

Министерство здравоохранения Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и
перинатологии имени академика В.И. Кулакова»

На правах рукописи

ЗИГАНШИНА
Марина Михайловна

ИММУНОПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ КОНЦЕПЦИЯ РАЗВИТИЯ ГЛИКОПАТОЛОГИИ В
СИСТЕМЕ МАТЬ-ПЛАЦЕНТА-ПЛОД

3.3.3 Патологическая физиология

3.2.7 Иммунология

Диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научные консультанты:
академик РАН, доктор медицинских наук, профессор Сухих Г.Т.
доктор химических наук, профессор Бовин Н.В.

Москва 2024

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	6
Актуальность исследования	6
Степень разработанности темы исследования.....	8
Задачи исследования:.....	9
Научная новизна исследования	10
Теоретическая и практическая значимость исследования	11
Методология и методы исследования.....	13
Положения, выносимые на защиту:	14
Степень достоверности и апробация результатов диссертационного исследования.....	15
Личный вклад автора в получение результатов.....	17
Внедрение результатов исследования в практику	17
Соответствие диссертации паспорту научной специальности.....	18
Объем и структура диссертации.....	18
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. Формирование иммунологической толерантности к аллоантигенам плода: основные иммунологические механизмы, основанные на углевод-белковом взаимодействии, поддерживающие гомеостаз при беременности.....	19
1.1.–Основные клеточные и гуморальные механизмы, обеспечивающие толерантность к аллоантигенам.....	19
1.1.1. Иммуные механизмы, обеспечивающие развитие периферической толерантности при беременности.....	20
1.1.2. Иммуные механизмы, обеспечивающие развитие центральной толерантности при беременности.....	25
1.2. Углевод-опосредованные иммунные механизмы, регулирующие развитие толерантности к аллоантигенам	36
1.2.1. Гликокод плаценты в норме и при патологии, его значение для морфогенеза и развития периферической толерантности	37
1.2.2. Роль гликан-опосредованных межклеточных контактов в процессах морфогенеза плаценты	39
1.2.3. Особенности гликотипа плаценты в норме и при патологии беременности	50
1.2.4. Центральная и периферическая толерантность при беременности: обоснование с позиции гипотезы фето-эмбриональной защиты (FEDS)	54
1.2.5. Общая характеристика основных семейств эндогенных лектинов организма	55
1.2.6. Регуляторные взаимодействия функциональных углеводных групп гликоконъюгатов с рецепторным аппаратом иммунных клеток на локальном и системном уровнях	59

1.2.7. Антигликановые антитела - регуляторные молекулы иммунной системы.....	73
1.3. Гликопатология	82
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	87
2.1. Организация работы, объем и дизайн исследования	90
2.2. Стандартные методы исследования (Общеклинические, клинико-лабораторные и инструментальные методы).....	94
2.3. Специальные методы исследования.....	96
2.3.1. Морфогистохимические методы.....	96
2.3.2. Молекулярно-генетические методы.....	104
2.3.3. Биохимические методы	105
2.3.4. Иммунологические методы.....	109
2.3.5. Статистические методы.....	122
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	125
3.1. Макро- и микроскопическое исследование ткани плаценты	125
3.2. Иммуно- и гистохимическое исследование ткани плаценты	125
3.2.1. Особенности гликанового профиля плаценты при ЗРП	126
3.2.2. Исследование фукозилированных гликанов при ЗРП	136
3.2.3. Особенности гликанового профиля плаценты при ПЭ.....	139
3.2.4. Исследование фукозилированных гликанов при ПЭ	148
3.3. Экспрессия мРНК генов иммунорегуляторных белков в ткани плаценты	151
3.4. Выделение плацента-ассоциированных АгАТ.....	154
3.4.1. Оптимизация выделения плацента-ассоциированных АгАТ из ткани плаценты	154
3.4.2. Исследование стабильности выделенных плацента-ассоциированных АгАТ при хранении в различных условиях.	157
3.5. Характеристика плацента-ассоциированных АгАТ.....	160
3.5.1. Анализ частоты встречаемости АгАТ некоторых специфичностей в элюатах плаценты и периферической крови матери.....	160
3.5.2. Аффинное выделение из иммуноглобулинового препарата антител против антигенов Галили, Тn, Neu5Ac β -Bn.....	168
3.5.3. Содержание и соотношение изотипов IgG в образцах аффинно выделенных АгАТ	169
3.5.4. Углеводная специфичность аффинно выделенных АгАТ	175
3.6. Характеристика мишеней в тканях плаценты и биологических эффектов плацента-ассоциированных АгАТ.....	183
3.6.1. Подтверждение мишеней углеводной природы для плацента-ассоциированных АгАТ в ткани плаценты	183

3.6.2. Изучение влияния эффекта предобработки аффинно выделенными антителами клеток линии EA.hy926 на экспрессию маркеров активации эндотелия	186
3.6.3. Изучение влияния аффинно выделенных АгАТ на экспрессию клетками линии EA.hy.926 маркеров активации в различных экспериментальных условиях.....	189
3.6.4. Изучение влияния аффинно выделенных анти-Neu5Ac β антител на гибель клеток линии EA.hy.926	192
3.6.5. Исследование дозозависимого эффекта анти-Neu5Ac β антител на активационный статус клеток линии EA.hy 926.....	193
3.7. Исследование субпопуляционного состава иммунокомпетентных клеток в периферической крови матери и пуповинной крови новорожденных	195
3.7.1. Оценка мажорных и минорных субпопуляций В-лимфоцитов в периферической и пуповинной крови	196
3.7.2. Оценка мажорных и минорных субпопуляций Т-лимфоцитов в периферической и пуповинной крови	199
3.7.3. Оценка мажорных и минорных субпопуляций NK-лимфоцитов в периферической и пуповинной крови	202
3.8. Содержание прогестерона и IL-6 в периферической и пуповинной крови	203
3.9. Характеристика профилей АгАТ у пациенток с физиологической беременностью и беременностью, осложненной ПЭ и ЗРП.....	205
3.9.1. Межгрупповые различия по АгАТ у пациенток с физиологической и осложненной беременностью на сроках, соответствующих ранней манифестации ПЭ и ЗРП	205
3.9.2. Межгрупповые различия по АгАТ у пациенток с физиологической и осложненной беременностью на сроках, соответствующих поздней манифестации ПЭ и ЗРП	206
3.9.3. Межгрупповые различия по АгАТ у пациенток с физиологической беременностью и беременностью, осложненной гипертензивными расстройствами	211
3.10. Расчет сигнатур АгАТ для дифференциальной диагностики ГРБ	216
3.11 Репертуар АгАТ пуповинной крови здоровых новорожденных и новорожденных с перинатальной патологией	223
3.12. Расчет сигнатур АгАТ для предикции состояния здоровья новорожденного	231
3.13. Характеристика профилей специфичности галектинов человека	233
3.14. Сопоставление специфичности АгАТ, выявленных в периферической крови беременных с ГРБ и пуповинной крови новорожденных, со специфичностью галектинов ..	237
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ	240
4.1. Патофизиологические изменения гликанов плаценты при плацента-ассоциированных осложнениях беременности.....	241
4.2. Патогенетические особенности продукции факторов периферической толерантности при плацента-ассоциированных осложнениях беременности	256
4.3. Патогенетические особенности системного иммунитета (клеточное звено) у беременных с ПЭ и их новорожденных	274

4.4. Патогенетические особенности системного иммунитета (гуморальное звено) у беременных с ПЭ и их новорожденных.....	285
4.5. Приложение полученных данных к диагностике ПЭ и прогнозу неонатальных исходов.....	298
ВЫВОДЫ.....	308
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	311
БЛАГОДАРНОСТЬ.....	312
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	313
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	317
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	362

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

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

В небольшом количестве работ, посвященных углевод-опосредованным взаимодействиям в иммунной и репродуктивной системах при беременности, высказывается предположение о взаимосвязи нарушений плацентации, формирования активационных фенотипов клеток в плаценте и нарушений механизмов развития толерантности к аллоантигенам плода (Amon R. et al, 2014; Clark G et al, 1996; Clark G et al, 2001; Clark G., 2014; Huang Z. et al., 2023; Kooyk Y. van, Rabinovich G. A., 2008). Продемонстрировано существование репродуктивного гликома или “углеводного кода”, представленного в клетках и в структурах плаценты (Jones C.J., Aplin J, 2009a; Jones C.J., Aplin J, 2009b). Описан гликом плаценты при нормальной беременности (Tatsuzuki A. et al, 2009), показаны его модификации при ряде патологий, в том числе ПЭ и ЗРП (Marini M. et al., 2011; Minas V. et al., 2007; Ravikumar G. et al, 2019; Sgambati E. et al, 2002). Предполагается, что изменения гликома плаценты может быть значимым фактором патогенеза нарушений плацентации при больших акушерских синдромах, т.к. гликаны опосредуют процессы инвазии, хотя убедительных доказательств этому нет. Также, пока недоказанной гипотезой являются предположения, что изменения гликома плаценты могут являться одной из причин активации иммунной системы матери (Тютюнник Н.В., 2019) и плода, поскольку установлено, что иммунный гомеостаз поддерживается специфическими углевод-белковыми взаимодействиями, осуществляемыми между гликанами и эндогенными лектинами (Hattori T,

2022; Menkhorst E. et al., 2021; Pang P.-C. et al., 2016). Гликаны могут выступать в качестве молекул, взаимодействие с которыми инициирует как регуляторные процессы, направленные на толерантность к ауто- и 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, соответственно (Clark G, 2014). Эти факты могут быть перенесены на иммунное реагирование в аллогенных системах, примером которого является беременность. Поэтому, дополнительно к феномену избирательной экспрессии антигенов HLA клетками плодового происхождения в плаценте – постулату, который научно обоснован и широко исследован в предшествующие годы в иммунологии репродукции (Wilczyński J.R., 2006), важное значение для формирования толерантности к фетальным аллоантигенам может также иметь малоизученный фактор гликома, обеспечивающего межклеточные контакты, и инициирующего иммунорегуляторные и толерогенные взаимодействия в плаценте.

Наряду с постнатальным исследованием плацентарной ткани, ключевое значение имеет пренатальный поиск молекулярных детерминант развития патологии и возможностей для ее коррекции. Перспективный подход для решения этой задачи заключается в: а) выделении антител, находящихся в связанном состоянии с антигенами в тканях плаценты (резидентных, плацента-ассоциированных антител), которые могут выполнять блокирующую функцию маскирования аллогенных антигенов и “образов опасности”, и характеристике углеводной специфичности антител из периферической, пуповинной крови и элюированных из тканей; б) поиске молекулярных мишеней и характеристике функциональной активности наиболее значимых плацента-ассоциированных антител; в) выявлении прогностических и диагностических маркеров в периферической крови матери и пуповинной крови новорожденного, поскольку клеточные и гуморальные факторы, ассоциированные с толерантностью к аллоантигенам и нормальной беременностью, или с отторжением и развитием патологии, не предложены для клинического использования. Аспект, связанный с отторжением, представляется особенно важным, поскольку ПЭ и ЗРП рассматриваются как проявления хронического отторжения плода (Wilczyński J.R., 2006). Понимание молекулярных механизмов развития заболевания и выявление значимых для формирования патологии мишеней и молекулярных маркеров позволит в будущем отслеживать их появление в крови в динамике беременности.

Так как гликом плаценты при больших акушерских синдромах малоизучен, а антигликановые антитела (АгАТ), качественные и количественные изменения репертуара и

содержания которых могут быть отражением ключевых звеньев патогенеза этих осложнений – 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 больших акушерских синдромах.

Степень разработанности темы исследования

Гипотеза о существовании “гликокода” была доказана при изучении плацентации у плацентарных млекопитающих. 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. et al., 2000; Jones C.J., Aplin J, 2009a; Jones C.P., Aplin J, 2009b). У человека выполнены единичные исследования на тканях нормальной зрелой плаценты (Tatsuzuki A. et al, 2009) и плаценты беременных с ЗРП, ГРБ, включая ПЭ и ГСД (Marini M. et al., 2011; Minas V. et al., 2007; Ravikumar G. et al., 2019; Sgambati E. et al., 2002; Sgambati E. et al., 2007). Однако особенности клинических групп, пробоподготовки образцов ткани, и узкая панель лектинов, 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 больших акушерских синдромов (БАС), поскольку гликаны являются наиболее широко распространенным классом соединений в организме, обеспечивают биоразнообразие белков и липидов и являются составными частями паттернов патогенности и опасности.

Также необходимо отметить, что “блокирующие антитела”, которые позиционируются как необходимый элемент пула гуморальных факторов, необходимых для развития толерантности к плоду и успешного течения беременности, не исследованы в аспекте их специфичности и функциональной активности (Borel I.M., et al., 1991; Gutierrez G et al., 2005; Zenclussen A.C. et al., 2001). Их масштабное определение (тестирование на связывание с большим числом антигенов) не проводилось ранее. Отсутствуют данные о содержании АгАТ в крови матери и новорожденного и их функциях в системе мать-плацента-плод. Поскольку эта группа антител относится к углевод-связывающим белкам, они могут проявлять регуляторные или эффекторные свойства, участвуя в иммунных реакциях, и одновременно выступать как

конкуренты в связывании гликанов с эндогенными лектинами, и их исследование расширит понимание иммунопатогенеза БАС.

