из “Иммуноглобулинового комплексного препарата для энтерального применения”, (КИП), (“НПО “Микроген”, Россия), который представляет собой лиофилизированный комплекс иммуноглобулинов человека классов IgG, IgM и IgA, выделенных из пула плазмы крови от 1000 здоровых доноров. В контрольном образце №2 изотипы IgG₄ и IgG₂ преобладали над остальными изотипами IgG (Рис. 9 А), в отличие от анти-Галили, анти-Tn и анти-Neu5Acβ-Bn антител.

В анти-Галили антителах, выделенных из элюатов с плаценты здоровых беременных и беременных с ПЭ, было выявлено соотношение изотипов IgG близкое к контрольному образцу (Рис. 9 Б). Пр продемонстрировано, что при беременности в ткани плаценты содержится меньше анти-Галили антител изотипа IgG₁ (минимальное содержание в элюате беременных с ПЭ), чем в IgG-препарате, который демонстрирует усредненные значения содержания изотипов IgG анти-Галили антител в популяции. В

элюатах плаценты беременных с ПЭ выявлено более высокое содержание изоформ IgG_2 , IgG_3 и IgG_4 , чем в IgG -препарате и в элюате нормальной плаценты.

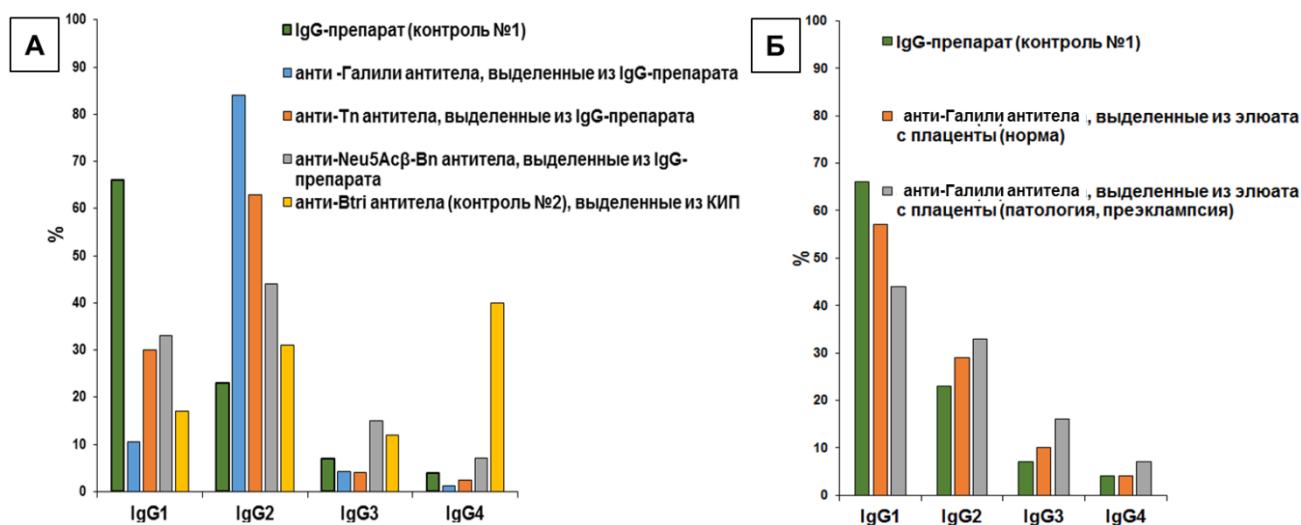


Рисунок 9. Относительное содержание (%) изоформ $IgG_1/G_2/G_3/G_4$ в A_2AT , аффинно-выделенных из (А) IgG -препарата, (Б) элюатов плаценты. В качестве контрольных образцов использованы исходный IgG -препарат (контроль №1) и аффинно-выделенные анти-Btri антитела с известным соотношением изоформ IgG (контроль №2).

Окрашивание тканей плаценты аффинно выделенными $A_2AT(IgG)$

Результаты окрашивания ткани плаценты аффинно выделенными из IgG -препарата биотинилированными анти-Галили антителами представлены на Рис. 10. Установлено, что анти-Галили антитела окрашивают ткани как нормальной, так и патологической плаценты беременных с ПЭ и ЗРП, но интенсивность окрашивания и гистотопография окрашенных гикотопов различна. Наибольшая интенсивность наблюдалась в синцитиотрофобласте ворсин в ткани нормальной зрелой плаценты (Рис. 10 А). Обработка ткани нормальной плаценты α -галактозидазой (Рис. 10 Б) не привела к уменьшению интенсивности окраски. В ткани плаценты пациенток с ПЭ окрашивание анти-Галили антителами показало наличие окрашивания синцитиотрофобласта отдельных ворсин (Рис. 10 В) и ядер клеток стромы ворсин (Рис. 10 Г). Обработка ткани плаценты пациентки с ПЭ α -галактозидазой привела к ослаблению окрашивания во всех структурах и большинстве ворсин, с сохранением слабого окрашивания в единичных ворсинах (Рис. 10 Д). В плаценте беременной с ЗРП при использовании анти-Галили антител выявляется умеренное окрашивание синцитиотрофобласта единичных ворсин (Рис. 10 Е), которое полностью исчезает после воздействия α -галактозидазы.

Полученные данные свидетельствуют о значительных различиях в репертуаре эпитопов, окрашиваемых анти-Галили антителами в тканях плаценты пациенток с нормальной и осложненной развитием ПЭ и ЗРП беременностью. В гликокаликсе синцитиотрофобласта при ПЭ и ЗРП, а также в составе ядерной мембраны стромальных клеток у больных с ПЭ αGal -подобные эпитопы представлены в

значительном количестве. В нормальной ткани эпитопы, пространственно похожие на антиген Галили, отсутствуют.

При окрашивании тканей плаценты анти-Tn и анти-Neu5Ac β -Vn антителами окрашенные сайты выявлены не были (данные не демонстрируются).

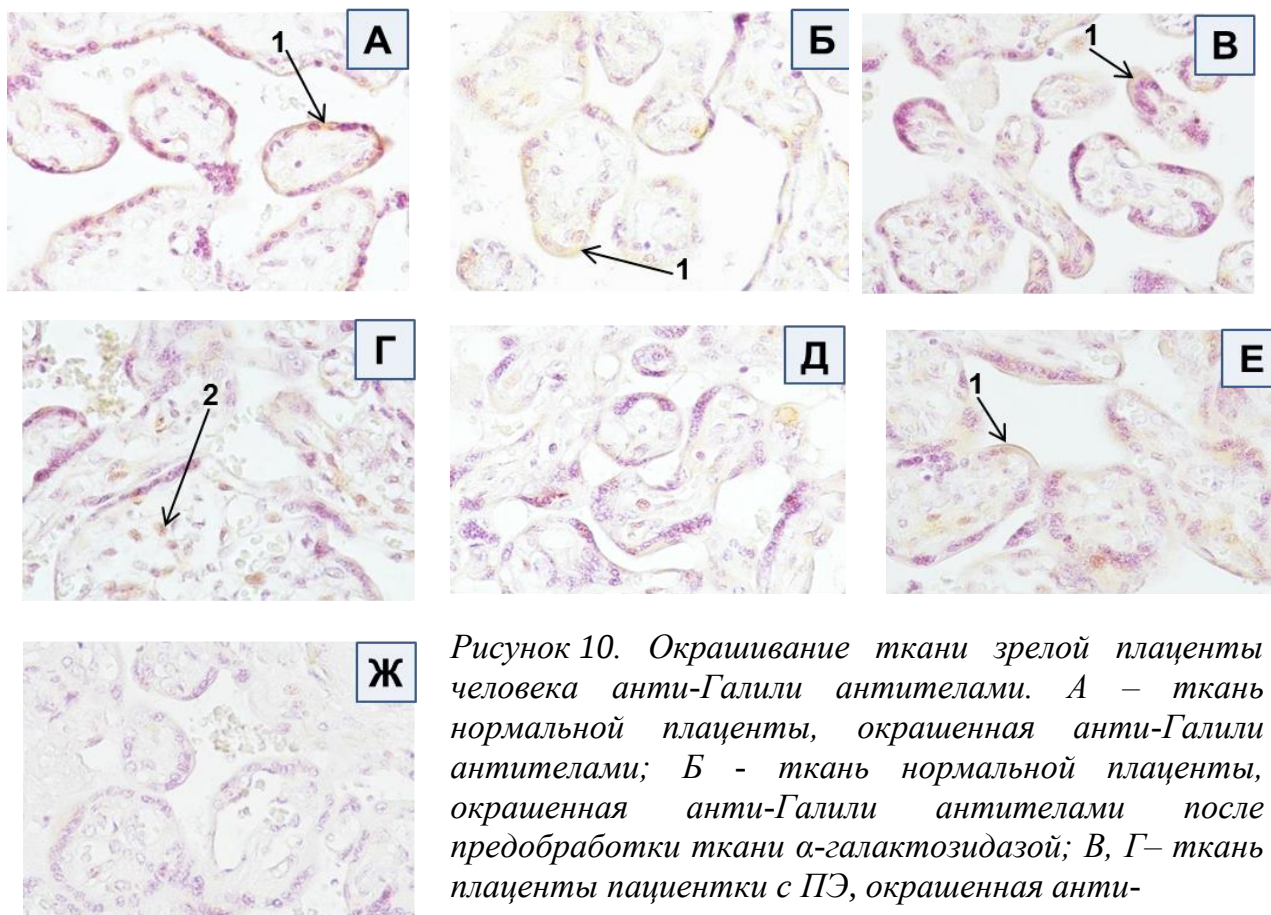


Рисунок 10. Окрашивание ткани зрелой плаценты человека анти-Галили антителами. А – ткань нормальной плаценты, окрашенная анти-Галили антителами; Б - ткань нормальной плаценты, окрашенная анти-Галили антителами после предобработки ткани α -галактозидазой; В, Г – ткань плаценты пациентки с ПЭ, окрашенная анти-

Галили антителами; Д - ткань плаценты пациентки с ПЭ, окрашенная анти-Галили антителами после предобработки ткани α -галактозидазой; Е - ткань плаценты пациентки с ЗРП, окрашенная анти-Галили антителами; Ж - ткань плаценты пациентки с ЗРП, окрашенная анти-Галили антителами после обработки ткани α -галактозидазой. 1 – синцитиотрофобласт; 2 – ядра клеток стромы ворсин плаценты. Увеличение: $\times 400$.

Влияние аффинно выделенных антител на экспрессию маркеров активации клеток линии EA.hy926

Для исследования функциональной активности аффинно выделенных антител была использована модель провоспалительной активации клеток линии EA.hy926, которые экспрессируют основные фенотипические маркеры эндотелия крупных сосудов. Оценивалось изменение экспрессии маркеров активации эндотелия в ответ на внесение в культуральную среду антител в условиях провоспалительной активации при действии TNF α (Рис. 11).