Цель: 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, прогнозирования и 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. иммуно-гормональных 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

Методология диссертационного исследования основана на анализе отечественной и, главным образом, зарубежной литературы, что позволило определить область исследования и обосновать его цель и задачи. В исследование было включено достаточное число пациенток (399 беременных II-го и III-го триместров с физиологической беременностью и беременностью, осложненной БАС).

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, охарактеризованы мишени антител в тканях

нормальной и патологической плаценты плаценты и функциональная активность антител, что позволило охарактеризовать особенности развития периферической толерантности в норме и 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 иммуно-гормональные факторы, регулирующие процессы гликозилирования и формирования толерантности, а также пул АгАТ крови (совокупно более 800 антител, представленных иммуноглобулинами классов М и G) (**третий этап**), что позволило охарактеризовать особенности развития системной толерантности 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. 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.

Положения, выносимые на защиту:

1. При плацента-ассоциированных осложнениях беременности (преэклампсии и задержке роста плода) 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 специфических гликанов в ткани плаценты, 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 диссертационного 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, XVIII, XIX, XX, XXI, XXII Всероссийском научно-образовательном форуме “Мать и Дитя” (Москва, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020, 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); 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).

Личный вклад автора в получение результатов

Личный вклад автора в получение результатов диссертационного исследования является определяющим и состоит в планировании и участии во всех этапах диссертационного исследования: формулировании общей концепции, аналитическом обзоре литературы, постановке цели и задач исследования, разработке дизайна и выборе методологии исследования, выполнении лабораторных этапов – от отработки методик до личного выполнения постановки коллекций образцов биоматериала пациенток. В ходе выполнения диссертационной работы автором был написан и получен грант РФФИ на тему “Изучение фундаментальных механизмов формирования иммунологической толерантности к плоду” (Рег. № НИОКТР АААА-А19-119011090053-2), в котором автор был руководителем научного коллектива, определял и планировал исследования, проводил обобщение материала и выполнял оформление отчетов по гранту. Основная часть научных исследований по гранту легла в основу диссертационного исследования. Выполнение и анализ данных ИФА, проточной цитометрии, культивирование клеток и выполнение экспериментов *in vitro* на клеточной линии EA.hy926 выполнялось лично автором. Автором лично выполнен иммунологический и патофизиологический анализ полученных результатов, написаны все разделы диссертации, осуществлено графическое оформление результатов, сформулированы выводы, положения и практические рекомендации. Изготовление гистологических препаратов, морфометрия и фотосъемка препаратов проводилась совместно с 2-м патолого-анатомическим отделением Центра. Самостоятельно автором осуществлено формирование компьютерных баз данных в форматах Excel и в статистической программе MedCalc версии 16.4 (MedCalc, Бельгия), проведен статистический анализ полученных результатов. Анализ данных гликанового эррея и расчет диагностических сигнатур проводился помощью программы R совместно с лабораторией углеводов ИБХ РАН. Результаты диссертационной работы представлялись в виде докладов на научных конференциях лично автором. В работах, написанных в соавторстве, реализовывались идеи соискателя. Вклад ученых, оказавших содействие выполнению работы, отражен в публикациях по теме диссертации.

Внедрение результатов исследования в практику

Материалы диссертационного исследования используются в учебном процессе ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский Университет) на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии имени академика А.А. Воробьева Института общественного здоровья имени Ф.Ф. Эрисмана; ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И.

Пирогова Минздрава России на кафедре иммунологии медико-биологического факультета и патологической физиологии лечебного факультета в виде лекций и семинарских занятий для студентов, аспирантов по фундаментальной и клинической иммунологии и аллергологии, патологической физиологии; ГНЦ институт биоорганической химии им. акад. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН в образовательном процессе при подготовке научных и научно-педагогических кадров в аспирантуре в рамках дисциплины “химия углеводов и гликобиология”. Результаты диссертационной работы внедрены в практическую работу первого акушерского отделения патологии беременности ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России и в лабораторные разработки ООО “Семиотик”. Разработан прототип диагностической тест-системы для дифференциальной диагностики гипертензивных расстройств во время беременности и рекомендации по ведению пациенток с большими акушерскими синдромами.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Цель, задачи, выводы и научные положения диссертации соответствуют паспорту научной специальности 3.3.3. – “патологическая физиология”, конкретно пунктам 2, 3, 4, 6, 10 и паспорту научной специальности 3.2.7 – “иммунология”, конкретно пунктам 2, 4, 6.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 393 страницах и состоит из введения, и четырех глав: “обзор литературы”, “материалы и методы”, “результаты собственных исследований”, “обсуждение”, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включающего 664 источника. Диссертация иллюстрирована 83 рисунками, представлено 44 таблицы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. Формирование иммунологической толерантности к аллоантигенам плода: основные иммунологические механизмы, основанные на углевод-белковом взаимодействии, поддерживающие гомеостаз при беременности

Изучение механизмов формирования толерантности к фетальным аллоантигенам является одной из основных задач иммунологии репродукции. В настоящее время в мировой литературе представлено значительное число публикаций, посвященных особенностям функционирования клеточного и гуморального иммунитета в период беременности. Охарактеризованы различные факторы, участвующие в развитии центральной и периферической толерантности к плоду. Однако, показатели развития осложнений беременности, а также материнской и перинатальной заболеваемости и смертности остаются стабильно высокими, что свидетельствует о развитии патологических процессов у беременных, в которых принимает участие иммунная система, в той или иной степени. Поскольку такие осложнения как преэклампсия, задержка роста плода, преждевременные роды, выкидыш и неразвивающаяся беременность рассматриваются как проявления острого и хронического отторжения плода, то изучение механизмов формирования иммунологической толерантности в норме, и причины их нарушения при развитии патологии, является актуальной задачей.

1.1.–Основные клеточные и гуморальные механизмы, обеспечивающие толерантность к аллоантигенам

Концепция иммунологической толерантности, описывающая принципы развития полуаллогенного плода в организме матери на протяжении 40 недель беременности ведет свои истоки от работ Рэя Овена (Owen R.D., 1945) и Питера Медавара (Medawar P.B., 1956). За более чем 70 лет существования основные постулаты концепции, которую часто называют “парадоксом Медавара”, претерпели значительные изменения: от предположений об анатомическом разделении матери и плода, незрелости фетальных антигенов и иммунологической инертности иммунной системы матери при беременности - к развитию представлений об кооперативных иммуномодулирующих взаимодействиях аллогенных клеток, которые не только обеспечивают состояние толерантности (Barrientos и др., 2022; Rendell, Bath, Brennan, 2020), но и морфогенез и развитие плаценты. Многочисленные научные данные, накопленные, к настоящему времени, свидетельствуют, что при беременности фенотипические и функциональные изменения клеток развиваются как в плаценте (периферическая толерантность), так и в организме матери (системная толерантность).

1.1.1. Иммунные механизмы, обеспечивающие развитие периферической толерантности при беременности

Плацента является временным органом, развивающимся при беременности, в котором происходит непосредственный контакт аллогенных клеток. Плацента выполняет барьерную функцию, однако наличие аллогенных объектов (клеток и растворимых молекул аллогенной природы) у матери и плода (Тютюнник Н.В., 2019), свидетельствует о проницаемости этого барьера. Прохождение молекул и клеток через этот барьер является двунаправленным и избирательным, и регулируется специализированными структурами плаценты, особыми субпопуляциями материнских иммунных и фетальных клеток и гуморальными факторами, продуцируемыми аллогенными клетками (Rendell V., Bath N.M., Brennan T.V., 2020). Функционирование плаценты как проницаемого барьера является свидетельством отсутствия анатомического разделения матери и плода и способностью распознавать и реагировать на чужеродные аллоантигены. Однако иммунное реагирование строго регулируется и реализуется в кооперативных взаимодействиях материнских и фетальных клеток (Мантрова Д.А., 2020), а также ограничении активации иммунных клеток матери. Основные субпопуляции материнских и фетальных клеток, значимых для формирования периферической толерантности представлены в Таблице 1. Краткое изложение основных принципов, в соответствии с которыми происходит развитие периферической толерантности к аллоантигенам плода, представлено ниже.

Во-первых, в нормальной плаценте функционируют механизмы, снижающие иммуногенность фетальных клеток. Структура, которая входит в плацентарный барьер и является его основным компонентом, представлена высокодифференцированным трофобластом – синцитиотрофобластом или синцитием. Синцитиотрофобласт и другие типы трофобласта экспрессируют толерогенные молекулы (PD-L1, PD-L2, CD200, FasL и др.), которые дифференцированно представлены в структурах плаценты (Зиганшина М.М. и др., 2022а) на протяжении всей беременности (Petroff M.G. et al., 2005) и ослабляют аллоиммунную реактивность фетальных клеток (Clark D.A. et al., 2003; Lu B. et al., 2019). Также, синцитиотрофобласт имеет особенности экспрессии фетальных антигенов гистосовместимости (HLA). В частности, синцитиотрофобласт демонстрирует практически отсутствие экспрессии классических высокополиморфных HLA I и II классов, но экспрессирует неклассический антиген HLA-G и низкополиморфные антигены HLA-C,-E,-F. В отличие от клеток, экспрессирующих HLA-A и HLA-B, и участвующих в презентации антигенов Т-клеткам и NK-клеткам, клетки, экспрессирующие низкополиморфные и неклассические антигены такую функцию не выполняют. Напротив, экспрессия молекулы HLA-G фетальными тканями защищает (Зиганшина М.М., 2016) их от атаки материнских NK-клеток (Xu X., Zhou Y., Wei H., 2020). Вследствие этого

фетальные антигены нельзя назвать “незрелыми”, как предполагал Медавар, но имеет место избирательная экспрессия молекул HLA и, напротив, экспрессия толерогенных молекул, что обуславливает низкую иммуногенность синцитиотрофобласта (Erlebacher A., 2013a).

Во-вторых, иммунные клетки плаценты имеют фенотипические и функциональные особенности, которые способствуют развитию толерантности к плоду. В плаценте, вследствие наличия фетальных антигенов отцовского происхождения развивается Th2-клеточно-опосредованный противовоспалительный ответ (Куликова Г.В. и др., 2021). Он включает развитие альтернативно активированных клеток, в частности, M2-макрофагов, которые проявляют противовоспалительные и регуляторные свойства; незрелых толерогенных ДК, которые продуцируют иммунорегуляторные молекулы и цитокины с иммуносупрессорным действием, а также вызывают индукцию Т(рег)-клеток и делецию активированных эффекторных Т-клеток; альтернативно дифференцированных децидуальных НК-клеток (см.ниже); регуляторных Т- и В-клеток (Зиганшина М.М., 2016).

В-третьих, между материнскими и фетальными клетками осуществляются иммунорегуляторные взаимодействия, которые обеспечивают локальную супрессию иммунного ответа и способствуют нормальному морфогенезу и росту плаценты. В частности, преобладающие иммунные клетки плаценты в первой половине беременности - децидуальные естественные киллерные клетки (dNK) (Kwan M. et al., 2014), которые составляют около 70% от всех лейкоцитов децидуальной ткани, имеют фенотипические и функциональные особенности, отличающие их от НК-клеток периферической крови. Они практически не проявляют цитотоксических свойств и являются продуцентами цитокинов и факторов роста (Christiansen O.B., 2013; Higuma-Myojo S. et al., 2005; Liu S. et al., 2017; Rajagopalan S. et al., 2005; Rendell V., Bath N., Brennan T.V., 2020). Вследствие этих особенностей, dNK участвуют в процессах ремоделирования спиральных артерий матки, инвазии трофобласта и развитии сосудистой сети плаценты, что реализуется в формировании адекватного срока беременности фетоплацентарного кровотока (Ander S.E., Diamond M.S., Coyne C.B., 2019; Hanna J. et al., 2006). Кроме морфогенеза плаценты, установлена ключевая роль dNK в развитии локальной толерантности к плоду. dNK экспрессируют иммуноглобулиноподобные (KIR) и лектиновые рецепторы киллерных клеток, которые специфически связываются с малополиморфными молекулами HLA трофобласта. В частности, рецепторы CD94/NKG2A и ILT2 связываются с HLA-C, -E, -G трофобласта (Liu S. et al., 2017; Makrigiannakis A. et al., 2008), что ведет к запуску ингибирующих сигнальных путей, ограничивающих активность dNK, предотвращая цитотоксические реакции против фетальных клеток (Apps R. et al., 2007). В Таблице 1 охарактеризованы клеточные субпопуляции, которые в

плаценте выполняют как иммунорегуляторные функции, так и участвуют в ремоделировании тканей и формировании фетоплацентарной системы.

В-четвертых, механизмы периферической толерантности, способствующие блокированию эффекторных реакций на “чужое” в местах непосредственного соприкосновения клеток, несущих аллоантигены также включают продукцию и экспансию иммуно-гормональных факторов, которые оказывают протективный эффект на развивающийся плод. В частности, продукцию гормонов беременности - хорионического гонадотропина и прогестерона, которые поддерживают локальную толерогенную среду (Fournier T., Guibourdenche J., Evain-Brion D., 2015), индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO) который осуществляет метаболизм триптофана в децидуальных макрофагах, дендритных клетках, синцитиотрофобласте и вневорсинчатом инвазивном трофобласте. Высокие концентрации IDO ингибируют активность Т-клеток матери, что подтверждено экспериментами на культурах клеток и на животных моделях (Hönig A. et al., 2004; Rendell V., Bath N.M., Brennan T.V., 2020).