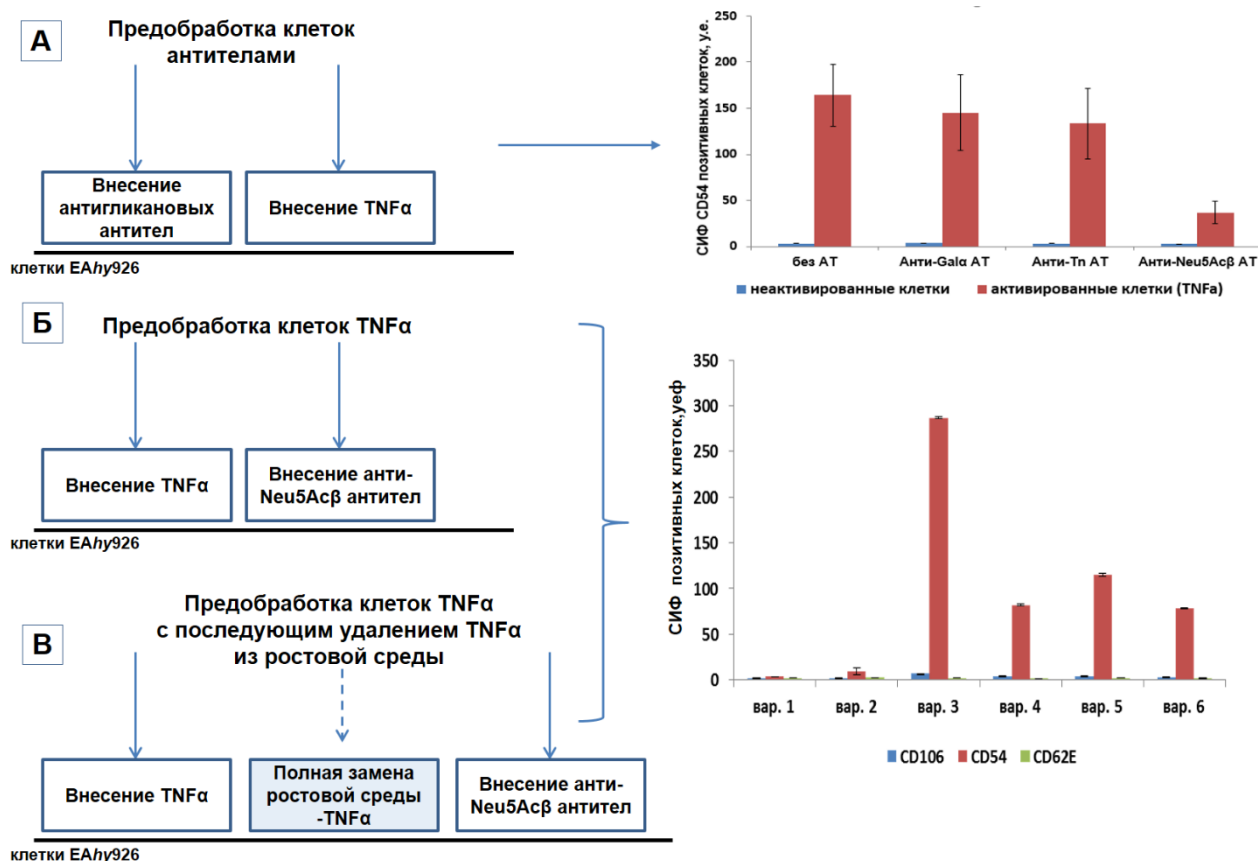


Рисунок 11. Влияние аффинно выделенных АгАТ на экспрессию активационных маркеров клеток линии EA.hy 926 в разных экспериментальных условиях *in vitro*.

А - предобработка клеток АгАТ (анти-Галили, анти-Tn и анти-Neu5Acβ- антителами) с последующим внесением в среду TNFα. Эффект АгАТ на экспрессию CD54 клетками линии EA.hy 926.

Б - предобработка клеток TNFα с последующим внесением в среду анти-Neu5Acβ антител; **В** - предобработка клеток TNFα с последующим заменой среды и внесением анти-Neu5Acβ антител. Эффект анти-Neu5Acβ антител на экспрессию CD106, CD54, CD62E.

вар. 1 – клетки линии EA.hy 926, инкубированные в ростовой среде без добавок; **вар. 2** – клетки линии EA.hy 926, инкубированные с анти-Neu5Acβ антителами; **вар. 3** - клетки линии EA.hy 926, инкубированные с TNFα; **вар. 4** – клетки линии EA.hy 926, предобработанные TNFα (4 часа) и инкубированные с анти-Neu5Acβ антителами; **вар. 5** - клетки линии EA.hy 926, инкубированные с TNFα с дальнейшей заменой среды на ростовую среду без добавок; **вар. 6** - клетки линии EA.hy 926, инкубированные с TNFα с дальнейшей заменой среды на ростовую среду с добавлением анти-Neu5Acβ антител. СИФ - средняя интенсивность флуоресценции.

Установлено, что из всех аффинно выделенных АгАТ, которые были внесены в ростовую среду до воздействия TNFα (предобработка клеток линии EAhy926 антителами, которая моделирует развитие воспалительного ответа в присутствии естественных АгАТ), только анти-Neu5Acβ антитела снижали экспрессию молекулы CD54 (ICAM-I) клетками (Рис. 11 А). Поскольку в данной модели эффект был установлен только для анти-Neu5Acβ антител, дальнейшие исследования по моделированию влияния антител на эндотелий проводились только для них.

Также рассматривались варианты влияния анти-Neu5Ac β антител на эндотелий в условиях: 1) воздействия антител после активации клеток EAhy926 TNF α (моделирование терапевтического эффекта антител в условиях развившегося воспалительного ответа) (Рис. 11 Б); 2) воздействия антител после активации клеток EAhy926 TNF α и полной заменой ростовой среды на среду культивирования, не содержащую TNF α (моделирование влияния антител на последствия эндотелиальной активации) (Рис. 11 В).

Во всех вариантах воздействия на эндотелий анти-Neu5Ac β антитела сокращали экспрессию CD54 клетками EAhy926 (Рис. 11 А, Б, В вар. 3.; вар. 4; вар. 5; вар. 6).

Была исследована дозозависимость влияния анти-Neu5Ac β -антител на экспрессию маркеров активации эндотелия, которая оказалась наиболее выраженной в отношении CD54 (Рис. 12 А, Б, В). Установлена концентрация анти-Neu5Ac β -антител, которая снижает экспрессию поздних маркеров активации эндотелия (Рис. 12 А, Б).

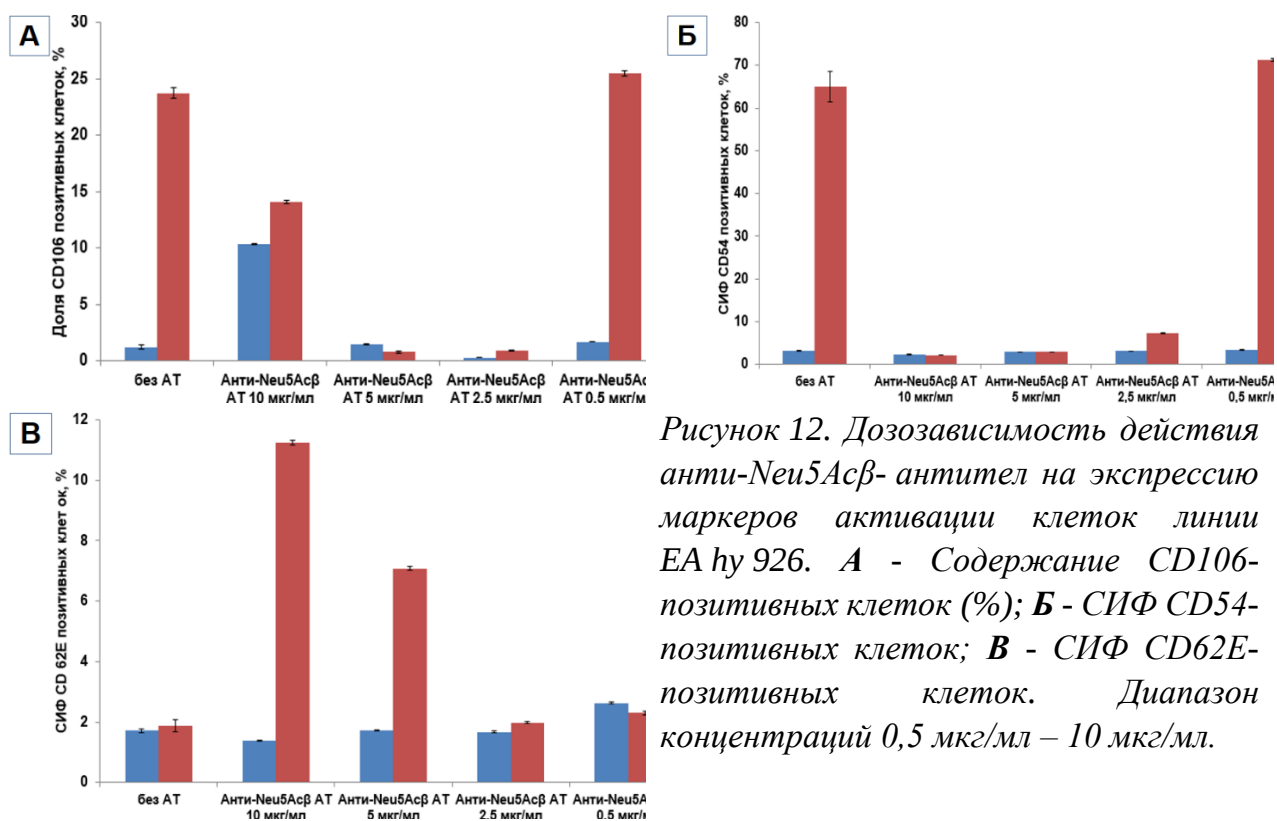


Рисунок 12. Дозозависимость действия анти-Neu5Ac β -антител на экспрессию маркеров активации клеток линии EA hy 926. А - Содержание CD106-позитивных клеток (%); Б - СИФ CD54-позитивных клеток; В - СИФ CD62E-позитивных клеток. Диапазон концентраций 0,5 мкг/мл – 10 мкг/мл.

3. Исследование субпопуляционного состава иммунокомпетентных клеток в периферической крови матери и пуповинной крови новорожденных

Поскольку в ткани плаценты пациенток с ПЭ были выявлены измененные гликопаттерны, в частности антигены, которые могут активировать иммунную систему матери и плода и вызывать реакции хронического отторжения, на втором этапе было проведено исследование субпопуляционного состава иммунокомпетентных клеток периферической крови матери и пуповинной крови методом цитофлуориметрии. Проводилась всесторонняя оценка основных субпопуляций клеток иммунной системы с акцентом на клетки регуляторных и активированных фенотипов (Рис. 3).

Установлено, что по содержанию больших субпопуляций Т- и В-клеток, а также субпопуляций НК-клеток, включая НК-клетки с фенотипом регуляторных, и НКТ-клетки, значимых различий между здоровыми беременными и беременными с ПЭ достигнуто не было. Аналогичные результаты были получены по пуповинной крови. Из малых субпопуляций, исследованных в данной работе, значимые различия между группами здоровых беременных и беременных с ПЭ получены по: содержанию транзитных В-клеток фенотипа $CD19^+CD38^{++}CD27^-$, наивных зрелых В-клеток $CD19^+CD38^+CD27^-$ и В-клеток предшественников герминативного центра (Вm2' пре-GC) с фенотипом $CD19^+CD38^{++}IgD^+$ (повышение в 5,5; 1,8 и 2,4 раза в крови беременных с ПЭ, соответственно, Рис. 13 А, Б). Также у беременных с ПЭ отмечалось значимое снижение содержания покоящихся $CD19^+CD38^-CD27^+$ и поздних (Вm5) В-клеток памяти $CD19^+CD38^-IgD^-$ в 3,1 раза в 28 раз, соответственно, по сравнению со здоровыми беременными. Пограничный уровень значимости выявлен для Вm1 девственно наивных и переключенных В-клеток памяти (снижение содержания у беременных с ПЭ, Рис. 13 А, Б).

У новорожденных от матерей с ПЭ в пуповинной крови выявлено сопоставимое содержание всех исследованных В-клеточных субпопуляций по сравнению с новорожденными от здоровых беременных. Единственная субпопуляция, демонстрирующая тенденцию к повышенному содержанию – наивные зрелые В-клетки $CD19^+CD38^+CD27^-$ (их содержание у новорожденных от матерей с ПЭ было повышенным 51,22 % (44,34-56,79) по сравнению с нормой 37,40 % (30,22-44,07), $p=0,062$).