Роли гуморальных иммуно-гормональных факторов были посвящены многочисленные исследования в аспекте изучения “блокирующих факторов”, к которым кроме цитокинов и гормонов относят белки беременности (продуцируемые плацентой) и антитела. Предполагается, что эти факторы имеют как системное, так и периферическое действие, выполняя функции блокирования аллоантигенов, в том числе и в плаценте. Имеются сообщения об исследовании асимметрично гликозилированных антител (гликозилированных только по одному Fab-фрагменту) при беременности, которые предположительно выполняют блокирующую функцию (т.н. “блокирующие антитела”) (Labeta M.O. et al., 1986). Блокирующие антитела обнаруживаются в крови здоровых небеременных доноров в количестве 15% от общего уровня IgG (Borel I.M. et al., 1991), а также присутствуют и у других млекопитающих как вне-, так и во время беременности (Awoyemi T. et al., 2020; Gentile T., Margni R.A., 1995). Их содержание значительно увеличивается (до 50% во втором триместре) (Zenclussen A.C. et al., 2001). При нормально протекающей беременности в плаценте 60% от общего уровня IgG антител асимметрично гликозилированы, и 80% из них, направлены против отцовских аллоантигенов (Зиганшина М.М. и др., 2022а; Barrientos G. et al., 2009; Borel I.M. et al., 1989). Снижение содержания в крови и ассоциированных с тканью плаценты блокирующих антител отмечается при потерях беременности (Barrientos G. et al., 2009; Eblen A.C. et al., 2000).

Таблица 1 Основные популяции материнских клеток и клеток плода, которые участвуют в развитии периферической толерантности при беременности

	Популяция клеток: численное изменение при нормальной беременности по сравнению с патологической беременностью	Основные функции	Ссылки
Иммунные клетки	АПК (антигенпрезентирующие клетки): - снижение содержания М1 макрофагов и активированных ДК; повышение содержания М2 макрофагов, незрелых и толерогенных ДК в тканях плаценты (Зиганшина М.М., 2016)	Участвуют в морфогенезе плаценты, продуцируют металлопротеиназы и ангиогенные факторы (ремоделирование спиральных артерий, регуляция ангиогенеза); Способствуют развитию толерантности к плоду (создание противовоспалительного микроокружения фетальных клеток, за счет низкой продукции IL-12 и высокой - IL-10 и TGF- β и фагоцитоза апоптотических клеток и клеточного “мусора”; экспрессия рецепторов апоптоза для регуляции численности CD8 ⁺ цитотоксических Т-клеток; продукция фермента индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO) и метаболизм триптофана)	(Abrahams V.M.et al., 2004; Liu S.et al., 2017; Makrigiannakis A. et al., 2008; Rieger L. et al., 2004; Svensson-Arvelund J. et al., 2015)
	Гранулоцитарные миелоидные супрессоры: повышение в децидуальной оболочке и в области ворсин плаценты	Ограничение активации и пролиферации Т-клеток, переключение с Th1 на Th2-иммунный ответ	(Шевченко Ю.А., Назаров К.В., Сенников С.В., 2023)
	Децидуальные НК-клетки: повышение в децидуальной ткани в первой половине беременности	Участие в морфогенезе плаценты (продукция цитокинов и факторов роста для формирования и развития фетоплацентарного комплекса) Способствуют развитию толерантности к плоду (отсутствуют цитотоксические свойства; осуществляют иммунорегуляцию за счет экспрессии лигандов для молекул HLA трофобласта; продукция иммунорегуляторных цитокинов IL-10 и TGF- β , стимулирующих пролиферацию T(reg), индукция апоптоза эффекторных Т-клеток)	(Aisagbonhi O., Morris G.P., 2022; Ander S.E., Diamond M.S., Coyne C.B., 2019; Hanna J. et al., 2006; Kwan M. et al., 2014)

	Популяция клеток: численное изменение при нормальной беременности по сравнению с патологической беременностью	Основные функции	Ссылки
	Т-клетки: Th2-клетки повышаются в децидуальной оболочке во II триместре Т(рег)-клетки повышаются в децидуальной ткани ко II триместру (Трифорова Н.С., 2020)	Ключевые клетки для толерантности к фетальным аллоантигенам. Продуцируют провоспалительные и толерогенные цитокины и регулируют численность Th1, Th17-клеток Подавляют Т-клеточные ответы и регулируют численность Th1, Th17-клеток и провоспалительных АПК; продуцируют IDO, IL-10 TGF-β и гемоксигеназу-1, что поддерживают незрелый статус ДК и стимулируют дифференцировку толерогенных макрофагов и ДК	(Шевченко (Ю.А., Назаров К.В., Сенников С.В., 2023) (Crocker R.P., Redelinguys P., 2008; Mao G. et al., 2010; Tilburgs T. et al., 2006) (Зиганшина М.М., 2016)
	В-клетки: В(рег)-клетки повышаются в крови и в плацентарной ткани	Формирование микроокружения, способствующего толерантности: ингибирование активации и дифференцировки Th1- и Th17-клеток, поддержание популяции Т-регуляторных клеток и толерогенных ДК, секреция IL-10 и TGF-β	(Shimada S. et al., 2023)
Клетки плаценты	Трофобласт (различные популяции), клетки стромы, децидуальные клетки, эндотелиальные клетки	Иммунорегуляция: экспрессия толерогенных молекул (CD200 и др.); Экспрессия рецепторов апоптоза для регуляции численности CD8⁺ цитотоксических Т-клеток, избирательная экспрессия HLA (отсутствие высокополиморфных молекул HLA-I и HLA-II класса, экспрессия малополиморфных HLA-C,-E,-F,-G) (Зиганшина, 2016) Продукция противовоспалительных и толерогенных гуморальных факторов, способствующих дифференцировке макрофагов в M2 фенотип, продукция IDO и метаболизм триптофана	(Bai X. et al., 2009; Clark D.A. et al., 2003; Erlebacher A., 2013a; Lu B. et al., 2019; Petroff M.G. et al., 2005; Stenqvist A.-C. et al., 2013; Xu X., Zhou Y., Wei H., 2020)

Регуляция синтеза антител с блокирующей функцией осуществляется прогестероном и IL-6, что было подтверждено *in vitro* при культивировании клеток мышинной гибридомы 112D5 в присутствии этих молекул (Canellada A. et al., 2002a). Взаимосвязь между прогестероном, IL-6 и синтезом блокирующих антител отмечается во множестве исследований (Bennstein S.B. et al., 2020; Bernardi F.C.B. et al., 2012; Canellada A. et al., 2002b; Gutierrez G. et al., 2005; Margini R. A., Zenclessen A. C., 2001; Miranda S. et al., 2005). Установлено, что значительное стимулирование синтеза блокирующих антител изолированными В-клетками плаценты наблюдалось при совместном действии IL-4+IL-6+IL-10 (Canellada A. et al., 2002b), но центральную роль в регуляции их синтеза имеет IL-6, причем его эффект дозозависим (Margini R. A., Zenclessen A. C., 2001), поскольку высокий уровень IL-6 ассоциирован со спонтанными абортами, и только низкие дозы IL-6 оказывают стимулирующий эффект на синтез блокирующих антител (Canellada A. et al., 2002a). Отмечалось, что IL-6, продуцируемый культурой плацентарных клеток и присутствующий в их супернатантах, обладает более выраженным стимулирующим эффектом на синтез антител клетками гибридомы, чем рекомбинантный цитокин (Canellada A. et al., 2002b). В 2015 году были опубликованы результаты, указывающие на то, что клетки эндотелия и трофобласт плаценты способны продуцировать IgG (что является спорным фактом и пока не было подтверждено последующими работами), значительная часть которых (~30%) гликозилирована асимметрично (Gu J. et al., 2015). Асимметричные IgG, выделенные из плаценты, связывались с Fc-фрагментами иммуноглобулинов человека и млекопитающих других видов, а также с некоторыми типами лейкоцитов крови здоровых доноров, но обычные (симметрично гликозилированные) IgG, выделенные из плаценты, не связывались с иммуноглобулинами и клетками крови в аналогичных тестах, что свидетельствует об особой роли этих антител в репродукции (Gu J. et al., 2015).

1.1.2. Иммунные механизмы, обеспечивающие развитие центральной толерантности при беременности

Несмотря на периферическую толерантность, которая выражается в подавлении эффекторных реакций на чужеродные антигены в плаценте, у беременной сохраняется способность адекватно реагировать на патогены бактериального и вирусного происхождения на системном уровне, что указывает на избирательный характер толерантности. Однако системный иммунный ответ при беременности имеет ряд особенностей и специфических характеристик, которые выражаются как в количественных, так в качественных, т.е. функциональных, изменениях клеточного и гуморального

иммунитета. Основные принципы развития центральной толерантности к аллоантигенам плода описаны ниже.

Во-первых, доминирование Th2-иммунных реакций – необходимое условие развития толерантности к плоду не только на локальном, но и на системном уровне (Wang W. et al., 2020). Как было показано Т.Вегманом, Th2-иммунный ответ матери, при котором стимулируется гуморальный ответ, оказывает протективное влияние на развивающийся плод (Chang R.-Q., Li D.-J., Li M.-Q., 2018; Wegmann T.G. et al., 1993). В крови были идентифицированы гормоны, белки беременности, цитокины и ростовые факторы, ассоциированные с Th2-ответом, регулирующие толерантность к плоду (Chang R.-Q., Li D.-J., Li M.-Q., 2018). Th2-ответ стимулируется антигенами трофобласта отцовского происхождения в местах локального контакта аллогенных клеток, что приводит к активации дендритных клеток и дифференцировке наивных Т-лимфоцитов в Th2-клетки. Повышение доли Th2-клеток стимулирует пролиферацию наивных Т-клеток, дифференцировку клеток по Th2 пути и синтез соответствующих цитокинов (Mitchell R.E. et al., 2017; Piccinni V.-P. et al., 2015).

Во-вторых, на протяжении беременности происходят детерминированные динамические изменения клеточного и гуморального звеньев иммунной системы. В частности, в субпопуляционном составе клеток врожденного и адаптивного иммунитета выявляются изменения, которые отражают смену провоспалительной направленности иммунных реакций в ранней беременности на состояние, характеризующееся подавлением иммунной реактивности в середине беременности, и на активацию иммунных реакций к родам (Shah N.M. et al., 2017). Измерение содержания различных клеточных субпопуляций и цитокинов в крови беременных в динамике показало, что системный ответ выходит за рамки Th2-поляризации и отражает более сложный комплексный иммунный ответ (Kraus T.A. et al., 2012). Так, проспективный анализ периферической крови в трех интервалах, соответствующих триместрам беременности, и двух интервалах послеродового периода показал повышенное содержание популяций клеток врожденного иммунитета, включая ДК, моноциты, нейтрофилы, и одновременное снижение общего числа Т-клеток, NK-клеток и В-клеток. Функциональная активность клеток, оцениваемая по способности отвечать на стимулы и продуцировать цитокины, также была у беременных изменена. На протяжении всей беременности выявляются изменения гуморальных факторов: повышение TNF- α и фактора роста GM-CSF; снижение MCP-1 и VEGF. Снижение IFN γ выявлялось только во II-м и III-м триместрах. При этом было понижено общее число CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток, а также фиксировалось снижение продукции цитокинов Th1 и Th2 спектра CD45RA⁺

наивными Т-клетками при *in vitro* стимуляции суперантигеном. Динамическое снижение содержания периферических НК-клеток выявлялось в I триместре, достигая максимально низких значений к середине и оставаясь на постоянном уровне к концу беременности, что отражает рекрутинг клеток в матку и фетоплацентарную область и их роль в морфогенезе плаценты. Эти данные свидетельствуют о преимущественной активации врожденного и снижении интенсивности реакций адаптивного иммунитета при беременности, и, особенно, в третьем триместре (Cellini M. et al., 2020; Kraus T.A. et al., 2012; Yi H.J. et al., 2014).

Общепризнано, что ведущими регуляторами репродуктивной функции являются половые гормоны, оказывающие системное действие на организм. Они вызывают количественные и качественные изменения в различных системах, в том числе иммунной. При беременности, развитие бластоцисты инициирует синтез хорионического гонадотропина (ХГЧ), который продуцируется сначала бластоцистой, а затем различными клеточными популяциями трофобласта и регулирует процессы имплантации, плацентации и оказывает стимулирующее влияние на синтез прогестерона желтым телом (Fournier T., Guibourdenche J., Evain-Brion D., 2015). ХГЧ, прогестерон и эстроген, за счет воздействия на соответствующие рецепторы, присутствующие в различных клетках, включая лимфоциты и АПК, вызывают активацию/репрессию различных сигнальных путей и транскрипцию белков, связанных с иммунным ответом. ХГЧ действует на систему комплемента, регулирует апоптоз клеток через систему Fas/FasL и модулирует баланс между Th1 и Th2-клетками. Его участие в развитии толерантности к плоду осуществляется через регуляцию фенотипа и функциональной активности ДК, пролиферации клонов регуляторных Т- и В-клеток. В частности, ХГЧ стимулирует дифференцировку В(рег)-клеток двух фенотипов: IL-10⁺(B10) регуляторных клеток и IL-35⁺ продуцирующих В(рег)-клеток, которые подавляют развитие и активность эффекторных клеток и являются, наряду с Т(рег)-клетками, ключевыми участниками реакций, регулирующих толерантность к плоду (Зиганшина М.М., 2016; Liu J. et al., 2019). Максимального содержания в крови матери ХГЧ достигает к концу I триместра, и динамически снижается до низких значений к III триместру.