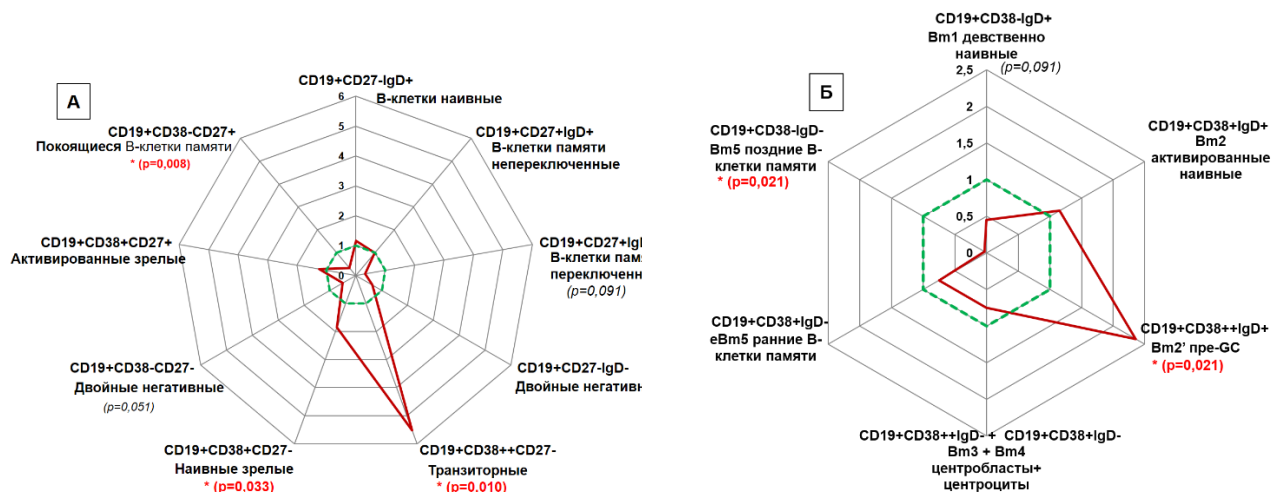


Рисунок 13. Малые субпопуляции В-клеток периферической крови беременных. По осям представлены отношения средних значений показателей у беременных с ПЭ ($n=10$) к показателям в контрольной группе (нормальная беременность, $n=10$). Пунктирная линия соответствует уровню равенства значений. * - показатель, значимо отличающийся от контрольных значений.

Анализ малых субпопуляций Т-клеток показал, что у матерей с ПЭ отсутствуют значимые изменения содержания Т-хелперных и Т-цитотоксических клеток с

фенотипом регуляторных, а также Т-цитотоксических эффекторных клеток. Тенденцию к повышенному содержанию у матерей с ПЭ демонстрирует субпопуляция активированных Т-хелперных клеток CD4⁺CD25⁺CD127⁺: 2,48% (2,31-3,56) у беременных с ПЭ, против 1,92% (0,75-2,40) в норме (p=0,076).

Из всех исследованных малых субпопуляций Т-клеток у новорожденных от матерей с ПЭ (n=10) выявлено значимое повышение содержания активированных Т-хелперов в общей фракции лимфоцитов (4,32% (3,88-4,73) против 1,09% (0,83-1,52), p=0,021) у здоровых новорожденных (n=10) от здоровых матерей. У новорожденных от матерей с ПЭ также выявляется повышение содержания Т-хелперов с фенотипом регуляторных 8,16% (7,57-9,60) по сравнению с новорожденными от здоровых матерей 7,13% (6,13-7,97) (p=0,051).

4. Исследование гуморальных факторов в периферической крови матери и пуповинной крови новорожденных

Выявленные изменения клеточного иммунитета у матерей с ПЭ, свидетельствующие о наличии активированных Т- и В-клеток и истощении пула В-клеток памяти, обосновали исследование гуморального звена иммунитета (третий этап). Акцент был сделан на исследование АгАТ и гуморальных факторов (прогестерона и IL-6), регулирующих продукцию “блокирующих” антител, поскольку на первом этапе был установлен дисбаланс экспрессии гликанов плаценты и выявлены различия в содержании пЛАгАТ, ассоциированных с ее тканью.

Содержание прогестерона и IL-6 в периферической и пуповинной крови

Установлено повышение содержания IL-6 в периферической крови матери: при ПЭ в 3 раза (значимо) и при ЗРП в 1,3 раза по сравнению с нормой. В пуповинной крови выявляется тенденция к высокому содержанию IL-6 при ПЭ ($\approx$ в 2 раза) и ЗРП в 1,2 раза (значимо) (Таблица 4). Содержание прогестерона, напротив, снижено: при ПЭ в 1,3 раза (значимо), у беременных с ЗРП в 1,2 раза (Таблица 4).

Таблица 4. Содержание прогестерона и IL-6 в периферической крови пациенток и пуповинной крови новорожденных (IL-6) с физиологической беременностью и беременностью, осложненной развитием ПЭ и ЗРП

Параметры	НБ (n=34)	ПЭ(n=36)	ЗРП(n=12)	p ₁	p ₂	p ₃
IL-6 периф. кровь (мать), пг/мл	0,94 (0,46-1,68)	2,82 (1,67-6,06)	1,07 (0,66-1,65)	<0,001	0,584	<0,001
IL-6 пупов. кровь, пг/мл	1,82 (1,26-3,82)	3,46 (1,91-6,71)	3,24 (2,68-6,07)	0,057	0,043	0,046
Прогестерон периф. кровь (мать), нмоль/л	497,53 (393,47-583,99)	375,10 (164,15-461,59)	418,39 (305,91-542,85)	0,002	0,305	0,007

Данные представлены как медианы с интерквартильным размахом.

p₁ – сравнение ПЭ с нормальной беременностью (НБ), тест Манна-Уитни; p₂ – сравнение ЗРП с нормальной беременностью (НБ), тест Манна-Уитни; p₃ – тест Краскелла- Уоллеса (p=0,025)

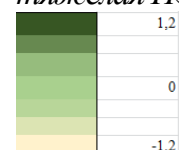
Характеристика профилей АгАТ у пациенток с нормальной беременностью и беременностью, осложненной БАС и ГРБ, включая ПЭ и ЗРП

Масштабный анализ АгАТ, представленных иммуноглобулинами классов М и G, которые были определены методом гликановых эрреев (было проанализировано совокупно более 800 АгАТ, представленных иммуноглобулинами классов М и G), показал, что на ранних сроках беременности, соответствующих манифестации ранних клинических форм ПЭ и ЗРП, значимые различия с нормальной беременностью выявлены только у беременных с ЗРП по одному АгАТ(IgM). На поздних сроках беременности выявлен более представительный набор АгАТ, отличающих нормальную беременность от патологически протекающей: у беременных с ЗРП выявлены пять АгАТ(IgM) отличных от нормы, у беременных с тПЭ три АгАТ(IgM) но более широкий набор АгАТ(IgG) выявлен у беременных с уПЭ (Рис. 14).

АгАТ(IgM)			
№	Структура гликана	Норма, <32нед	ЗРП, <32нед
2002	-3GlcNAcβ1-4GlcA3Acβ1-2(Rha3Acα1-3)Manα1-4Galβ1-		
АгАТ(IgM)			
№	Структура гликана	Норма, >34нед	ЗРП, >34нед
398	Galβ1-3GlcN(Fm)β1-3Galβ1-3GlcNAcβ-		
805	GalNAcβ1-4(6-O-Bn)GlcNAcβ-		
192	GalNAcβ1-4(6-O-Su)GlcNAcβ-		
168	GlcNAcβ1-4Mur-L-Ala-D-i-Gln-Lys		
241	(Glcα1-6)β-		
АгАТ(IgM)			
№	Структура гликана	Норма, >34нед	тПЭ, >34нед
2010	-2Gal/β1-3GlcNAcα1-8(3HOBu1-7)Pse5Ac2-6Galα1-6Glcα1-		
123	Manβ1-4GlcNAcβ-		
241	(Glcα1-6)β-		
АгАТ(IgG)			
№	Структура гликана	Норма, >34нед	уПЭ, >34нед
1223	-3Rhaα1-3Rhaα1-2Glcα1-3GlcNAcα1-		
818	GalNAcα1-4GalNAcα-		
221	Galα1-3Galβ1-4Glcβ-		
800	GlcNAcα1-4GlcNAcβ-		
398	Galβ1-3GlcN(Fm)β1-3Galβ1-3GlcNAcβ-		
479	Fucα1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ-		
164	GlcAβ1-3GlcNAcβ-		
497	Fucα1-2Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ-		
220	Galα1-3Galβ1-4Glcβ-		
632	(GlcAβ1-3GlcNAcβ1-4) ₁₂ -NH(p-C ₆ H ₄)CH ₂ CH ₂ NH ₂		
1605	-3(Glcα1-6)GlcNAcβ1-4(GlcNAcβ1-2)GlcAβ1-3(L-Thr2-6)GalAβ1-		
51	Neu5Acβ-		
529	Neu5Acα2-6(Galβ1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ-		
434	Neu5Acα2-8Neu5Acα2-3Galβ1-4Glcβ-		
293	Neu5Acα2-3Galβ1-4Glcβ-		
22	GlcNAcβ-		
296	Neu5Acα2-6Galβ1-4Glcβ-		
5	GalNAcα-		
237	GalNHα1-3(Fucα1-2)Galβ-OCH ₂ CH ₂ CH ₂ NHAc		
151	6-O-Su-Galβ1-3GalNAcα-		
1608	-3GlcAβ1-4(Galα1-3)FucNAcα1-3GlcNAcα1-		
103	GalNAcα1-3GalNAcα-		
273	Fucβ1-2Galβ1-4GlcNAcβ-		

Рисунок 14. Тепловая карта, демонстрирующая изменения АгАТ при ПЭ и ЗРП.

Медиана значения интенсивности флуоресценции, отражающая активность связывания АгАТ с гликанами эррея (отражает аффинность АгАТ и их количество) представлена в виде оттенков зеленого цвета, соответствующих изменению нормализованных значений интенсивности флуоресценции в диапазоне 1,2 - (-1,2). Представлены различия по значимым антителам. уПЭ – умеренная ПЭ; тПЭ – тяжелая ПЭ.



Результаты демонстрируют выраженные изменения гуморального иммунного ответа на гликаны только на поздних сроках беременности, причем при ПЭ выявляются

изменения более широкого репертуара АгАТ. Данные Рис. 14 свидетельствуют, что выявленные значимые АгАТ, уровень которых снижен при ЗРП и ПЭ, относятся к пулу регуляторных, естественных антител. Основными аргументами этого утверждения являются: 1) преимущественно выявленные антитела относятся к IgM (известно, что в пуле естественных антител IgM доминируют, составляя, как правило, величину ~80%); 2) выявленное снижение уровня АгАТ у пациенток с осложненной беременностью может свидетельствовать как об истощении пула предрасполагающих естественных АгАТ, так и об исходно низком их количестве у пациенток с ПЭ и ЗРП вследствие более низкой их продукции В1-клетками; 3) естественные антитела полиреактивны, их связывание с О-полисахаридами патогенных, условно-патогенных микроорганизмов, а также гликанами, которые не встречаются в природе, не является свидетельством присутствия этих бактерий в организме или предшествующей стимуляции ими иммунной системы матери. Скорее, АгАТ распознают не представленный на эррее гликан, а его мимотоп. Часть АгАТ, которые демонстрируют более высокое содержание при патологии беременности, могут относиться к адаптивным антителам, которые продуцируются в ответ на “образы опасности”, источником которых является ткань плаценты при ПЭ и ЗРП.