Содержание эстрогенов и прогестерона возрастает в течение срока беременности, достигая максимума на поздних сроках (Rendell V., Bath N. M., Brennan T. V., 2020). Такая динамика эстрогенов закономерна, поскольку в высоких концентрациях эстрогены стимулируют Th1 ответ, в низких – развитие толерантности. Было продемонстрировано, что высокий уровень эстрогенов при беременности позитивно регулирует пролиферацию Т-фолликулярных хелперных клеток (Tfh), специализирующихся на помощи В-клеткам,

что способствует стимуляции гуморального иммунитета (Monteiro C. et al., 2017) и балансу Th1/Th2 иммунных реакций. Эстрогены при беременности негативно регулируют Т- и В-лимфопоэз, индуцируют синтез и секрецию IL-10 (Cohen-Solal J. F. G. et al., 2006), стимулируют Th2 ответ и способствуют увеличению популяции T(per)-клеток (Enninga E. A. L. et al., 2014). Динамические изменения клеточных и гуморальных иммунных факторов во время беременности представлены на Рисунке 1.

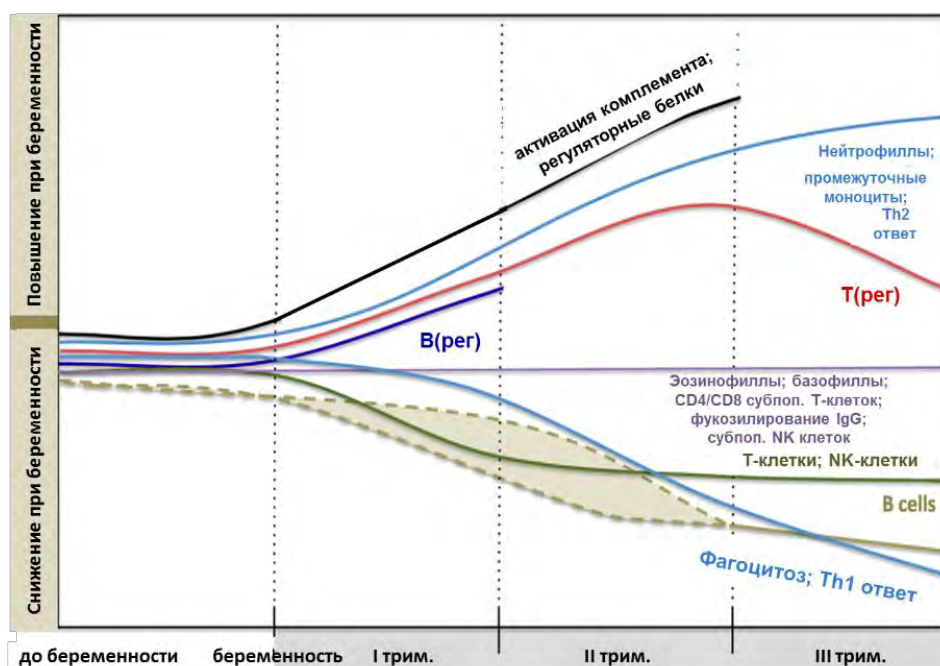


Рисунок 1. Закономерности изменения основных субпопуляций клеток иммунной системы и гуморальных факторов при беременности. Из (Abu-Raya B. et al., 2020) с изменениями.

В-третьих, отмечена системная роль прогестерона и белков, протективных для плода, продуцируемых во время беременности. Прогестерон позитивно регулирует Th1/Th2 иммунный ответ в сторону последнего, стимулируя продукцию IL-10, ингибирует провоспалительные реакции, включая TLR-индуцированную продукцию цитокинов и NF-κB сигнальный путь (Robinson D. P., Klein S. L., 2012), индуцирует экспрессию HLA-G (Szekeres-Bartho J., Halasz M., Palkovics T., 2009), осуществляет регуляцию популяции T(per)-клеток (Mjösberg J. et al., 2009), численности и дифференцировки NK-клеток (Зиганшина, 2016; Enninga et al., 2014). Однако на фоне данных о позитивной регуляции прогестероном Th2-ответа, способствующего синтезу антител (Canellada A. et al., 2002a), имеются отдельные сообщения о подавлении прогестероном антителопродукции (Robinson D. P., Klein S. L., 2012). Эффекты прогестерона опосредованы его связыванием с рецепторами и продукцией прогестерон-индуцированного блокирующего фактора (PIBF), который значим для нормального развития беременности (Kozma N. et al., 2006).

При нормальной беременности отмечается особая роль “регуляторной оси прогестерон-PIBF” в механизмах толерантности к плоду, поскольку формируется положительная обратная связь: прогестерон индуцирует продукцию PIBF, стимулирует дифференцировку наивных Т-клеток в клетки Th2-типа (Piccinni M.P. et al., 1995), а PIBF связывается с альфа-цепью рецептора IL-4 и активирует Jak1/Stat6 сигнальный путь, что увеличивает продукцию Th2-цитокинов (King A. et al., 2000), и усиливает иммуномодулирующий эффект прогестерона (Raghupathy R. et al., 2005). В *in vitro* экспериментах на лимфоцитах млекопитающих и человека PIBF вызывает стимуляцию Th2-цитокинового паттерна (Raghupathy R. et al., 2009), в частности продукцию IL-4 и IL-10 (Piccinni M.-P. et al., 2021), поскольку при дефиците PIBF Т-клетки дифференцируются в Th1-тип (Зиганшина М.М., 2016; Csabai T. et al., 2020).

Прогестерон и PIBF способствуют стимуляции синтеза антител В-лимфоцитами посредством активации иммунных реакций Th2-типа и продукции цитокинов соответствующего спектра. Установлено, что оба фактора регулируют N-гликозилирование IgG (Prados M.B. et al., 2011). Было показано, что они стимулируют продукцию особой популяции антител, которые имеют маннозобогатые цепи N-гликанов на одном из Fab-фрагментов молекулы иммуноглобулина G, благодаря чему она имеет асимметричную структуру (асимметрично гликозилированные антитела, которые обсуждались выше) (Kelemen K. et al., 1996). Исследования показали, что почти 10-15 % IgG крови являются асимметрично гликозилированными в варибельной области. У беременных наблюдается положительная связь между содержанием асимметричных антител в крови и экспрессией PIBF на лимфоцитах. Также установлено возрастание содержания этих антител в периферической крови и в плаценте (Zenclussen A.C. et al., 2001), где они выполняют, как предполагается, блокирующую функцию, связываясь с аллоантигенами и блокируя развитие иммунного ответа. По данным литературы, кроме прогестерона и PIBF в регуляции синтеза асимметричных антител с блокирующей функцией участвует и IL-6 (Canellada A. et al., 2002a; Prados M.B. et al., 2011).

В-четвертых, центральная роль в развитии толерантности к плоду и поддержании иммунного гомеостаза при беременности отводится регуляторным клеткам, которые ограничивают развитие клеток активированных фенотипов и подавляют эффекторные реакции (Зиганшина М.М., 2016). Исторически первыми были идентифицированы Т(рег)-клетки, которые включают несколько субпопуляций, отличающихся фенотипическими и функциональными характеристиками. В плаценте и в периферической крови определяется большое разнообразие субпопуляций Т(рег)-клеток; причем, их содержание варьируется в течение нормальной беременности и изменяется при патологии (Krop J. et al., 2020).

Понятие «T(рег)-клетки» объединяет популяции как CD4⁺, так и CD8⁺ позитивных T-клеток, внутри которых можно выделить минорные субпопуляции (на основании экспрессии транскрипционных факторов и кластеров дифференцировки). Наиболее широко изучены CD4⁺T(рег)-клетки, в отличие от которых, идентификация CD8⁺T(рег)-клеток затруднена, поскольку, отсутствуют четкие маркеры отличающие эту субпопуляцию от обычных CD8⁺T-клеток (Yu Y. et al., 2018; Zhang Z. et al., 2008).

CD4⁺T(рег)-клетки составляют 5-10% от общей популяции CD4⁺T-клеток (Seddiki N. et al., 2006a). Основными признаками T(рег)-клеток являются экспрессия транскрипционного фактора FoxP3 (forkhead box protein P3), высокая экспрессия CD25^{hi} и низкая CD127^{low} (Fontenot J.D. et al., 2005; Fontenot J. D., Gavin M. A., Rudensky A. Y., 2003; Liu W. et al., 2006; Sun L., Yi S., O'Connell P. J., 2010). В настоящее время известны несколько субпопуляций «CD4⁺T(рег)-клеток (Chien C.-H., Chiang B.-L., 2017): тимические tT(рег)-клетки (ранее натуральные T(рег)) и HLA-G⁺ T(рег)-клетки, которые развиваются в тимусе при онтогенезе T-клеток в ответ на аутоантигены; индуцированные iT(рег)-клетки, развивающиеся на периферии из CD4⁺T-клеток в ответ на презентацию чужеродного антигена и под воздействием цитокинов (Tanchot C. et al., 2013). В зависимости от продуцируемого цитокина iT(рег)-клетки подразделяются на Tr1-клетки (IL-10) и Th3-клетки (TGF-β) «(Зиганшина М.М., 2016). Естественные tT(рег) и iT(рег) характеризуются экспрессией CD25 и FoxP3, в то время как клетки HLA-G⁺T(рег), Tr1 и Th3, напротив, являются CD25-FoxP3-. tT(рег)-клетки, происходящие из тимуса, проявляют иммуносупрессорную активность в отношении эффекторных клеток при межклеточных контактах (Jonuleit H. et al., 2001). Подавление иммунитета периферическими индуцированными iT(рег), Tr1 и Th3 клетками опосредуется через секрецию противовоспалительных цитокинов, что вызывает ингибирование пролиферации и рекрутинга эффекторных клеток (Jørgensen N., Persson G., Hviid T. V. F., 2019).

При беременности выявляется повышенный уровень периферических T(рег) по сравнению с небеременными, причем число T(рег) растет динамически и достигает максимума во II триместре (Somerset D.A. et al., 2004). Число T(рег)-клеток фенотипов CD4⁺CD25^{hi}, CD4⁺CD25⁺CD127^{low} и CD4⁺Foxp3⁺, значимо выше при нормальной беременности, чем при ПЭ и у небеременных (Somerset D.A. et al., 2004; Tung T.-C., Tung Y.-F., 1945). Однако имеются данные и об отсутствии значимых различий в содержании T(рег)-клеток у здоровых беременных и беременных с патологией (Vianna P. et al., 2016). В пуповинной крови содержание T(рег)-клеток выше, чем в периферической крови взрослых людей, а у недоношенных детей их больше, чем у доношенных новорожденных (Pieren D.

К. J., Boer M. C., Wit J. de, 2022). Т(рег)-клетки, свежевыделенные из пуповинной крови, более гомогенны по фенотипическим маркерам, имеют более разнообразный репертуар Т-клеточных рецепторов (TCR) и содержат в популяции меньше эффекторно-подобных клеток (Зиганшина М.М. и др., 2020), в отличие от Т(рег) периферической крови взрослых (Motwani K. et al., 2020). В сравнительных исследованиях функциональной активности Т(рег)-клеток из периферической крови взрослых и пуповинной крови было показано, что неонатальные Т(рег) характеризуются отсутствием супрессорной активности по сравнению с Т(рег)-клетками взрослых. Однако при культивировании *in vitro* и активации, Т(рег) пуповинной крови по супрессорным свойствам превосходили Т(рег) периферической крови взрослых, что свидетельствует о необходимости стимула для проявления супрессорной функции у неонатальных Т(рег)-клеток (Fujimaki W. et al., 2008).

Значительный интерес при беременности представляет субпопуляция эффекторных $CD4^+$ Т-клеток с фенотипом $CD4^+CD25^+CD127^+$. Как известно, дифференцировочный маркер CD25 может экспрессироваться на популяции $CD4^+$ клеток, которые не обладают регуляторной функцией и не экспрессируют канонический транскрипционный фактор FoxP3, являющийся признаком Т(рег)-клеток. Используя дополнительные маркеры Т(рег)-клеток (CD127 и FoxP3), было показано, что $CD4^+CD25^{bright}$ Т-клетки могут быть подразделены на две основные популяции: обычные Т(рег) ($CD25^+FoxP3^+CD127^{low\ to\ neg}$) и активированные Т-хелперные клетки ($CD25^+Foxp3^-CD127^+$) (Seddiki N. et al., 2006b). По данным исследования (Prahl M. et al., 2016), в пуповинной крови новорожденных, рожденных от матерей, перенесших малярию, установлено повышение обеих субпопуляций: Т(рег) и активированных Т-хелперов. Причем, содержание Т(рег) было выше у новорожденных, чьи матери перенесли малярию на ранних сроках, а активированных Т-хелперов - у младенцев с гистопатологическими признаками плацентарной малярии. Эти данные свидетельствуют о раннем развитии субпопуляций Т-клеток и поляризации иммунного ответа плода при внутриутробной инфекции, что проявляется в экспансии как Т(рег), так и эффекторных Т-клеток в разные сроки, которые зависят от времени перенесенной инфекции.