Для установления патогенетической роли АгАТ при ПЭ было проведено сравнение репертуаров АгАТ при физиологической беременности и при осложнениях, которые входят в группу ГРБ, но не имеют тяжелых последствий для матери и ребенка. Анализ результатов свидетельствует, что наиболее масштабный репертуар АгАТ, представленных иммуноглобулинами обоих классов выявлялся при беременности на фоне ХАГ, причем значительное число АгАТ было выше нормы. У беременных с ГАГ выявляется сниженное содержание АгАТ(IgG). Гликаны, с которыми связываются АгАТ беременных с ГРБ, включая ПЭ представлены на Рис. 14 и Рис. 15.

На основании полученных результатов были определены диагностические сигнатуры АгАТ, которые позволяют дифференцировать нозологии группы ГРБ и уточнять степень тяжести ПЭ. Характеристики сигнатур АгАТ представлены в Таблице 5.

Таблица 5. Характеристика и состав диагностических сигнатур для дифференциации нозологий группы ГРБ

№	Дифференциация заболеваний	Гликаны, связывающиеся с АгАТ, составляющими сигнатуру (№ гликана, класс Ig)	AUC	Sp	Se
1	уПЭ vs ХАГ (после 34 недель)	•GalNH₁-3(Fucα1-2)Galβ-O-spacer-NHAc (#237_IgG), •Neu5Acα2-8Neu5Acα2-3Galβ1-4Glcβ- (#434_IgG)	0,89	0,89	0,72
2	уПЭ vs ЗРП (после 34 недель)	•(Glcα1-6)3β- (# 241, IgM); •Neu5Acα2-8Neu5Acα2-3Galβ1-4Glcβ- (#434_IgG); •Fucβ1-2Galβ1-4GlcNAcβ- (#273_IgG)	0,83	0,77	0,71
3	НБ vs ХАГ	• <i>Shigella flexneri</i> Yv (#2220_IgM),	0,96	0,94	0,82

№	Дифференциация заболеваний	Гликаны, связывающиеся с АгАТ, составляющими сигнатуру (№ гликана, класс Ig)	AUC	Sp	Se
	(после 34 недель)	• <i>Shigella boydii</i> type 7 (#2010, IgM); • Manβ1-4GlcNAcβ- (#123, IgM);			
4	ГАГ vs ХАГ (после 34 недель)	• <i>Shigella flexneri</i> Yv (#2220_IgM), • Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ- (#403_IgG)	0,91	0,82	0,80
5	НБ vs тПЭ (до 34 недель)	• Galβ1-4GlcNAcα- (#139_IgM), • <i>Shigella flexneri</i> type 3b (#2204_IgG)	0,93	0,88	0,83

Sp – специфичность; Se – чувствительность

АгАТ(IgG)			
Nr	Структура гликана	Норма, >34нед	ГАГ, >34нед
398	Gal β 1-3GlcN(Fm) β 1-3Gal β 1-3GlcNAc β -		
164	GlcA β 1-3GlcNAc β -		
497	Fuca1-2Gal β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β -		
220	Gal α 1-3Gal β 1-4Glc β -		
293	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β -		
22	GlcNAc β -		
176	3-O-Su-Gal β 1-4(6-O-Su)Glc β -		
АгАТ(IgG)			
Nr	Структура гликана	Норма, >34нед	ХАГ, >34нед
277	GalN(Gc) α 1-3(Fuca1-2)Gal β -		
1307	-4(D-GroA1NH2(2-P-3))GalNAc β 1-4Gal β 1-3FucNAc4N β 1-		
2221	-2(Glc α 1-3)Rha α 1-2(EtN1-P-3)Rha α 1-3Rha α 1-3GlcNAc β 1-		
816	Gal β 1-4GalNAc α -		
270	Gal β 1-4Gal β 1-4Glc β -		
77	Gal α 1-3GalNAc β -		
1702	-3(Glc β 1-3GlcNAc4(S-Lac) β 1-2)Rha α 1-2Rha α 1-2Gal6Ac α 1-3GlcNAc β 1-		
269	Gal β 1-3Gal β 1-4Glc β -		
2203	-3GlcNAc β 1-2(Glc α 1-3)Rha α 1-2Rha α 1-3Rha2Ac α 1-		
268	GlcNAc β 1-4(Fuca1-6)GlcNAc β -		
1019	-2Glc α 1-6Glc α 1-4(GlcNAc β 1-3)Gal α 1-3GlcNAc β 1-		
1024	-3(Rha2(%))Ac3(%))Ac4(%))Ac α 1-4GalA α 1-2)Rha α 1-4Glc α 1-2Rha α 1-		
625	(GlcA β 1-3GlcNAc β 1-4) $_{11,12}$ -NH $_2$ -ol		
632	(GlcA β 1-3GlcNAc β 1-4) $_{11,12}$ -NH $_2$ -(p-C $_6$ H $_4$)CH $_2$ CH $_2$ NH $_2$		
801	GalNAc α 1-3GalNAc(fur) β -		
6	GalNAc β -		
1605	-3(Glc α 1-6)GlcNAc β 1-4(GlcNAc β 1-2)GlcA β 1-3(L-Thr2-6)GalA β 1-		
192	GalNAc β 1-4(6-O-Su)GlcNAc β -		
252	-3GlcNAc β 1-2(Glc α 1-3)Rha α 1-2Rha α 1-3(Glc α 1-4)Rha α 1-		
2202	-3GlcNAc β 1-2(Glc α 1-3)Rha α 1-2Rha α 1-3(Glc α 1-4)Rha α 1-		
1618	-6GlcNAc α 1-3Gal β 1-3GalNAc α 1-		
404	GalNAc α 1-3Gal β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc β -		
202	6-O-Su-GalNAc β 1-4(6-O-Su)GlcNAc β -		
501	Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β -		
22	GlcNAc β -		
120	Man α 1-3Man β -		
296	Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4Glc β -		
115	GlcNAc β 1-4GlcNAc β -Asn		
901	biot-CMG2-NH2		
146	Gal β 1-4(6-O-Su)Glc β -		
117	GlcNAc β 1-4GlcNAc β -		
181	3,4-O-Su2-Gal β 1-4GlcNAc β -		
176	3-O-Su-Gal β 1-4(6-O-Su)Glc β -		
232	Gal β 1-4GlcNAc β 1-6GalNAc α -		
1608	-3GlcA β 1-4(Gal α 1-3)FucNAc α 1-3GlcNAc α 1-		
1409	-4ManNAc3NAcA β 1-4L-GalNAc3NAcA α 1-3DFucNAc4N β 1-		
911	N-C5-indazole-3-CONH-PEG-NH2 (AcOH salt)		
175	Neu5Gc β 2-6GalNAc α -		
1609	-4(Lys2-6)GalA α 1-4Gal α 1-3(Ser-(2-6)GalA4Ac α 1-3GlcNAc β 1-		
1411	-4ManNAc3NAcA β 1-4ManNAc3NAcA β 1-3DFucNAc α 1-		
340	Gal α 1-3(Neu5Ac β 2-6)GalNAc β -		
9001	-3Glc β 1-3Glc β 1-3(Glc β 1-6)Glc β 1-		
297	Neu5Ac β 2-6Gal β 1-4Glc β -		
273	Fuc β 1-2Gal β 1-4GlcNAc β -		
403	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -		
371	Fuca1-2Gal β 1-3(Fuca1-4)GlcNAc β -		

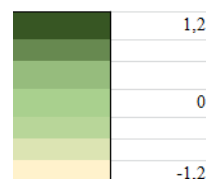
Рисунок 15.

Тепловая карта, демонстрирующая изменения АгАТ при беременности, осложненной ХАГ и ГАГ.

Медиана значения интенсивности флуоресценции, отражающая активность связывания АгАТ с гликанами эррея (отражает аффинность АгАТ и их количество) представлена в виде оттенков зеленого цвета, соответствующих изменению нормализованных значений интенсивности флуоресценции в диапазоне 1,2 - (-1,2).

AgAT(IgM)			
Nr	Структура гликана	Норма, >34нед	ХАГ, >34нед
818	GalNAc α 1-4GalNAc α -		
19	ManNAc β -		
1404	-2Rha α 1-3Rha α 1-4GalNAcA3A α 1-3QuiNAc β 1-		
1018	-6Glc α 1-4(GlcNAc β 1-3)Gal β 1-3GalNAc α 1-3GlcNAc β 1-		
800	GlcNAc α 1-4GlcNAc β -		
2010	-2Gal β 1-3GlcNAc α 1-8(3HOBu1-7)Pse5Ac2-6Gal α 1-6Glc α 1-		
2006	-6(R-Lac2-4)Glc β 1-4GalNAc α 1-3GalNAc β 1-		
2102	-1D-Gro3-P-6Glc β 1-4(Glc α 1-6Gal2(25%)A α 1-3)FucNAc α 1-3GlcNAc β 1-		
2220	-2(EtN1-P-3)Rha α 1-2(EtN1-P-3)Rha α 1-3Rha α 1-3GlcNAc β 1-		
2008	-2Rib β 1-4GalA α 1-3GlcNAc α 1-2(Gal β 1-3)Rha α 1-2Rha α 1-2Rib β 1-		
116	GlcNAc β 1-4GlcNAc β -		
375	Gal α 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -		
506	Ara β 1-2Ara α 1-5(Ara β 1-2Ara α 1-3)Ara α 1-5Ara α -O(CH ₂) ₂ NHCO-		
27	3,6-O-Me2-Glc β -		
123	Man β 1-4GlcNAc β -		
501	Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β -		
191	6-P-Gal β 1-4GlcNAc β -		
184	4,6-O-Su2-Gal β 1-4GlcNAc β -		
183	4,6-O-Su2-Gal β 1-4GlcNAc β -		
632	(GlcA β 1-3GlcNAc β 1-4) ₁₃ -NH(p-C ₆ H ₄)CH ₂ CH ₂ NH ₂		
1615	-4(GalA6(L-Thr)3A α 1-3)GalNAc β 1-3Rha β 1-4GlcNAc6Ac β 1-		

Представлены различия по значимым антителам.



Характеристика профилей AgAT у новорожденных от матерей с нормальной беременностью и беременностью, осложненной пПЭ

Были проанализированы профили AgAT пуповинной крови здоровых новорожденных от матерей с нормальной и осложненной пПЭ беременностью и новорожденных с перинатальной патологией от матерей с пПЭ (совокупно 800 антител). Анализ полученных результатов показал, что в пуповинной крови отсутствуют AgAT(IgM), но выявляется значительное количество AgAT(IgG). Корреляционный анализ продемонстрировал материнское происхождение этих антител у новорожденного, поскольку между уровнями AgAT(IgG) одинаковой специфичности в пуповинной крови и периферической крови матери были выявлены прямые сильные связи ($r_s \approx 0,9$; $p < 0,005$ с учетом поправки на множественность данных).

Поиск межгрупповых различий показал, что у новорожденных с перинатальной патологией от матерей с пПЭ из 400 исследованных AgAT(IgG) выявляется значимо сниженный уровень антител к двум гликанам: альфа аналогу линейного А-антигена системы групп крови человека АВ0 (№ 512) и ксеноантигену (№ 101, антигену группы крови человека системы Форссман) (Рис. 14А) по сравнению со здоровыми новорожденными от матерей с нормальной беременностью. Тенденцию к снижению (пограничный уровень значимости) продемонстрировали AgAT(IgG), которые связывались со схожими гликанами (ксеноантигены - синтетический аналог дисахарида Форссмана (№142), трисахарид Форссмана (№ 278)) и минимальный фрагмент А-антигена (№102), а также с олигосахаридами молока человека (№ 537 и №376) (Рис. 14А).

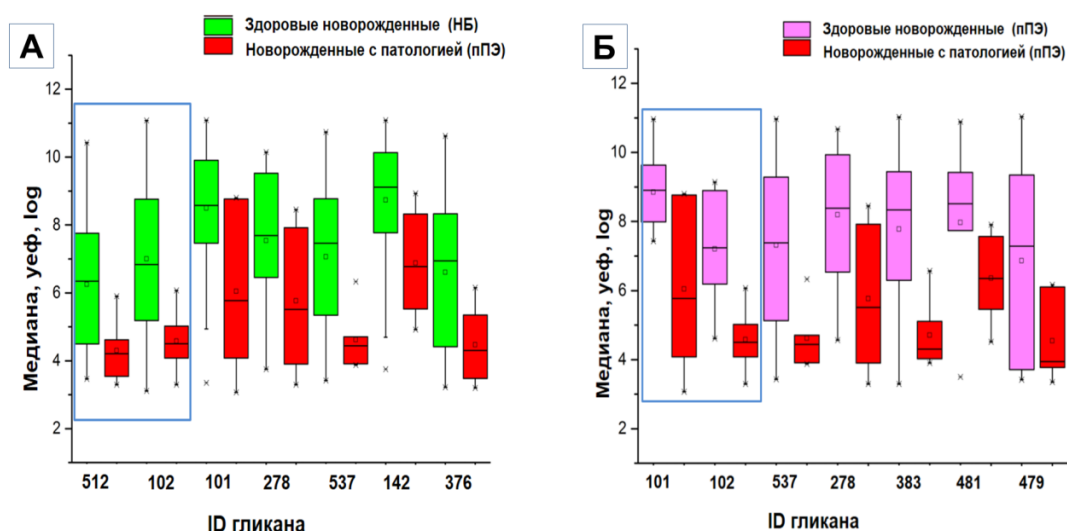


Рисунок 14. Содержание AgAT(IgG) пуповинной крови (А) здоровых младенцев от матерей с физиологической беременностью и младенцев с перинатальными осложнениями от матерей с пПЭ; (Б) здоровых младенцев и младенцев с перинатальными осложнениями от матерей с беременностью, осложненной поздней ПЭ. Значимые антитела отмечены синей рамкой ($p < 0,00017$).

№ 512 GalNAca1-3Galβ1-4GlcNAca1-3Galβ1-4GlcNAcβ-; № 101 GalNAca1-3GalNAcβ-; № 102 GalNAca1-3Galβ-; № 278 GalNAca1-3GalNAcβ1-3Galβ-; № 537 Neu5Aa2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ-; № 142 GlcNAca1-3GalNAcβ-; № 376 Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ-; № 383 Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ-; № 481 Gala1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ-; № 479 Fuca1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ-. Жирным шрифтом отмечены гликаны, которые имеют общие структурные фрагменты с гликанами, связывающими пЛАгАТ(IgG) (Таблица 3, № 5, № 8, № 21.).

Похожий репертуар AgAT(IgG) выявлен при сравнении здоровых младенцев и младенцев с перинатальными осложнениями от матерей с беременностью, осложненной поздней ПЭ (Рис. 14Б). Значимо снижены AgAT(IgG) к дисахариду Форссмана (№101) и минимальному фрагменту А-антигена (№102); пограничный уровень значимости имели антитела к гликанам № 537, 383, 479 (олигосахариды молока, причем последний является также фрагментом антигенов группы крови Н и АВ0 человека) и ксеноантигенам: № 278 (трисахариду Форссмана о котором упоминалось выше) и № 481 (пентасахариду Галили). Последний имеет в своем составе Galα1-3Galβ1-4GlcNAcβ (трисахарид Галили). Примечательно, что AgAT(IgG) к антигену Форссмана были выявлены в межгрупповых различиях при сравнении содержания пЛАгАТ(IgG), выделенных из тканей плаценты здоровых беременных и беременных с пПЭ, где они демонстрировали более низкое содержание в элюатах беременных с ПЭ, а анти-Галили антитела связываются с мишенями в тканях нормальной плаценты и плаценты беременных с ПЭ и ЗРП.

В когорте новорожденных с перинатальной патологией от матерей с ПЭ было выявлено значительное число высокосignимых корреляционных связей ($r_s > 0,9$; $p = 0,005$) между уровнем AgAT(IgG) пуповинной крови и клинико-лабораторными показателями матери: возрастом, значением диастолического давления, содержанием лейкоцитов, лимфоцитов, нейтрофилов, тромбоцитов, Д-димера, глюкозы, АСТ, АЛТ в крови, содержанием белка в моче; сроком родоразрешения; показателями бальной оценки новорожденного по шкале Апгар; содержанием в крови иммуно-гормональных

факторов, регулирующих гликозилирование; уровнем экспрессии мРНК генов регулирующих периферическую толерантность в плаценте. Поскольку поздний репродуктивный возраст является фактором риска рождения ребенка с перинатальными осложнениями, а гипергликемия неблагоприятно влияет на перинатальное развитие плода, то выявленные связи, по-видимому, являются патогенетическими.

Были получены прогностические сигнатуры антител для предикции рождения ребенка с перинатальной патологией (по периферической крови матери) и тяжелого течения раннего неонатального периода (по пуповинной крови) (сигнатуры, их состав и характеристика диагностической ценности представлены в Таблице 6 и на Рис. 15). В составе сигнатур выявляются антитела, которые были идентифицированы в межгрупповых сравнениях (см. Рис. 14 А, Б, выделено жирным шрифтом).

Таблица 6. Состав сигнатуры AgAT для предикции перинатальных исходов и течения раннего неонатального периода

Состав сигнатуры антител по периферической крови матери		Состав сигнатуры антител по пуповинной крови новорожденного	
Класс антител № (ID) гликана	Структура гликана	Класс антител № (ID) гликана	Структура гликана
IgG 167	GlcNAc β 1-4-[HOOC(CH ₃)CH]-3-O-GlcNAc β -sp	IgG 142	GlcNAcα1-3GalNAcβ-sp
IgG 264	Gal β 1-4Gal β 1-4GlcNAc β -sp	IgG 138	Gal β 1-4Glc β -sp-Val
IgG 378	Gal β 1-3GlcNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp	IgG 808	Gal α 1-6Glc β -sp
IgG 80	Gal α 1-3GlcNAc β -sp	IgG 80	Gal α 1-3GlcNAc β -sp
IgM 174	Neu5Gc α 2-6GalNAc α -sp	IgG 817	GalNAc β 1-4GalNAc α -sp
IgM 181	3,4-O-Su2-Gal β 1-4GlcNAc β -sp	IgG 136	Gal β 1-4Glc β -sp-Ile
IgM 245	GlcNAc α 1-6Gal β 1-4GlcNAc β -sp	IgG 256	GlcNAc β 1-6(GlcNAc β 1-4)GalNAc α -sp
IgM 252	GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β -sp	IgG 278	GalNAcα1-3GalNAcβ1-3Galβ-sp
IgM 334	Neu5Gc α 2-3Gal β 1-4(6-O-Su)GlcNAc β -sp		
IgM 89	Gal β 1-3GalNAc α -sp		
IgM 82	Gal α 1-4GlcNAc β -sp		

Примечание: sp* –аминоэтильный, аминопропильный или глицильный спейсер.

Жирным шрифтом отмечены гликаны, антитела к которым выявлены в межгрупповых сравнениях у новорожденных (Рис. 14).

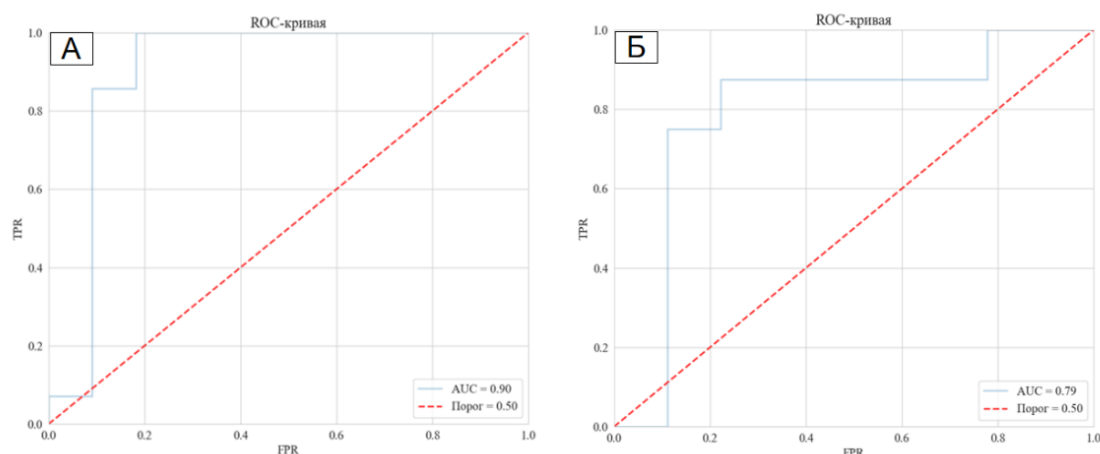


Рисунок 15. ROC-кривая, иллюстрирующая результаты бинарной классификации сигналов с положительными и отрицательными исходами у (А) беременных на сроках беременности > 34 недель, AUC=0,90; (Б) – новорожденных на сроках беременности > 34 недель. AUC=0,79. Зависимая переменная – здоровье новорожденного (1 - здоров, 0 - болен). Положительный исход: ребенок здоров; отрицательный исход: ребенок болен.

Сопоставление специфичности АгАТ, выявленных в периферической крови беременных с ГРБ и пуповинной крови младенцев, со специфичностью галектинов

Было проведено исследование углеводной специфичности семи рекомбинантных галектинов человека: Гал-1,-2,-3,-4,-7,-8,-9 с помощью гликанового эррея. Установлены общие гликаны, связывающиеся и с галектинами и с АгАТ, которые были выявлены как значимые в межгрупповых сравнениях у беременных с уПЭ, а также при сравнении когорт новорожденных. Структуры гликанов приведены в Таблице 7.

Таблица 7. Общие гликаны, связывающиеся с галектинами человека и с АгАТ, выявленными при анализе антител периферической крови матери и пуповинной крови на сроках после 34 недель беременности

Структура гликана, № (ID) гликана	Галектин	Класс АгАТ
Сравниваемые группы: здоровые беременные _vs_ беременные с уПЭ		
Neu5Acα2-8Neu5Acα2-3Galβ1-4Glcβ (#434); Neu5Acα2-3Galβ1-4Glcβ (#293, 3'SL)	Гал-8	IgG
Fuca1-2Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ (497)	Гал-3 Гал-7	IgG
Сравниваемые группы: здоровые новорожденные от матерей с нормальной беременностью _vs_ новорожденные с перинатальной патологией от матерей с ПЭ		
GalNAcα1-3GalNAcβ1-3Galβ-, Fs-3 (#278)	Гал-4 Гал-8 Гал-9	IgG
Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ-, LNT (#376)	Гал-9	IgG

Сравниваемые группы: здоровые новорожденные от матерей с ПЭ vs новорожденные с перинатальной патологией от матерей с ПЭ		
GalNAc α 1-3GalNAc β 1-3Gal β -, Fs-3 (#278)	Гал-4 Гал-8 Гал-9	IgG
Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β -, LNnT (#383)	Гал-3 Гал-4 Гал-8	IgG
Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β - Галили penta (#481)	Гал-3	IgG

Судя по экспериментальным данным, можно полагать что, связываясь с одним и тем же гликаном, АгАТ и галектины способны конкурировать. Примечательно, что все АгАТ, представленные в Таблице 7, относятся к G классу и большинство гликанов-мишеней с которыми связываются АгАТ(IgG), выявленные у новорожденных, были также выявлены среди пЛАгАТ(IgG) (Таблица 3, выделены синим маркером), что указывает на вероятность развития конкурирующих взаимодействий между АгАТ и галектинами не только на системном уровне, но и в плаценте, и на важную роль антигликановых IgG в этих взаимодействиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования демонстрируют, что при БАС, которые связаны с патологией плацентации (ПЭ и ЗРП), развивается гликопатология плаценты, проявляющаяся в формировании измененных гликопаттернов в структурах плацентарного барьера, значимых для взаимного обмена матери и плода. Гликопаттерны включают гликаны, распознающиеся иммунной системой матери и плода как чужеродные (в частности, α Gal-эпитопы, схожие с антигеном Галили), что вызывает активацию клеточных и гуморальных механизмов иммунной системы. Патологическая гиперэкспрессия фукозилированных гликанов в эндотелии терминальных ворсин плаценты, которые участвуют в ангиогенезе, также является одним из аспектов проявления гликопатологии плаценты, поскольку является отражением компенсаторного ангиогенеза в ответ на плацентарную ишемию.