Известно, что хроническая иммунная активация ведет также к экспансии высокодифференцированных антигенспецифичных олигоклональных $CD8^+$ Т-клеток, у которых отсутствует экспрессия CD28 (Pangrazzi L. et al., 2020). Эти клетки представляют собой гетерогенную популяцию, представленную различными субпопуляциями (регуляторными супрессорными $CD8^+$ Т-клетками и цитотоксическими $CD8^+$ Т-клетками), которые отличаются по функциям и конкурируют между собой (Зиганшина М.М., 2016;

Strioga M., Pasukoniene V., Characiejus D., 2011; Suci-Foca N., Manavalan J. S., Cortesini R., 2003; Vianna P. et al., 2016). Для субпопуляции с регуляторной активностью характерна продукция IL-10 и TGF- β , для цитотоксических клеток - экспрессия CD11b⁺ и/или CD57⁺ (Vianna P. et al., 2016). По данным литературы у женщин с ПЭ выявляется снижение CD8⁺CD28⁻ T(рег) супрессорных клеток (Vianna P. et al., 2016), при вирусной активации напротив, повышение установлено как у женщин, так и у их младенцев по сравнению с нормой (Lissauer D. et al., 2011).

В условиях провоспалительной стимуляции может происходить IL-15/IL-21-регулируемая индукция экспрессии CD28 на CD8⁺T-клетках с развитием субпопуляции CD8⁺CD28⁺ эффекторных клеток (Casey K. A., Mescher M. F., 2007; Nagy B. et al., 2021), экспансия которых часто ассоциирована с патологией плаценты и плода (Tilburgs T. et al., 2006). Установлено, что CD8⁺T-клетки пуповинной крови более чувствительны к цитокин-индуцированной индукции экспрессии CD28⁺, чем клетки периферической крови взрослых (Chen Y.-H. et al., 2012). Имеется сообщение о повышении экспрессии CD28 на CD8⁺T-клетках при ПЭ, что свидетельствует об активации T-клеток (Darmochwal-Kolarz D. et al., 2012).

Кроме T-клеток активно изучаемой популяцией при беременности являются CD56⁺NK-клетки, которые доминируют в пуле иммунных клеток в децидуа и могут составлять до 20% лимфоцитов крови. При беременности, осложненной гипертензивными расстройствами, наиболее изучены цитотоксические NK-клетки: отмечается их повышенное содержание в крови по сравнению со здоровыми беременными в сопоставимые сроки гестации (Bachmayer N. et al., 2006; Borzychowski A.M. et al., 2005; Peraçoli J.C. et al., 1995; Zhan Z. et al., 2004). В нескольких исследованиях описано снижение NK-клеток при ПЭ (Milosevic-Stevanovic J. et al., 2016; Williams P.J. et al., 2009). Конкурирующие результаты в подобных исследованиях объясняются особенностями когорты пациенток, включенных в исследование.

Известно, что для циркулирующих CD56^{bright}-NK-клеток характерна высокая экспрессия CD127, а у CD56^{dim}-NK-клеток этот рецептор отсутствует или является низкоэкспрессируемым (Михайлова В.А., 2019; Vivier E. et al., 2018). CD56^{bright}NK-клетки обладают слабой цитотоксической активностью и проявляют иммунорегуляторные свойства, продуцируя IFN- γ , TNF- β , GM-CSF, IL-10, IL-13, а также за счет отсутствия экспрессии CD16, высокой экспрессии лектиновых рецепторов С-типа CD94/NKG2 и рецепторов хемокинов CCR7 и CXCR3. Поэтому эта группа клеток рассматривается как

NK(per)-клетки (Трифенова Н.С., 2020; Zhang C., Zhang J., Tian Z., 2006). Установлено, что большинство CD56^{bright}-NK-клеток характеризуются фенотипом CD56^{bright}CD16⁻CD127⁺ (Bennstein S.B. et al., 2020). CD127⁺NK-клетки не были детально изучены при беременности, но известна их принадлежность к линии клеток-предшественников NK-клеток, экспрессирующих CD7 и различающихся по чувствительности к IL-15, выделенных из костного мозга плода человека. Клетки этих линий в разной степени экспрессировали CD127 и CD117, и в различной степени были представлены в пуповинной крови (Sathe P. et al., 2017).

Беременность также вызывает изменения В-клеточного звена иммунной системы. По данным литературы, значительное число исследований В-клеток посвящено изучению больших субпопуляций. Продемонстрировано, что количество В1- (CD19⁺CD5⁺) и В2-клеток (CD19⁺CD5⁻), определенное в периферической крови у женщин с осложненной беременностью, включая ПЭ, в разных выборках демонстрирует как повышение, так и снижение; но в ряде исследований показано отсутствие различий (Ghafourian M. et al., 2015; Jensen F. et al., 2012; Kwak J. Y. H. et al., 1995; Nguyen T. G., Ward C. M., Morris J. M., 2013) по сравнению с их содержанием при физиологической беременности. Основной акцент при осложненной беременности отводится патологическим антителам (Magatti M. et al., 2021; Saccone G. et al., 2017) (антифосфолипидным, антитромбоцитарным и т.д.) и продуцирующим их В2-клеткам, так как они проходят весь путь дифференцировки, начиная с уровня клеток-предшественников и завершая В-клетками памяти и плазматическими клетками, производящими антитела (Абдурахманова Н.Ф., 2020). Менее изучены при беременности В1-клетки - малочисленная популяция В-клеток, являющаяся частью врожденной иммунной системы, которая продуцирует естественные антитела преимущественно IgM класса (Prieto J. M. B., Felipe M. J. B., 2017), распознающие аутоантигены, в частности, антигены с повторяющимися эпитопами (гликаны) (Montecino-Rodriguez E., Dorshkind K., 2012). Было продемонстрировано, что число и функциональная активность (чувствительность к митогенам) В-клеток, и В1-клеток, в частности, снижались в периферической крови беременных и в раннем послеродовом периоде, по сравнению с небеременными (Abu-Raya B. et al., 2020; Bhat N.M. et al., 1995). Наибольшее выражение этот эффект имел в третьем триместре (Abu-Raya B. et al., 2020; Lima J. et al., 2016), что свидетельствует о «физиологической» В-клеточной лимфопении (Pazos M. et al., 2012) вследствие влияния повышенного уровня эстрогенов на лимфопоэз (Abu-Raya B. et al., 2020). Установлено, что В-клеточный лимфопоэз подавляется на ранних сроках беременности, что выражается в сокращении популяции предшественников В-клеток в

костном мозге (Medina K. L., Smithson G., Kincade P. W., 1993). Однако имеются данные, что эстроген, повышает выживаемость и позитивно регулирует пролиферацию отдельных субпопуляций В-клеток. В частности, добавление эстрогена к первичной культуре моноклеарных клеток периферической крови человека *in vitro* увеличивает продукцию антител IgM и IgG в среде культивирования (Kanda N., Tamaki K., 1999). Введение эстрогена *in vivo* приводит к увеличению продукции патологических аутоантител у мышей с СКВ, что свидетельствует о влиянии эстрогена на развитие В-клеток, приводя к выживанию, размножению и активации определенных субпопуляций аутореактивных В-клеток и их роли в аутоиммунитете (Grimaldi C. M., Michael D. J., Diamond B., 2001). У мышей было выявлено снижение числа пре-/про- и незрелых В-клеток в костном мозге в период беременности. Этот показатель коррелирует со снижением содержания факторов активации В-клеток в крови. Итогом становится уменьшение количества В-клеток в крови и селезенке. Зрелых В-клеток, напротив, становится больше, и не только в костном мозге, но и в тканях, находящихся в тесном контакте с плодом: лимфатических узлах, дренирующих матку, и брюшной полости беременных мышей. Однако содержание общей фракции антител IgM, IgA и IgG₃ было повышено (Muzzio D.O. et al., 2014). Представленные данные свидетельствуют, что совокупные изменения иммунитета при беременности и, гормональные изменения, в частности, могут негативно регулировать развитие наивных В-клеток, одновременно усиливая выработку антител в зрелых В-клетках (Kraus T.A. et al., 2012). Однако данные во многом противоречивы, и необходимо более детальное исследование субпопуляций В-клеток при беременности. В контексте этого, был предложен подход к исследованию малых субпопуляций В-клеток крови, находящихся на разных стадиях дифференцировки, основанный на цитофлуориметрическом определении экспрессии маркеров CD19, CD38 и IgD (Зиганшина М.М., 2016; Demmert M. et al., 2012). Используя такой подход, в крови было идентифицировано пять субпопуляций зрелых В-клеток (V_m), которые были сопоставимы с субпопуляциями В-клеток миндалин и включали V_{m1}-клетки (наивные) и В-клетки памяти (Bohnhorst J. Ø. et al., 2001). Альтернативным подходом к классификации В-клеток памяти предложено определение экспрессии IgD и CD27 – (последний рассматривается как основной маркер клеток памяти) (Duchamp M. et al., 2014), а также CD27 и CD38 – маркера активации В-лимфоцитов (Prak E. T. L. et al., 2011). Распределение В-клеток по фенотипам в соответствующих классификациях описано в Таблице 2.

Таблица 2. Малые субпопуляции В-клеток периферической крови, определяемые на основании экспрессии маркеров CD19, CD38, CD27 и IgD (Bohnhorst J. Ø. et al., 2001; Duchamp M. et al., 2014; Prak E. T. L. et al., 2011).

	Определяемые кластеры дифференцировки	Фенотип субпопуляций В-клеток	Название субпопуляции
1	CD19, CD38, IgD	CD19 ⁺ CD38 ⁻ IgD ⁺	Bm1 девственно наивные
		CD19 ⁺ CD38 ⁺ IgD ⁺	Bm2 активированные наивные
		CD19 ⁺ CD38 ⁺⁺ IgD ⁺	Bm2' пре-GC
		CD19 ⁺ CD38 ⁺⁺ IgD ⁻ +	(Bm3 + Bm4) центробласты +
		CD19 ⁺ CD38 ⁺⁺ IgD ⁺	центроциты
		CD19 ⁺ CD38 ⁺ IgD ⁻	eBm5 ранние В-клетки памяти
		CD19 ⁺ CD38 ⁻ IgD ⁻	Bm5 поздние В-клетки памяти
2	CD19, CD27, IgD	CD19 ⁺ CD27 ⁻ IgD ⁺	В-клетки наивные
		CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgD ⁺	В-клетки памяти непереключенные
		CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgD ⁻	В-клетки памяти переключенные
		CD19 ⁺ CD27 ⁻ IgD ⁻	В-клетки двойные негативные
3	CD19, CD27, CD38	CD19 ⁺ CD38 ⁺⁺ CD27 ⁻	Транзиторные
		CD19 ⁺ CD38 ⁺ CD27 ⁻	Наивные зрелые
		CD19 ⁺ CD38 ⁺ CD27 ⁺	Активированные зрелые
		CD19 ⁺ CD38 ⁻ CD27 ⁺	Покоящиеся В-клетки памяти

В последние годы особое внимание исследователей уделяется изучению роли В(рег)-клеток (B10-клетки), экспрессирующих высокий уровень CD24, CD27 и/или CD38. Эта группа клеток регулирует и подавляет активацию клеток иммунной системы, за счет IL-10 (Iwata Y. et al., 2011). Идентифицированы различные субпопуляции В(рег)-клеток, функции которых пока не исследованы в полной мере (Rosser E. C. S., Mauri C., 2015). Установлено, что содержание В(рег)-клеток фенотипа CD19⁺CD24⁺CD27⁺ повышается в первом триместре беременности (Rolle L. et al., 2013), а B10-клетки фенотипа CD19⁺CD24⁺CD38⁺ снижаются в крови беременных в III триместре к родам, при сравнении с послеродовым периодом (Lima J. et al., 2016).

Однако роль В-клеток при беременности, главным образом, связывается с продукцией антител. В норме, при “беременности описаны антитела, относящиеся к естественным антителам, которые, как предполагается, осуществляют регуляторную функцию, контролируют воспалительные реакции” (Долгополова Е.Л., 2023), и ограничивают чрезмерную активацию иммунных клеток. В частности, выявлены антитела к высококонсервативным белкам, которые регулируют активацию эндотелиальных клеток

(Servettaz A. et al., 2008a; Servettaz A. et al., 2008b). Имеются данные, свидетельствующие о протективном влиянии естественных антител на фетоплацентарную систему и плацентарные сосуды, в том числе (Mendonça L. L. F. et al., 2000) ограничивающие влияние провоспалительных цитокинов на эндотелиальные клетки (Ronda N. et al., 2003). Предполагается, что естественные антитела могут связываться с высокопоморфными антигенами гистосовместимости фетальных клеток, защищая их от атаки эффекторных клеток матери (Mendonça L. L. F. et al., 2000), оказывая, вероятно, блокирующий эффект. Показано, что пациентки с высоким паритетом и гемотрансфузиями в анамнезе имеют антиидиотипические IgM, направленные к антигенам HLA. Эти антитела являются полиреактивными, и способны ингибировать связывание анти-HLA IgG (Urlacher A., Tongio M. M., Pasquali J. L., 2008). В целом, данные о регуляторных протективных антителах при нормальной беременности ограничены.

Необходимо отметить, что в последние годы достигнуты значительные успехи в изучении механизмов развития толерантности к плоду при беременности. Показана роль врожденного и адаптивного иммунитета, идентифицировано множество субпопуляций Т- и В-клеток, обладающих иммуносупрессорным эффектом, а также гуморальных факторов, действующих в плаценте и на системном уровне. Изучены и описаны молекулярные механизмы, действующие при межклеточном контакте, а также опосредованные гуморальными факторами дистантно. Однако, учитывая, что абсолютное большинство клеточных рецепторов и гуморальных факторов гликозилировано и гликозилирование влияет на лиганд-рецепторное взаимодействие и функции молекулы, имеется необходимость более широкого и комплексного изучения молекулярных механизмов с акцентом на роль гликанов в формировании толерантности к плоду и развитии патологии беременности.