Гликопатология плаценты включает не только нарушения экспрессии гликанов в ее тканях, но также изменения экспрессии и продукции факторов, регулирующих периферическую толерантность: *PIBF* (экспрессия которого регулируется прогестероном – одним из факторов, контролирующим гликозилирование) и резидентных АгАТ (которые находятся в связанном состоянии с гликанами плаценты). ПЛАгАТ(IgG) при ПЭ имеют особенности специфичности, что определяется наличием гликопаттернов, которые относят к DAMPs и неоантигенам, образованным вследствие клеточной реакции на стресс из-за патологических процессов в тканях плаценты.

Содержание пАгАТ(IgG) при ПЭ снижено (в частности, анти-Neu5Ac β антител), что указывает на потерю контроля за активационным статусом эндотелия в плаценте. В изотипическом составе АгАТ(IgG), который были выделены из ткани плацент беременных с ПЭ, отмечается снижение IgG₁, но напротив, повышение IgG₂, IgG₃ и IgG₄, по сравнению с антителами, выделенными из ткани нормальных плацент. Повышенное содержание АгАТ(IgG₂), который в норме не проникает через плацентарный барьер и IgG₃, который является самым сильным активатором комплемента из всех подклассов IgG, в совокупности со снижением антител с регуляторной активностью в ткани плаценты при ПЭ указывает на нарушение механизмов иммунологической толерантности к аллоантигенам плода при ПЭ.

Гликопатология плаценты и связанные с ней нарушения периферической толерантности к плоду обуславливают особенности иммунного реагирования матери и плода при беременности, осложненной ПЭ. Активационный стимул плаценты, несущей гликопаттерны – “образы опасности” вызывает изменения центральной толерантности при ПЭ. У матери значительно изменено В-клеточное звено иммунной системы: повышено содержание В-клеток, свидетельствующих об активном иммунном ответе, но истощено звено В-клеток памяти. Также, нарушения касаются системного изменения гуморальных факторов: снижения прогестерона крови (одного из ключевых факторов, регулирующего гликозилирование белков), повышения IL-6 (цитокина, регулирующего продукцию протективных антител с блокирующими свойствами) и дисбалансу в содержании АгАТ(IgM) и АгАТ(IgG) крови. Плод, формирование иммунной системы которого происходит в условиях контакта с активирующими гликопаттернами плаценты, отвечает преимущественным развитием активированного фенотипа Т-клеток, компенсаторным развитием Т(рег)-клеток и повышением IL-6 крови. Акцепция гуморальных факторов (АгАТ(IgG)) матери посредством трансплацентарного переноса, по-видимому, включает не только передачу протективных антител, но и болезнь-ассоциированных, поскольку ряд антител связаны с патогенетическими факторами развития ПЭ, что доказано корреляционным анализом и ассоциировано с перинатальной патологией новорожденного. Ряд антител установленной специфичности, выявляемые у матери и у новорожденного, может вступать в конкурирующие взаимодействия с ключевыми регуляторами иммунных реакций – галектинами. Т.о., резюмируя представленные в диссертационном исследовании результаты, можно заключить, что гликопатология установлена не только в плаценте. Гликопатология, проявляющаяся в нарушении факторов, контролирующих гликозилирование, продукцию протективных антител и разнонаправленном изменении содержания АгАТ, обусловлена влиянием плаценты, и развивается и в иммунной системе матери, и у новорожденного. Патогенетические механизмы развития гликопатологии в системе мать-плацента-плод представлены на Рис. 16.

Следует отметить, что представленное исследование носит системный характер. Оно включает несколько элементов (мать-плацента-плод) и подходов (исследование

механизмов центральной и периферической толерантности к плоду при развитии гликопатологии во взаимосвязанной системе мать-плацента-плод), объединенных общей идеей и фактически одним "объектом" исследования - патологией плаценты. Широкий охват проблемы позволил описать основные закономерности изменения ткани плаценты, клеточных и гуморальных иммунных факторов у матери и у новорожденного и обосновать новую концепцию развития гликопатологии в системе мать-плацента-плод как одного из патофизиологических механизмов нарушений в иммунной системе при патологии беременности. В рамках системного подхода охарактеризованы основные тенденции изменения экспрессии гликанов плаценты, плацента-ассоциированных АгАТ и АгАТ крови. При этом подробное исследование (поиск мишеней в тканях плаценты и исследование функциональной активности для описанных в данной работе АгАТ) было выполнено выборочно для отдельных антител (в частности для трех антител из всех, идентифицированных в работе), как пример, иллюстрирующий новый, перспективный подход для поиска активных молекул, которые имеют значение не только для патофизиологии болезни, но и потенциальное терапевтическое и диагностическое значение.

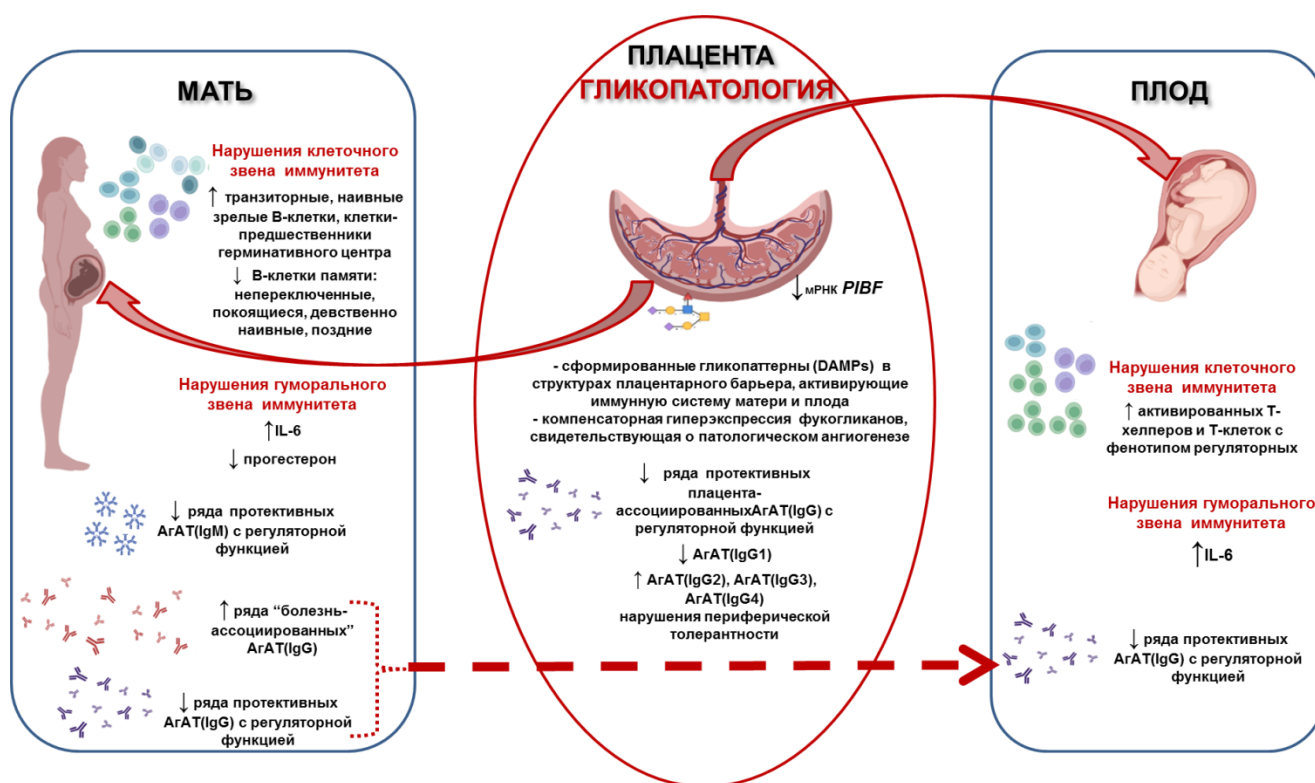


Рисунок 16. Патогенетические изменения иммуно-гормональных факторов в системе мать-плацента-плод, развивающиеся вследствие формирования гликопатологии плаценты.

Системный подход продемонстрирован и при поиске диагностических и прогностических сигнатур АгАт, объединяющих иммуноглобулины двух классов, что

повышает показатели диагностической ценности теста. Системный подход подразумевает изучение трех сложных систем (мать-плацента-плод) как единого целого и обозначает направления дальнейших исследований, которыми для данной работы будут: поиск биологических мишеней антител в организме беременной, изучение их функциональной активности и сигнальных путей в клетке.

ВЫВОДЫ

1. Продемонстрированы значимые изменения экспрессии терминальных и субтерминальных фрагментов гликанов в структурах плацентарного барьера и отличная от нормы гистотопография гликоблефов синцитиотрофобласта терминальных ворсин плаценты при ПЭ и ЗРП. Доказано наличие в плаценте беременных с ПЭ и ЗРП Gal α -эпитопов, структурно близких к антигену Галили, в отличие от ткани нормальной плаценты, где Галили-подобные эпитопы отсутствуют. Полученные данные свидетельствуют о формировании специфических “гликопаттернов опасности” в структурах плацентарного барьера, которые имеют патофизиологическое значение и обуславливают реакции хронического отторжения плода при ПЭ и ЗРП;
2. Установлено, что при ПЭ, по сравнению с нормальной беременностью, в периферической крови матери в 3 раза повышено содержание IL-6, в 1,3 раза снижено содержание прогестерона; в ткани плаценты в 1,4 раза снижена экспрессия прогестерон-индуцированного блокирующего фактора, и более, чем в 6 раз снижен уровень антигликановых IgG, которые находятся в связанном состоянии с антигенами плаценты, т.е. резидентных антител. Эти изменения являются свидетельством нарушенного баланса факторов, регулирующих центральную и периферическую толерантность при беременности, осложненной развитием ПЭ;
3. Изучена эпитопная специфичность AgAT(IgG), аффинно выделенных из периферической крови (три антитела) и элюатов плаценты (только анти-Галили антител). Установлено, что антиген-связывающий паттерн плацента-ассоциированных AgAT(IgG) значительно уже, чем IgG аналогичной специфичности в крови. Анти-Neu5Ac β антитела крови связываются только с гликанами, которые содержат нейраминовую кислоту в бета-конфигурации, тогда как анти-Галили и анти-Tn антитела полиспецифичны - связываются не только с антигенами Галили и GalNAc α -терминированными гликанами, соответственно, но и с неродственными гликанами, что характерно для естественных антител;
4. Эпитопная специфичность анти-Галили антител, аффинно выделенных из элюатов плаценты здоровых беременных и беременных с ПЭ различается: при ПЭ профиль их специфичности более широкий, чем в норме, антитела связывают не только антигены Галили и другие Gal α -терминированные гликаны, но и структуры, не содержащие терминации Gal α . Мишенями анти-Галили антител в нормальной и патологической ткани плаценты являются разные гликоблефы;
5. В аффинно выделенных анти-Галили антителах из элюатов плаценты пациенток с нормальной и осложненной ПЭ беременностью обнаружено преобладание IgG₁ над

другими подклассами, что отличает их от аналогично выделенных антител из крови, где преобладающим являлся IgG₂. В аффинно выделенных анти-Галили антителах из элюата пациенток с ПЭ установлено более низкое содержание IgG₁ и более высокое содержание IgG₂, IgG₃ и IgG₄, чем в элюатах плаценты здоровых пациенток, что предполагает их патогенетическое значение и участие антигликановых IgG₁ в иммунологической толерантности к плоду;

6. Установлен дозозависимый регуляторный эффект анти-Neu5Ac β антител на плотность экспрессии маркеров CD54, CD106 и CD 62L клетками линии EAhy.926, которые активировались TNF α , что указывает на их участие в контроле воспалительной реакции и эндотелиальной активации, поскольку при ПЭ выявляется низкое содержание этих антител в элюатах, по сравнению с элюатами из нормальной плаценты;
7. В периферической крови беременных с поздней ПЭ выявлено высокое содержание В-клеток наивных фенотипов, но снижено число В-клеток памяти, что указывает на активационный статус иммунной системы матери при поздней ПЭ и развивающееся вследствие этого селективное истощение В-клеток памяти основных фенотипов. В пуповинной крови новорожденных, рожденных от матерей с поздней ПЭ, установлено повышенное содержание активированных Т-хелперов, Т-хелперов с фенотипом регуляторных и развита субпопуляция наивных зрелых В-лимфоцитов, что демонстрирует особенности клеточного иммунитета у младенцев от матерей с ПЭ, проявляющиеся в преимущественном развитии Th2-клеточных реакций, выраженной готовности к праймированию антигеном и развитию гуморального иммунного ответа, что обусловлено провоспалительной средой, в которой развивался младенец;
8. Плацента-ассоциированные осложнения (ПЭ и ЗРП) характеризуются системным снижением уровня АгАТ классов М и G в периферической крови матери. При гипертензивных расстройствах во время беременности (ХАГ и ГАГ) продемонстрированы разнонаправленные изменения их содержания. Репертуары АГАТ специфичны, т.е. представляют собой антитела, характерные только для конкретной нозологии, что свидетельствует об их потенциальной диагностической и прогностической значимости для клинической практики и о различных патогенетических механизмах развития гликопатологии у беременных с ГРБ и ЗРП;
9. Установлено, что в репертуаре АгАТ пуповинной крови отсутствуют АгАТ(IgM), но выявляется значительное количество АгАТ(IgG) матери, уровень которых снижен при развитии перинатальной патологии у новорожденных. Снижение уровней антител имеет патогенетическое значение, поскольку связано с изменением материнских, плацентарных и неонатальных показателей;
10. Определены диагностические и прогностические сигнатуры АгАТ, которые позволяют предсказывать развитие перинатальной патологии у младенцев, рожденных от матерей с ПЭ (периферическая кровь матери, AUC=0,90; Se=1,0; Sp=0,83) и тяжелое течение раннего неонатального периода (пуповинная кровь, AUC=0,83; Se=0,88; Sp=0,88). Также, определены диагностические сигнатуры, специфичные для каждой нозологии из группы ГРБ. Применение диагностических сигнатур АгАТ позволяет провести дифференциацию ПЭ с другими

гипертензивными расстройствами, что важно для этапа постановки и уточнения диагноза;

11. Установлены лиганды, общие для галектинов и для АгАТ, что позволяет предположить патогенетическое значение эффекта конкурирующих взаимодействий между этими гликан-связывающими белками в иммунных реакциях у беременных с ПЭ и их новорожденных.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Определение антигликановых антител периферической крови в медицинских организациях 3-го уровня рекомендовано беременным на поздних сроках беременности (после 34 недели беременности), у которых имеется подозрение на развитие заболевания, или установлен диагноз из группы гипертензивных расстройств во время беременности (зафиксировано систолическое АД выше или равно 140 мм рт ст, и/или диастолическое 90 мм рт. ст.), а также имеющим ХАГ в анамнезе с целью дифференциальной диагностики заболеваний из группы ГРБ для своевременного квалифицированного оказания медицинской помощи.
2. Определение антигликановых антител периферической крови в медицинских организациях 3-го уровня рекомендовано беременным с установленным диагнозом преэклампсия на поздних сроках беременности (после 34 недели беременности) с целью уточнения степени тяжести преэклампсии для своевременного квалифицированного оказания медицинской помощи и снижения риска акушерских и перинатальных осложнений.
3. Определение антигликановых антител периферической крови в медицинских организациях 3-го уровня рекомендовано беременным на поздних сроках беременности (после 34 недели беременности), для прогнозирования неблагоприятных перинатальных исходов.
4. Определение антигликановых антител пуповинной крови рекомендовано проводить в медицинских организациях 3-го уровня, для предикции течения раннего неонатального периода у новорожденного.

Список научных трудов по теме диссертации

Статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России

1. **Зиганшина М.М.**, и др. Аутоантитела к антигенам эндотелия при преэклампсии // Акушерство и гинекология.-2016.-№3.-С.24-31.
2. Sukhikh G.T., **Ziganshina M.M.**, Nizyaeva N.V., Kulikova G.V., Volkova J.S., Yarotskaya E.L., Kan N.E., Shchyogolev A.I., Tyutyunnik V.L. Differences of glycocalyx composition in the structural elements of placenta in preeclampsia // Placenta. – 2016. – V. 43. – P.69-76.
3. **Зиганшина М. М.**, Павлович С. В., Бовин Н. В., Сухих Г. Т. Гиалуроновая кислота в сосудистом и иммунном гомеостазе при физиологической беременности и преэклампсии // Acta Naturae. 2016. Т.8.-№ 3. – С.66-79.

4. **Зиганшина М.М.**, Сергунина О.А., Николаева М.А., Сухих Г.Т. Антиэндотелиальные антитела – вершина айсберга: что находится внизу? // Успехи современной биологии. 2017.-№ 137.-с.288-299.
5. **Зиганшина М.М.**, и др. Гликом эндометрия в менструальном цикле и рецептивность эндометрия // Акушерство и гинекология. 2017. № 12. С. 17-24.
6. **Ziganshina M.M.**, et al. Autoantibodies to endothelial cells in patients with hypertensive disorders during pregnancy // Pregnancy Hypertension. - 2018. - V.12. -P.65-70.
7. Игнатьева Н.В., **Зиганшина М.М.**, Шилова Н.В., Хасбиуллина Н.Р., Бовин Н.В., Тютюнник В.Л., Сухих Г.Т. Выделение иммуноглобулинов класса G, ассоциированных с тканью плаценты человека // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2019. - Т. 167. № 1. - С. 129-132.
8. **Зиганшина М.М.**, и др. Гликопатология в системе мать-плацента-плод при развитии больших акушерских синдромов, связанных с дефектами плацентации. Российский иммунологический журнал // - 2019. - Т. 13 (22). № 2. - С. 267-269.
9. Шилова Н.В., Хасбиуллина Н.Р., Нокель А.Ю., **Зиганшина М.М.**, Бовин Н.В. Гликоэреи в изучении гликан-белкового взаимодействия // Российский иммунологический журнал. - 2019. - Т. 13 (22). № 2. -С. 987-990.
10. Нагоев Т.М., Муминова К.Т., Ходжаева З.С., Холин А.М., **Зиганшина М.М.**, Козлова А.А., Мартиросян Я.О. Материнская гемодинамика и преэклампсия // Акушерство и гинекология. - 2020. № 1. - С. 5-11.
11. **Ziganshina M.M.**, et al. Expression of fucosylated glycans in endothelial glycocalyxes of placental villi at early and late fetal growth restriction // Placenta. - 2020. - Т. 90. - С. 98-102.
12. **Ziganshina, M.M.**, Yarotskaya, E.L., Bovin, N.V., Pavlovich, S.V., Sukhikh, G.T. Can endothelial glycocalyx be a major morphological substrate in pre-eclampsia? // International Journal of Molecular Sciences. - 2020. - 21(9). - P. 3048.
13. Шилова Н.В., Рыжов И.М., **Зиганшина М.М.**, Ракитко А.С., Хуфлейт М.Е., Бовин Н.В. Отрицательная корреляция между естественными антителами человека, направленными к гликотопам Galβ1-3GlcNAc и Galβ1-4GlcNAc // Биоорганическая химия. - 2020. - Т. 46. № 6. - С. 746-752.
14. Обухова П.С., Качанов А.В., Позднякова Н.А., **Зиганшина М.М.** Межгрупповой АВ0-конфликт матери и плода: роль анти-гликановых антител в развитии гемолитической болезни новорожденных // Медицинская иммунология. -2021. - Т.23. №1. - С.7-24.
15. **Зиганшина М.М.**, Хайдуков С.В. Визуализация В10-регуляторных клеток в периферической крови при физиологической беременности // Российский иммунологический журнал. - 2021. - Т.24. №2. - С.269-274.
16. **Зиганшина М.М.**, и др. Взаимосвязь между уровнем антигликановых антител крови и клинико-лабораторными параметрами пациенток с нормальной и осложненной умеренной преэклампсией беременностью // Российский иммунологический журнал. - 2021. - Т.24. №3. - С.435-444.
17. Шилова Н.В., Бовин Н.В., Нокель А.Ю., **Зиганшина М.М.**, Хасбиуллина Н.Р., Вускович М., Хуфлейт М.Э. Гликоэреи в диагностике и терапии заболеваний органов женской репродуктивной системы // Российский иммунологический журнал. - 2021. - Т.24. №3. - С.419-425.
18. **Ziganshina M.M.**, et al. Epithelial apical glycosylation changes associated with thin endometrium in women with infertility - a pilot observational study // Reproductive Biology and Endocrinology. - 2021. - Т. 19. № 1. - С. 73.
19. Куликова Г.В., **Зиганшина М.М.**, Щеголев А.И., Сухих Г.Т. Сравнительная оценка экспрессии фукозилированных гликанов и морфометрических параметров терминальных ворсин плаценты в зависимости от степени тяжести преэклампсии // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2021. - Т. 172. № 7. - С. 108-114.
20. **Зиганшина М.М.**, Павлович С.В. Новые подходы к профилактике и лечению артериальной гипертензии с позиции фармакологической коррекции эндотелиального

- гликокаликса: экспериментальные и клинические данные // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2021. - Т. 84. № 7. - С. 26-36.
21. **Ziganshina M.M.**, et al. Repertoire of glycan-binding placenta-associated antibodies in healthy pregnancy and in pre-eclampsia // Scandinavian Journal of Immunology. -2022. -Т. 95. № 6. - С. e13157.
 22. **Зиганшина М.М.**, и др. Сравнительная характеристика нарушений экспрессии сиалогликанов в структурах плацентарного барьера при преэклампсии и задержке роста плода. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины // - 2022. - Т. 173. № 2. - С. 252-257.
 23. Обухова П.С., **Зиганшина М.М.**, Шилова Н.В., Чинарев А.А., Пазынина Г.В., Нокель А.Ю., Терентьева А.В., Хасбиуллина Н.Р., Сухих Г.Т., Рагимов А.А., Салимов Э.Л., Бутвиловская В.И., Полякова С.М., Саха Д., Бовин Н.В. Антитела против необычных форм сиалированных гликанов // Acta Naturae. - 2022. - Т. 14. № 2. - С. 85-92.
 24. **Зиганшина М.М.**, Зиганшин А.Р., Халтурина Е.О., Баранов И.И. Артериальная гипертензия как следствие дисфункции эндотелиального гликокаликса: современный взгляд на проблему сердечно-сосудистых заболеваний // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. - 2022. - Т. 21. № 9. - С. 91-103.
 25. **Ziganshina, M.M.**, Muminova, K.T.; Khasbiullina, N.R.; Khodzhaeva, Z.S.; Yarotskaya, E.L.; Sukhikh, G.T. Characterization of Vascular Patterns Associated with Endothelial Glycocalyx Damage in Early- and Late-Onset Preeclampsia // Biomedicines. – 2022. Vol. 10. – P. 2790.
 26. Muminova K., Khodzhaeva Z., Yarotskaya E., **Ziganshina M.** Analysis of factors associated with sterile inflammation in women with preeclampsia receiving different antihypertensive treatment strategies // Medical Immunology (Rus). - 2023, Vol.25. P. 1183-1190.
 27. **Marina M. Ziganshina**, et al. Features and comparative characteristics of fucosylated glycans expression in endothelial glycocalyx of placental terminal villi in patients with preeclampsia treated with different antihypertensive regimens // International Journal of Molecular Sciences. - 2023. - Vol. 24. Vo 21. - P. 15611.