1.2. Углевod-опосредованные иммунные механизмы, регулирующие развитие толерантности к аллоантигенам

Основными и нерешенными к настоящему времени проблемами, обуславливающими стабильно высокую частоту развития осложнений беременности во всем мире, являются: фрагментарность данных о молекулярных мишенях для клеточных и гуморальных факторов иммунитета, которые инициируют нарушения плацентации и процессы отторжения, а также отсутствие терапевтических подходов к коррекции этих нарушений. Охарактеризованы клеточные популяции, их фенотип и функции, известны

некоторые рецепторы, антитела и функционально активные белки, опосредующие эффекторные или регуляторные механизмы, но нет единой теории, описывающей развитие синдромов патологической беременности с позиции единого генеза, детерминированного иммунологическими проблемами и морфофункциональными нарушениями в фетоплацентарной системе. Наиболее перспективными гипотезами, получающими всё больше экспериментальных подтверждений и описывающими механизмы уклонения от иммунного надзора и механизмы межклеточных взаимодействий, являются: гипотеза фето-эмбриональной защиты – human fetoembryonic defence system (Hu-FEDS) (Clark G. et al., 1996; Dobrochaeva K. et al., 2020a; Pang P.-C. et al., 2016) и гипотеза “гликокода”(Dobrochaeva et al., 2020a; Jones, Aplin, 2009a). В обеих гипотезах гликаны позиционируются как ключевые факторы для межклеточных коммуникаций и формирования периферической и центральной толерантности; аллогенные клетки контактируют за счет углевод-белковых взаимодействий, при которых гликаны определяют принадлежность клеток к «своему» или «чужому». В результате такого контакта может быть подан сигнал о биологической опасности, активирована иммунная система или, напротив, торможение активного иммунного ответа с последующим развитием толерантности в отношении клеток и тканей, экспрессирующие «свои» гликаны (Мантрова Д.С., 2020).

1.2.1. Гликокод плаценты в норме и при патологии, его значение для морфогенеза и развития периферической толерантности

Беременность возможна благодаря осуществлению лиганд-рецепторных контактов между аллогенными клетками и развитию толерантности к отцовским аллоантигенам. Эти два аспекта неразрывно связаны, и локально создаваемое микроокружение, позволяющее адекватно развиваться новому органу - плаценте и подавляющее активный иммунный ответ, формируется благодаря этим лиганд-рецепторным взаимодействиям и последующим каскадным реакциям и процессам (Zimmermann W., Kammerer R., 2021). Для адекватных межклеточных контактов, которые инициируют толерогенные сигналы, а также пролиферацию и дифференцировку клеток в соответствии с генетической программой, необходимо наличие соответствующих рецепторов, условно называемых “правильными”, т.е. обеспечивающими взаимодействие с лигандом в контексте этой программы. Отклонение от генетически детерминированной программы происходит вследствие отсутствия, избыточной, или недостаточной экспрессии лигандов/рецепторов, или экспрессии измененных рецепторов, которые не обеспечивают формирование сигналов для

развития толерантности, а, напротив, способствуют запуску процесса активации иммунного ответа. Изменения часто являются посттрансляционными модификациями, и затрагивают углеводную часть рецептора или лиганда, которая, как известно, характеризуется большим разнообразием строения молекулы, особенностями конформации и химического состава (углеводный состав, последовательность соединения между собой моносахаридов, и др.). Различают N-связанные цепи гликанов (N-гликаны, в которых углеводные цепи связаны с белком по аминокислотам аспарагину и/или аргинину), часто представляющие собой разветвленные, массивные структуры (Dobrochaeva K. et al., 2020b) и O-цепи, в которых гликан связан с белковой молекулой по серину и/или треонину (Зиганшина М.М. и др., 2020; Hashii N., Ishii-Watabe A, 2018). Схема строения и разнообразие N-гликанов (Рисунок 2 А) и O-гликанов (Рисунок 2 Б).

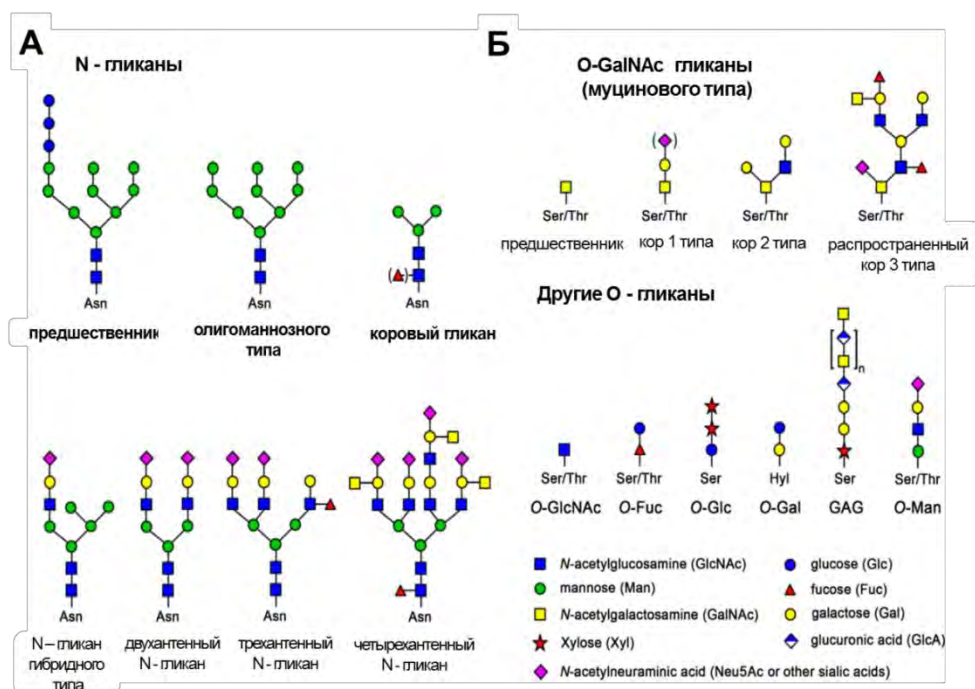


Рисунок 2. Схематическое представление N-гликанов (А) и O-гликанов (Б). N-гликаны, связанные с белком по аминокислоте аспарагину (Asn) демонстрируют разнообразие из-за множества возможных комбинаций разветвленных углеводных цепей. O-гликаны, связаны с белковой цепью по аминокислотам серину (Ser) и треонину (Thr). Распространенным типом O-гликанов является муциновый тип, который представлен группой GalNAc с добавляющимися остатками галактозы и сиаловыми кислотами. Связанные с O-ксилозой неразветвленные глюкозамингликаны (GAG) или протеоглики (PG) представляют большое и разнообразное семейство гликанов (Goettig P., 2016).

Согласно гипотезе «гликокода» гликаны, составляющие рецепторную часть “в молекулах гликолипидов и гликопротеинов на мембранах контактирующих аллогенных клеток в ключевых процессах репродукции – оплодотворении, имплантации, плацентации” (Долгополова Е.Л., 2023) – играют значительную и даже решающую роль в успешном

развитии нормальной беременности. Определенный гликотип (углеводный фенотип) контактирующих клеток должен соответствовать друг другу, и быть комплементарным, т.е. контактирующие клетки должны экспрессировать гликаны и углевод-связывающие белки, которые специфически связываются по принципу лиганд-рецепторного взаимодействия. Особенности гликозилирования, обусловлены различной экспрессией и активностью ферментов гликозилирования контактирующих аллогенных клеток. Эти особенности определяют развитие индивидуальных вариантов, когда опосредованные гликанами межклеточные взаимодействия способствуют успешной беременности, или развитию патологии, в частности, потерям беременности (Jones C.J. et al., 2000). В ряде вариантов такие взаимодействия осуществлены быть не могут, поскольку не соблюдается принцип комплементарности взаимодействия - подходящих лиганд-рецепторных пар не образуется, и оплодотворения, имплантации, плацентации не происходит. Экспериментальные наблюдения внутри- и межвидового скрещивания у плацентарных млекопитающих позволили сформулировать понятие о репродуктивной гликогенетике (Jones C. J. P., Arplin J. D. 2009a), согласно основным положениям которой, совокупность гликан-белковых взаимодействий является второй, не менее важной, чем HLA, системой межвидового распознавания.

1.2.2. Роль гликан-опосредованных межклеточных контактов в процессах морфогенеза плаценты

Гликан-опосредованные взаимодействия осуществляются между всеми типами клеток, которые формируют плаценту, но более изученными, в настоящее время, являются взаимодействия между популяциями трофобласта, ВКМ, клетками децидуальной оболочки (в том числе иммунными клетками), клетками эндотелия сосудов плаценты.

- ***Гликаны - регуляторы инвазии трофобласта***

Бластоциста “опознает” сайт прикрепления, и внедряется в эпителий матки вглубь эндометрия с последующей дифференцировкой трофобласта в две субпопуляции: синцитиотрофобласт и цитотрофобласт. Слой клеток, фиксированный к маточному эпителию пролиферирует с последующим слиянием двух типов аллогенных эпителиальных клеток и образованием многоядерных синцитиотрофобластических комплексов. Эти комплексы обладают высокоинвазивными свойствами, за счет продукции матриксных металлопротеиназ, при действии которых формируются сообщающиеся лакуны, заполненные кровью. Другая часть клеток трофобласта дифференцируется в одноядерный

цитотрофобласт, который пролиферирует и составляет основу клеточных колонн, погруженных в эти лакуны (Milovanov A. P., 2019). При ИГХ исследовании установлено, что трофобласты дистальных отделов цитотрофобластических колонн, которые на ранних сроках беременности являются аналогами ранних ворсин плаценты, под действием напряжения сдвига материнской крови интенсивно экспрессируют L-селектин и его углеводные рецепторы (Зиганшина М.М., 2016). Использование МАт, которые ингибируют активность либо рецептора, либо лиганда в модели формирования колонн клеток, выделенных из абортивного материала ранних сроков беременности, вызывало ингибирование формирования цитотрофобластических колонн, что свидетельствует о ключевой роли взаимодействия L-селектин – гликан в ранней плацентации. Предполагается, что взаимодействие L-селектин – гликан стимулирует выход трофобласта из клеточных колонн, дифференцировку его в вневорсинчатый трофобласт по механизму аутокринной регуляции (Зиганшина М.М., 2016), что является первой волной цитотрофобластической инвазии и основой для его инвазии в спиральные, и, далее, в радиальные артерии матки (Prakobphol A. et al., 2006).

Децидуальные клетки, клетки эндометриальных желез и субпопуляции иммунных клеток регулируют функции трофобласта и способствуют его инвазии и ремоделированию сосудов матки (Dobrochaeva K. et al., 2021). Инвазивность трофобласта регулируется взаимодействием неклассических малополиморфных молекул HLA, экспрессированных на его мембране, с иммуноглобулиноподобными рецепторами dNK-клеток, что определяет глубину и степень инвазии трофобласта и ремоделирование маточных спиральных артерий (Moffett A., Chazara O., Colucci F., 2017). Варианты молекул HLA-I, включая классический HLA-C и неклассический HLA-F, имеют общий высококонсервативный сайт N-гликозилирования на субъединице тяжелой цепи, однако состав углеводных цепей различен у разных молекул HLA. Особенностью α -цепи HLA-C и HLA-F является преимущественное содержание гликанов с высоким содержанием маннозы (Hoek M. et al., 2021). Наиболее структурно близкая к классическим молекулам HLA-I изоформа HLA-G1, экспрессируемая трофобластом, декорирована комплексными N-гликанами, содержащими цепи полилактозамина, который является лигандом большинства углеводсвязывающих белков галектинов (Гал-1, -3, -8 и -9) (Than N.G. et al., 2015). Функциональное значение полилактозаминовых цепей HLA-G в развитии всего спектра иммуносупрессивных эффектов, оказываемым трофобластом на клетки иммунной системы еще предстоит установить (Huang Z. et al., 2023), однако, предполагается, что гликаны молекулы HLA-G, как и других молекул HLA трофобласта выполняют не только функции стабилизации

молекулы, но и взаимодействуют с рецепторами иммунных клеток матери (Bhat N.M. et al., 1995). В ходе эксперимента было показано, что удаление сайта N-гликозилирования молекулы HLA-C уменьшает возможности ее распознавания иммуноглобулиноподобным рецептором 2DL1 (KIR2DL1) NK-клеток матери, а также опосредованное KIR2DL1 ингибирование лизиса NK-клеток (Зиганшина М.М., 2016; Baba E. et al., 2000).