Монографии:

1. **Ziganshina M.M.**, Shilova N.V., Khasbiullina N.R., Navakouski M.E., Nikolaeva M.A., Kan N.E., Vavina O.V., Nikolaeva A.V., Tyutyunnik V.L., Tyutyunnik N.V., Bot I., Sukhikh G.T., Bovin N.V. Antibodies to hyaluronic acid in preeclampsia. In G. Wiederschain [ed.]. Glycobiology and Human Diseases. CRC Press, New York, USA. 2016. P. 313-322.
2. **Marina M. Ziganshina**, Ekaterina L. Yarotskaya, Nicolai V. Bovin and Gennady T. Sukhikh. Endothelial Dysfunction as a Consequence of Endothelial Glycocalyx Damage: A Role in the Pathogenesis of Preeclampsia. In Helena Lenasi [ed.], Endothelial Dysfunction, IntechOpen, 2018. P. 113-146.

Публикации в материалах научных мероприятий по теме диссертационного исследования:

1. **Зиганшина М.М.** и др. Иммунный ответ на углеводные антигены при беременности: иммуносупрессия или иммунорегуляция? // В сборнике: Материалы III Всероссийской конференции “фундаментальная гликобиология”, Владивосток, сентябрь 2016.-С.48.
2. **Зиганшина М.М.** и др. Роль гликанов в формировании иммунологической толерантности к плоду при преэклампсии // В сборнике: Материалы III всероссийской конференции “фундаментальная гликобиология”, Владивосток, сентябрь 2016.-С.47.
3. **Зиганшина М.М.** и др. Роль гликанов и анти-гликановых антител в формировании толерантности к плоду: новые данные о патогенезе преэклампсии // В книге: Мать и дитя. Материалы XVII Всероссийского научно-образовательного форума. 2016. С. 35-36.

4. **Зиганшина М.М.** и др. Клиническое значение анти-эндотелиальных антител при гипертензивных расстройствах во время беременности // В книге: Мать и дитя. Материалы XVII Всероссийского научно-образовательного форума. 2016. С. 33-35.
5. **Зиганшина М.М.** и др. Антиэндотелиальные антитела: клинико-патогенетическое значение и перспективы использования в диагностике гипертензивных расстройств во время беременности // Научно-практическая ревматология. Тезисы докладов конференции «Аутоиммунные и иммунодефицитные заболевания». 2016. Т.54. С.24-25.
6. **Ziganshina M.M.**, et al. Immune Response to Glycan Antigens in Pregnancy: Immunosuppression or Immunoregulation? // Achievements in the Life Sciences. 2016.10. S61.
7. **Зиганшина М.М.** и др. Репертуары анти-гликановых антител при физиологической и осложненной беременности // Российский аллергологический журнал. 2017. №1. С.49-51.
8. **Зиганшина М.М.**, Бовин Н.В., Щеголев А.И., Сухих Г.Т. Гликоиммунология толерантности в системе мать-плацента-плод: патогенез преэклампсии с позиции гипотезы фето-эмбриональной защиты // Журнал акушерства и женских болезней. Тезисы докладов IV Национального конгресса «Дискуссионные вопросы современного акушерства» 15–17 июня 2017 года. СПб. Том LXVI. 2017. С.26-27.
9. **Зиганшина М.М.** и др. Поиск биомаркеров больших акушерских синдромов на основе использования высокопроизводительного микрочипа // В книге: Мать и дитя Материалы XVIII Всероссийского научно-образовательного форума. 2017. С. 24-25.
10. **Зиганшина М.М.** и др. Диагностическая ценность определения аутоантител при задержке роста плода // Научно-практическая ревматология. Тезисы докладов II междисциплинарной конференции «Аутоиммунные и иммунодефицитные заболевания» 2017. №5. С.14.
11. **Зиганшина М.М.** и др. Спектр и диагностическое значение антигликановых антител, выявляемых при развитии больших акушерских синдромов, связанных с дефектами плацтации // Российский аллергологический журнал. 2018. Т. 15. №1. С. 37-39. Материалы Всероссийской конференции «Клиническая иммунология и аллергология – практическому здравоохранению» 27-28 февраля 2018, Москва.
12. Shchegolev A., Kulikova G., **Ziganshina M.** et al. Change in endothelial glycocalyx of placental terminal villi in the early- and late-onset foetal growth restriction // Virchows Archiv-European Journal of Pathology. 2018. Т. 473. № S1. С. S135-S136.
13. Игнатъева Н.В., **Зиганшина М.М.**, Шилова Н.В. и др. Выделение и первичная характеристика специфичности антигликановых плацента-ассоциированных IgG человека // Фундаментальная гликобиология. Сборник материалов IV Всероссийской конференции. 2018. С. 133-134.
14. **Зиганшина М.М.** и др. Гликофенотип плаценты при ранней и поздней манифестации внутриутробной задержки роста плода // В книге: Мать и дитя Материалы XIX Всероссийского научно-образовательного форума. 2018. С. 16.
15. **Зиганшина М.М.** и др. Спектр аутоантител к гликанам при ранней и поздней преэклампсии // Научно-практическая ревматология. Тезисы докладов III всероссийского конгресса «Аутоиммунные и иммунодефицитные заболевания» 2018. 56 №3. С.18.
16. **Зиганшина М.М.** и др. Патогенетическое значение изменения углеводного фенотипа плаценты при задержке развития плода // Российский аллергологический журнал. 2019. Т.16. №1(2). С.62-65. Материалы Национальной конференции «Клиническая иммунология и аллергология – междисциплинарные проблемы» 28 февраля-1 марта 2019, Москва.
17. **Зиганшина М.М.** и др. Перспективы использования гликочипа для поиска биомаркеров больших акушерских синдромов // Акушерство и гинекология. Тезисы I национального конгресса с международным участием ЛАБРИН Россия, Москва 22—23 апреля. 2019. №4. С.26.
18. Шилова Н.В., Хасбиуллина Н.Р., **Зиганшина М.М.**, Нокель А.Ю., Бовин Н.В. Новая платформенная технология гликочип для диагностики широкого круга заболеваний в акушерстве, гинекологии и перинатологии // Акушерство и гинекология. Тезисы I

национального конгресса с международным участием ЛАБРИН Россия, Москва 22—23 апреля 2019. №4. С.98-99.

19. Kulikova G.V., **Ziganshina M.M.**, Shchegolev A.I. et al. Features the glycome of syncytiotrophoblast in the placental terminal villi during early-onset and late-onset fetal growth restriction // *Virchows Archiv-European Journal of Pathology*. 2019. V. 475. No. S1. S. S166.
20. Asaturova A.V., Abdurakhamova N., Kulikova G.V., **Ziganshina M.M.**, Faizullina N.M., Shchegolev A.I., Sukhikh G.T. Glycan expression in endometrium of infertile patients // *Virchows Archiv-European Journal of Pathology*. 2019. V. 475. No. S1. С. S81.
21. **Зиганшина М.М.** и др. Плацента-ассоциированные анти-GAL α -антитела при нормальной беременности и преэклампсии // В книге: Мать и дитя Материалы XX Всероссийского научно-образовательного форума. 2019. С. 25.
22. **Зиганшина М.М.** и др. “образы опасности” в структурах плацентарного барьера при задержке роса плода // В книге: Мать и дитя Материалы XX Всероссийского научно-образовательного форума. 2019. С. 24.
23. **Зиганшина М.М.** и др. Исследование репертуара плацента-ассоциированных антигликановых антител как основа для разработки иммуноглобулинового препарата для профилактики и лечения преэклампсии // *Акушерство и гинекология: новости, мнения, обучение*. 2020. Т.8., №1. С. 85-86.
24. **Зиганшина М.М.** и др. Измененный репертуар плацента-ассоциированных антигликановых антител как отражение развития гликопатологии при преэклампсии // Типовые патологические процессы: современные тренды в науке. Сборник трудов, посвященный 130-летию кафедры патофизиологии Сибирского Государственного медицинского университета. Томск, 2020, С. 53-54.
25. **Зиганшина М.М.** и др. Изменения в паттерне плацента-ассоциированных антигликановых антител при преэклампсии // В книге: Мать и дитя. Материалы XXI Всероссийского научно-образовательного форума. 2020. С. 15.
26. **Зиганшина М.М.** и др. Особенности экспрессии фукозилированных гликанов в плаценте при умеренной и тяжелой преэклампсии // В книге: Мать и дитя. Материалы XXI Всероссийского научно-образовательного форума. 2020. С. 16.
27. **Зиганшина М.М.**, Куликова Г.В., Щеголев А.И. Особенности гликома плаценты при преэклампсии // *Акушерство и гинекология. Мать и дитя. Материалы XXII Всероссийского научно-образовательного форума*. 2021. №3. С. 8.
28. **Зиганшина М.М.** и др. Сравнительная оценка экспрессии генов иммунорегуляторных факторов в ткани плаценты при преэклампсии и задержке роста плода // *Акушерство и гинекология. Мать и дитя. Материалы XXII Всероссийского научно-образовательного форума*. 2021. №3. С. 9.
29. **Зиганшина М.М.** и др. Сравнительная характеристика экспрессии сиалогликанов в плаценте при преэклампсии и задержке роста плода // *Акушерство и гинекология. Мать и дитя. Материалы XXII Всероссийского научно-образовательного форума*. 2021. С. 17-18.
30. **Зиганшина М.М.** и др. Протеогликаны эндотелиального гликокаликса в периферической крови при ранней и поздней преэклампсии // *Акушерство и гинекология. Мать и дитя. Материалы XXI Всероссийского научно-образовательного форума*. 2021. С. 18-19.
31. Терентьева А.В., Шилова Н.В., Хасбиуллина Н.Р., Нокель А.Ю., Бовин Н.В., **Зиганшина М.М.** Репертуар антигликановых антител при нормальной и осложненной беременности // Сборник тезисов V Всероссийской конференции «Фундаментальная гликобиология» 21-24 сентября 2021 г. Гатчина. С.61.
32. Muminova K., Khodzhaeva Z., **Ziganshina M.** et al. Endothelial glycocalyx dysfunction in early- and late-onset preeclampsia // *Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health*. 2023. V.33. e 50.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АгАТ – антигликановые антитела
БАС – большие акушерские синдромы
ГАГ – гестационная артериальная гипертензия
ГРБ – гипертензивные расстройства во время беременности
ЗРП – задержка развития плода
МАт – моноклональные антитела
ОТ-ПЦР – метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией
плАгАТ – плацента-ассоциированные антигликановые антитела
пПЭ – поздняя преэклампсия
ПЭ – преэклампсия
пЗРП – поздняя ЗРП
рЗРП – ранняя ЗРП
рПЭ – ранняя преэклампсия
СИФ - средняя интенсивность флуоресценции
ТМА – тканевая матрица
ХАГ – хроническая артериальная гипертензия
Vm – зрелые В-клетки
DAMPs –молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждениями
IBA – индекс активности связывания (от англ. index of binding activity)
IgG-препарат (концентрированный раствор очищенной фракции иммуноглобулинов G человека “Иммуноглобулин человека нормальный”, ФГУП “НПО “Микроген”, Россия)
НКТ – естественные Т- киллеры
PAMPs – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны
PIBF – прогестерон-индуцированный блокирующий фактор
WMW - тест Вилкоксона-Манна-Уитни