На dNK-клетках соблюдается баланс экспрессии ингибирующих и активирующих рецепторов, что имеет ключевое значение для адекватного развития субпопуляций трофобласта в плаценте. Гликаны трофобласта не только регулируют его инвазивность, но также являются регуляторами активации dNK-клеток через взаимодействие с их лектиноподобными рецепторами. Экспериментально был установлен цитотоксический эффект dNK-клеток в отношении клеток трофобласта, экспрессирующих гликан сиалил-Льюис X (sLe^x), который был опосредован взаимодействием лектиноподобных рецепторов NK-клеток с этим гликаном (Higai K., Ichikawa A., Matsumoto K., 2006). Гетеродимерный лектиноподобный рецептор C-типа dNK-клеток CD94/NKG2 является ингибирующим рецептором (Hackmon R. et al., 2017; Kusumi M. et al., 2006) который способен взаимодействовать с рядом молекул HLA трофобласта, в частности с HLA-G и HLA-E, предотвращая цитотоксическую атаку (King A. et al., 2000; Söderström K. et al., 1997). Для изучения механизма, регулирующего активность dNK-клеток во время беременности, были исследованы паттерны экспрессии ингибирующего CD94/NKG2A и активирующего CD94/NKG2C рецепторов на dNK-клетках в ранние сроки нормальной беременности, а также произведено сравнение их с паттернами экспрессии на NK-клетках периферической крови, большинство из которых экспрессируют средний уровень кластера дифференцировки CD56 (CD56^{dim}) (Зиганшина М.М., 2016). Уровень экспрессии рецептора NKG2A клеток был значимо выше на децидуальных CD56^{bright}, чем на периферических CD56^{dim} NK-клетках, тогда как экспрессия NKG2C была сопоставима между этими субпопуляциями. Однако на периферических CD56^{dim} NK-клетках выявлена обратная зависимость экспрессии ингибирующих NKG2A и активирующих NKG2C рецепторов, в отличие от децидуальных CD56^{bright} NK-клеток, у которых зависимость между уровнем экспрессии этих рецепторов была прямая. Предполагается, что особенности экспрессии ингибирующих и активирующих рецепторов NKG2 могут определять иммунорегуляторные функции децидуальных NK-клеток для контроля инвазии трофобласта при развитии плаценты (Kusumi M. et al., 2006). Однако среди факторов, регулирующих активность dNK-клеток, значение имеет не только соотношение экспрессии рецепторов, но и экспрессия гликанов на клетках фетоплацентарной системы.

Эксперименты на модельных организмах мышей показали, что рекрутирование dNK-клеток в децидуальную ткань строго регулируется с момента имплантации, которая может быть нарушена при ЗРП и потере беременности. Изменениям гликотипа клеток децидуальной ткани сопутствует изменение числа dNK-клеток. Низкое число dNK-клеток коррелирует с высоким содержанием О- и N-связанных гликанов (в частности, с содержанием в их составе остатков сиаловых кислот) в эндотелиальном гликокаликсе сосудов децидуальной оболочки в период, предшествующий формированию плаценты. Переключение синтеза сиалогликанов с $\alpha 2,3$ -связанной на $\alpha 2,6$ -связанную сиаловую кислоту наблюдается в сосудах при скоплении dNK-клеток, что коррелирует со снижением плотности сосудов и воспалительными изменениями в ткани. К периоду плацентации установлено подавление экспрессии О-гликанов с кором типа 1 и остатками поли-N-ацетиллактозамина и повышение экспрессии разветвленных N-гликанов в гигантских клетках трофобласта и спонгиозотрофобласте (Freitag N. et al., 2014).

В гликокаликсе синцитиотрофобласта и инвазивного вневорсинчатого трофобласта, а также фетальном эпителии и мезотелии человека детектируется муцин MUC-1 – высокогликозилированный белок, углеводные цепи которого содержат гликан Томсена-Фриденрайха (антиген TF, О-связанный гликан с кором типа 1, Gal β 1-3GalNAc-), который экспрессируется обычно в тканях карциномы человека. В здоровых тканях взрослого человека TF-эпитопы выявляются крайне редко, главным образом в иммунологически привилегированных зонах (Jeschke U. et al., 2007). Методами ОТ-ПЦР в реальном времени, вестерн-блоттинга и иммуногистохимии показано, что экспрессия MUC1 в нормальной плаценте человека увеличивается с гестационным сроком, а также в эксперименте на клетках HTR8/SVneo установлен ингибирующий эффект повышенной экспрессии MUC1 на инвазию клеток хориокарциномы в матрикеле (Зиганшина М.М., 2016). При тяжелой ПЭ мРНК *MUC1* и содержание муцина MUC1 было значительно повышено в синцитиотрофобласте и инвазивном трофобласте по сравнению с нормой соответствующего гестационного срока. Гиперэкспрессия MUC1 ингибирует активность $\beta 1$ -интегрина и фосфорилирование киназы фокальной адгезии (Shyu M.-K. et al., 2011). Показано, что гликаны (сиалогликаны и маннозобогатые N-цепи) опухолеассоциированного высокогликозилированного гликопротеина TAG72 (Hanisch F.-G. et al., 1989; Laskarin G. et al., 2011), влияют на статус зрелости децидуальных АПК в плаценте и синтез толерогенных цитокинов, что способствует переключению на Th2-опосредованный гуморальный ответ, который характеризуется как защитный в отношении аллоантигенов плода (Redzovic A. et al., 2013).

Для гемохориальной плацтации характерна глубокая инвазия клеток трофобласта в ткань матки: трофобласт обнаруживается в децидуальной оболочке эндометрия и даже в миометрии (Soares M. J., Varberg K. M., Iqbal K. 2018). Но определяющей стадией плацтации является инвазия эндovasкулярного трофобласта в спиральные артерии/артериолы матки с замещением эндотелия сосудов на трофобласт, и изменением фенотипа клетки с эндотелиального на эпителиальный (Зиганшина М.М., 2016; Schust D.J. et al., 2021). Во время инвазии происходит дифференцировка трофобласта, сопровождающаяся экспрессией молекул, которые опосредуют взаимодействия с внеклеточным матриксом (ВКМ), в том числе, интегринов (Borowski S. et al., 2020). При плацтации происходит интенсивное ремоделирование ВКМ, что в комплексе с дифференцировкой и изменением фенотипа инвазивного трофобласта создает микроокружение, способствующее плацтации. В частности, на клетках цитотрофобласта оснований якорных ворсин экспрессируется интегрин $\alpha\beta4$ (рецептор ламинина). При дифференцировке вневорсинчатого трофобласта образуются колонны клеток, экспрессирующие интегрин $\alpha5\beta1$ (рецептор фибронектина); за счет этого в среде, богатой фибронектином, создаются условия для формирования межклеточных контактов. Высокоинвазивный трофобласт, мигрирующий из цитотрофобластических колонн внедряясь в маточные сосуды интенсивно экспрессирует $\alpha1\beta1$ (рецептор коллагена/ламинина) и продолжает экспрессировать $\alpha5\beta1$, но экспрессия $\alpha\beta4$ завершается к этой стадии.

Установлено, что активность ферментов гликозилирования и, соответственно, их продуктов, играет критическую роль в морфогенезе плаценты. Биологические функции интегринов регулируются разветвленными N-гликанами, связанными с $\beta1$ субъединицей, в частности, двухантенным GlcNAc (бис-GlcNAc), остатком $\beta1,6$ -GlcNAc, и коровыми (т.е. внутренними, связанными с белком) остатками фукозы ($\alpha1,6$ -фукоза), которые являются ферментативными продуктами N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnT-III), N-ацетилглюкозаминилтрансферазы V (GnT-V) (Зиганшина М.М., 2016) и альфа-1,6-фукозилтрансферазы (FUT8), соответственно. Причем при гликозилировании интегринов с участием GnT-III миграция клеток ингибируется. Напротив, гликаны интегринов, синтезированные с участием гликозилтрансферазы GnT-V, способствуют миграции клеток. Фукозилирование в коре также имеет ключевое значение для интегрин-опосредованной миграции клеток и передачи сигналов (Yamamoto E. et al., 2009; Zhao Y. et al., 2008).

Отмечается важная роль фермента GnT-V и его продукта – бисектного $\beta1,6$ -GlcNAc-терминированного гликана в морфогенезе плаценты, поскольку он регулирует инвазивные

свойства трофобласта посредством модификации олигосахаридных цепей интегрин $\alpha 5 \beta 1$. Экспрессия GnT-V отмечена в разных типах инвазивного трофобласта человека: высокая - в цитоплазме инвазивного трофобласта цитотрофобластических колонн, ниже - в инвазивном трофобласте, пенетрирующем децидуальную оболочку (Yamamoto Y. et al., 2009). Экспрессия GnT-V в трофобласте имеет максимально высокий уровень на ранних сроках беременности, и критически снижается в трофобласте зрелой нормальной плаценты. Эти наблюдения совпадают с представлениями о максимально инвазивном потенциале трофобласта, соответствующем двум фазам инвазии в ткань матки и спиральные артерии, а также подтверждаются установленной прямой корреляционной зависимостью между уровнем экспрессии GnT-V и инвазивными свойствами опухоли (ее потенциалом к метастазированию) (Tomii M. et al., 2005). При выкидышах характерна низкая экспрессия GnT-V и его продукта $\beta 1,6$ -GlcNAc и высокая экспрессия фермента GnT-III и его продукта бис-GlcNAc, по сравнению с нормальной плацентой (Zhang M. et al., 2015).

Также критическим для функции $\beta 1$ -интегринов является активность N-ацетилгалактозаминилтрансферазы 2 (GALNT2), которая катализируют первую стадию биосинтеза O-гликанов, и переносит остатки GalNAc на Ser/Thr с образованием гликана Tn ($\text{GalNAc}\alpha\text{-Ser/Thr}$) (214). Гликан Tn присутствует в составе гликанов $\beta 1$ -субъединицы интегринов (Зиганшина М.М. и др., 2020). При исследовании экспрессии ферментов O-гликозилирования обнаружено, что мРНК *GALNT1* и *GALNT2* детектируется в высоком уровне в клетках линии HTR8/SVneo и первичной культуре клеток инвазивного трофобласта первого триместра. Так, GALNT2 экспрессируется в субпопуляциях клеток инвазивного трофобласта в децидуальной ткани, но отсутствует в синцитиотрофобласте и цитотрофобласте ворсин плаценты. Количество инвазивных GALNT2-позитивных трофобластов увеличивалось со сроком беременности. Сверхэкспрессия GALNT2 в клетках HTR8/SVneo значительно усиливала адгезию клеток к коллагену IV, но подавляла миграцию и инвазию клеток в эксперименте *in vitro*. Установлено, что высокая экспрессия GALNT2 коррелирует с повышением экспрессии гликана Tn на $\beta 1$ -субъединице интегрин и подавляет фосфорилирование киназы фокальной адгезии (FAK) - важнейшей сигнальной молекулы $\beta 1$ -интегрин (Зиганшина М.М. и др., 2017а; Liao W.-C. et al., 2012). Необходимо отметить, что GALNT2 регулирует пролиферацию, миграцию и инвазию клеток через сигнальный путь EGFR/PI3K/AKT/mTOR (Sun Z. et al., 2019), что свидетельствует о его влиянии на лиганд-рецепторное взаимодействие ключевых регуляторных молекул с их рецепторами, и функционирование основных сигнальных путей клетки (Зиганшина М.М., 2016). Эти данные свидетельствуют, что активация GALNT2 и биосинтез гликана Tn могут

иметь ключевое значение для регуляции инвазии трофобласта в спиральные артерии в разные сроки беременности.

Кроме описанных выше ферментов гликозилирования, имеются данные о регуляторной роли фермента B4GALT3 (β -1,4-галактозилтрансферазы III) в регуляции инвазии клеток. Установлено, что стимуляция экспрессии B4GALT3 в эксперименте на клетках линии HTR8/SVneo и первичной культуре трофобласта значительно подавляла миграционный потенциал клеток. На культуре клеток HTR8/SVneo было продемонстрировано, что гиперэкспрессия B4GALT3 подавляла инвазию и усиливала адгезию клеток к ламинину. В норме в плаценте человека по мере увеличения срока гестации значимо повышается экспрессия B4GALT3, который, предположительно, является важнейшим регулятором подавления инвазивных свойств трофобласта на поздних сроках беременности (Liao W.-C. et al., 2015).

- *Гликаны – регуляторы взаимодействия рецепторов клеточной поверхности с лигандами*

Помимо гликанов, связанных с HLA и молекулами клеточной адгезии (регулируют межклеточные взаимодействия в ходе инвазии трофобласта и перестройки спиральных артерий), важную функцию выполняют гликаны, которые входят в состав рецепторов клеточной поверхности и имеют ключевое значение для развития, роста плаценты и регуляции ее функций, что было кратко упомянуто выше. Рецепторы (эпидермальный фактор роста (EGFR) (Clemente L., Bird I. M., 2023; Reiter J. L., Maihle N. J., 2003), рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR) (Nevo O., Lee D. K., Caniggia I., 2013), рецептор инсулинсвязывающего фактора роста (INSR), рецептор инсулиноподобного фактора роста (IGFR) (Masnikosa R. et al., 2006) и др., относятся к рецепторными тирозинкиназам, экспрессируются в плаценте, и выполняют ключевые функции в морфогенезе и развитии ее сосудистой сети. Эти рецепторы имеют множественные сайты N- и O-гликозилирования. Гликозилированы также Fas, DR4, DR5, регулирующие процессы запрограммированной клеточной смерти – апоптоза. Их углеводная часть участвует в регуляции лиганд-рецепторного взаимодействия и равновесия между гибнущими в результате апоптоза и выживающими клетками (Gao Y. et al., 2021; Gomes Ferreira I. et al., 2018). По данным литературы, трисиализованные четырехантенные олигосахариды, фукозилированные на восстанавливающем конце N-ацетилглюкозамина, а также олигоманнозные цепи гликанов обнаруживаются в составе N-цепей EGFR (Smith K.D. et al., 1996). Показано, что функциональная активность EGFR зависит от гликозилирования (Gomes Ferreira I. et al.,

2018), в частности, N-гликаны стабилизируют сайт связывания EGFR, и обеспечивают прочные взаимодействия EGFR с лигандом (Azimzadeh Irani M., Kannan S., Verma C., 2017). Экспериментально подтверждено, что использование N-гликозидазы F вызывает удаление N-цепей рецептора, и устраняет его связывание с FGF, что свидетельствует о необходимости N-гликанов для осуществления функции FGFR (Feige J. J., Baird A., 1988). Схожие данные получены для TGFR II, который экспрессируется клетками эмбриональных и опухолевых линий, и имеет в составе сложные и олигоманнозные структуры N-гликанов: показано, что его чувствительность к TGF β снижается после применения ингибиторов N-гликозилирования (Zhang J. et al., 2021).

Известно, что EGFR в периоды интенсивного роста и формирования структур плацентарного барьера гиперэкспрессируется в нормальной плаценте (Clemente L., Bird I. M., 2023) и его связывание с EGF способствует пролиферации и дифференцировке трофобласта, а также осуществляет протекцию трофобласта от апоптоза (Morrish D. W. et al., 1987). Предполагается, что при ПЭ сигнальная трансдукция с участием EGFR нарушается, в частности, снижается передача сигналов EGF/EGFR при парадоксальном увеличении экспрессии EGFR в плаценте (Moslehi R. et al., 2013). Объяснения этому пока не найдено, но, по-видимому, этот эффект может быть связан с особенностями углеводной части EGFR, а именно ее влиянием на снижение функциональной активности рецептора вследствие изменений гликозилирования и, как следствие – влияния этих изменений на дифференцировку трофобласта и нарушения морфогенеза сосудистой сети при ПЭ. В *in vitro* экспериментах на культивируемых эндотелиальных клетках артерий матки (UAEC), которые экспрессируют EGFR, было показано, что дисфункция эндотелия может быть опосредована EGFR. Установлено, что повышенная экспрессия EGFR на клетках, которая достигается при помощи внедрения аденовирусного вектора, приводит к локализации рецептора в тех участках мембраны, где он обычно отсутствовал, что вызывает активацию сигнальных каскадных реакций, ассоциированных с EGFR, и подавлением реакций, опосредуемых VEGFR2. Предполагается, что переключение сигнальных реакций с VEGF2/VEGFR2 на EGF/EGFR нарушает ангиогенез плаценты и способствует развитию эндотелиальной дисфункции (Clemente L. et al., 2020). В контексте влияния гликозилирования на ангиогенез предполагается, что изменения экспрессии гликанов, ассоциированных с VEGFR2 – ключевым ангиогенным фактором, углеводная часть которого представлена сложными, гетерогенными N-гликанами, связанными по нескольким сайтам гликозилирования с белковой молекулой, может влиять на развитие капиллярной сети плаценты (Dobrokhotova Y.E. et al., 2021; Helske S. et al., 2001). N-гликаны

VEGFR2 -сложные олигоманнозные, гиперсиалирированные и фукозилированные цепи, с разным количеством остатков сиаловой кислоты.

Подтверждением широкой распространенности олигоманнозных N-гликанов в плаценте, в том числе, имеющих гибридные и сложные цепи с высоким содержанием терминальных сиаловых кислот является их присутствие в составе высокогликозилированных рецепторов инсулина (IR) и инсулиноподобного фактора роста (IGF-R1, IGF-R2), которые регулируют развитие плаценты и плода (Masnikosa R. et al., 2006). Методом лектиновой гистохимии установлено, что в плацентах разного гестационного срока выявлены разнонаправленные изменения общего количества фукозилированных в коре биантенных N-гликанов, N-гликанов терминированных остатками α 2,6-сиаловой кислоты, ассоциированных с IR, IGFR1 и IGFR2, что связано с функциональными изменениями плаценты в первом и третьем триместрах и отражает генетически детерминированное изменение паттернов гликозилирования ключевых рецепторов в плаценте (Абдурахманова Н.Ф., 2020; Robajac D. et al., 2016a). Терминальные остатки сиаловой кислоты предположительно участвуют в активации рецептора инсулина (IR) при связывании инсулина (Dridi L. et al., 2013). Доказано, что нейраминидаза, ассоциированная с клеточной мембраной, вызывает десиалилирование IGFR1 и снижает передачу сигналов, индуцированных IGFR2 (Hinek A. et al., 2008). Степень сиалирования N-гликанов была признана критическим фактором, который может вызывать временные изменения функций гликопротеинов (Pshezhetsky A. V., Ashmarina L. I., 2013).

Особое значение для морфогенеза плаценты и развития толерантности имеет лиганд-рецепторная система TGF/TGFR, в регуляции которой ключевую роль выполняют О-гликаны, в частности, остатки N-ацетилгалактозамина, а также терминальные остатки α 2,6-сиаловой кислоты (Lu J. et al., 2014; Lu J. et al., 2014). Установлено, что фермент GALNT4 участвует в биосинтезе О-гликанов TGFR I и TGFR II. Снижение экспрессии GALNT4 в клетках рака молочной железы приводило к усилению миграции и инвазии раковых клеток, в то время как гиперэкспрессия - вызывала противоположный эффект. В экспериментальных исследованиях показано, что нокаут GALNT4 приводит к усилению димеризации рецепторов и активации сигналинга через TGFR (Wu Q. et al., 2021), а гена ST6GAL1 (β -галактозид α 2,6-сиалилтрансфераза, катализирующая присоединение терминальных α 2,6-связанных сиаловых кислот в N-цепях) (Зиганшина М.М., 2016) в эпителиальных клетках линии GE11 - к подавлению TGF β -индуцированного эпителиально-мезенхимального перехода, что свидетельствует о ключевой роли гликанов, синтезируемых этими ферментами в контроле активации TGFR (Lu O. et al., 2014). Эти данные

демонстрируют, что изменение содержания критически важных гликанов, ассоциированных с TGFR меняет его способность к взаимодействию с лигандом, что искажает генетически детерминированную программу, в частности, сигнальной трансдукции, и может приводить к нарушениям морфогенеза и функционирования органа. Поскольку TGF β является мультифункциональной молекулой, которая регулирует пролиферацию, дифференцировку клеток, а также развитие толерантности к аллоантигенам, изменения экспрессии ассоциированных с ним гликанов может оказывать системное воздействие как на морфогенез плаценты, так и на механизмы формирования периферической толерантности к плоду при осложненной беременности.

- *Гликаны – регуляторы основных механизмов толерантности к аллоантигенам плода*

Кроме морфогенеза, не менее важным аспектом, является участие гликанов в процессах развития толерантности к плоду. Один из примеров, в частности, значение О-гликозилирования для функционирования лиганд-рецепторной системы TGF/TGFR, описывался выше. Апоптоз, как механизм, регулирующий численность активированных клеток и клеток, несущих образы опасности/патогенности, также вносит существенный вклад в развитие толерантности. Гликозилирование влияет на индукцию сигналов апоптоза, так как рецепторы клеточной гибели гликозилированы и содержат N- и О-связанные гликаны (Gomes Ferreira I. et al., 2018). Углеводная часть молекул Fas и TRAIL-R может инициировать или ингибировать апоптотические сигналы. Установлено, что чувствительность рецепторов к лиганду регулируется терминальными остатками галактозы (Gal-) посредством их взаимодействия с галектинами, что усиливает проведение сигналов апоптоза (Хасбиуллина Н.Р., 2019; Seyrek K., Richter M., Lavrik I. N., 2019). N-гликаны белка Fas являются субстратами для бета-галактозид альфа-2,6-сиалилтрансферазы 1 (ST6Gal I). Показано, что присутствие остатков терминальных α 2,6-связанных сиаловых кислот в составе N-гликанов Fas ингибирует Fas-опосредованный апоптоз (Gao Y. et al., 2021; Swindall A. F., Bellis S. L., 2011):

В регуляции апоптоза, инициируемого молекулами из группы фактора некроза опухоли, ключевую роль выполняют фукогликаны и О-гликаны рецепторов (Haltiwanger R.S., 2009; Jiang Y. et al., 2020). В частности, у рецептора DR5 имеются О-гликаны содержащие от одной до четырех цепей Gal β 1-3GalNAc (Т-антиген), в составе которых присутствуют не более двух остатков сиаловой кислоты, имеющие решающее значение для кластеризации DR5 и индукции апоптоза. Вследствие ингибирования синтеза О-цепей с

образованием гликанов Tn или sialyl-Tn наблюдается снижение их чувствительности к TRAIL и ослабление проведения сигнала, ведущего к апоптозу клетки (Jeon M.-Y. et al., 2019; Jiang Y. et al., 2020). Фукозилрование DR4 и DR5 опухолевых клеток осуществляют фукозилтрансферазы: FUT3 (α 3,4-фукозилтрансфераза) и FUT6 (α 1,3-фукозилтрансфераза). Нокдаун FUT6 в клетках опухолей снижает чувствительность клеток к TRAIL (Wagner K.W. et al., 2007). Гиперэкспрессия FUT3 и FUT6, напротив восстанавливает чувствительность TRAIL посредством фукозилрования гликанов DR5 (Wagner K.W. et al., 2007; Zhang B. et al., 2019). TNF α -индуцированный апоптоз регулируется активностью фермента β 1,4-Gal-трансферазы I (B4GALT1), катализирующей синтез сложных N-гликанов (Yuan Q. et al., 2012). Подавление ее экспрессии ингибирует TNF α -индуцированный апоптоз; гиперэкспрессия – ведет к усилению апоптоза через активацию сигнальных путей ERK, JNK и MAPK, в частности, в клетках Шванна (Yang H. et al., 2011).

Отмечается особая роль сиалирования в регуляции функции рецептора клеточной гибели TNFR1 (TNFRSF1A) (Liu Z. et al., 2011), углеводные цепи которого являются субстратом для ST6Gal I в клетках моноцитарного ряда. Гиперэкспрессия ST6Gal I в макрофагах предотвращала TNF α -активированный TNFR1-опосредованный апоптоз, который восстанавливался после воздействия нейраминидазы (Зиганшина М.М., 2016). При длительной гиперэкспрессии ST6Gal I в клетках рака поджелудочной железы и яичников развивается устойчивость к TNF α -индуцированному апоптозу, предотвращающему активацию каспаз 8 и 3 (Holdbrooks A. T., Britain C. M., Bellis S. L., 2018). Активация каспаз может быть усилена, если удалить α 2-6-связанные остатки сиаловой кислоты с помощью α 2-3,6,8-нейраминидазы из *Arthrobacter ureafaciens* (Alexander K.L. et al., 2020), что указывает на участие α 2-6-сиалилирования N-гликанов в регуляции TNF α -индуцированного апоптоза.

В аспекте влияния гликоконъюгатов, которые являются составной частью гуморальных факторов биологических жидкостей организма, необходимо отметить значение углеводной составляющей на биологический эффект молекулы. В частности, гормоны, продуцируемые трофобластом, являются гликопротеинами. Установлено, что хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) и человеческий плацентарный лактоген (hPL) (Aisagbonhi O., Morris G. P., 2022) влияют на местные иммунные реакции в плаценте через взаимодействие их углеводной части с эндогенными лектинами иммунных клеток и клеток репродуктивного тракта. ХГЧ, выделенный из мочи беременных, содержит бисектные N-гликаны, в состав которых входит sLe^X (Ibeto L. et al., 2020). Показано, что человеческий ХГЧ, выделенный из мочи беременных в концентрациях, значительно ниже выявляемых из

крови, *in vitro* ингибирует цитотоксическую активность периферических NK-клеток в отношении NK-чувствительных клеток эритролейкемии линии K562 (Sulke A. N., Jones D. B., Wood P. J., 1985). Отмечается влияние гликозилирования на биологическую активность молекулы гликоделина – регуляторного белка, продуцируемого эндометриальными железами и децидуальным железистым эпителием (Seppälä M. et al., 2007), который способен регулировать синтез гормонов трофобластом (Jeschke U. et al., 2005). Гликоделин участвует в развитии плаценты уже с ранних стадий посредством своего модулирующего эффекта на иммунные клетки и трофобласт. Он ингибирует пролиферацию и активацию Т-клеток и индуцирует их апоптоз (Зиганшина М.М. и др., 2020). Избирательно вызывая гибель клеток Th1, гликоделин смещает соотношение Th1/Th2 в фето-плацентарной системе в сторону последнего (Lee C.-L. et al., 2011a). Это также достигается за счет усиления экспрессии молекулы Fas в Th1-клетках, что делает их уязвимыми для апоптоза через FasL, экспрессируемого на трофобласте, эндометриальных и активированных Th клетках. Гликоделин также способствует секреции цитокинов Th2-спектра NK-клетками: IL-6 и IL-13 и индуцирует развитие толерогенных ДК и апоптоз моноцитов (Зиганшина М.М., 2016; Lee C.-L. et al., 2011b; Uchida H. et al., 2013).

1.2.3. Особенности гликотипа плаценты в норме и при патологии беременности

Основные методы исследования гликотипа клеток и структур плаценты - лектиновая гистохимия и иммуногистохимия, позволяют детектировать отдельные углеводные группы в составе сложных N- и O-гликанов или отдельные короткие цепи O-гликанов. Этими методами были изучены особенности состава, строения и распределения гликанов в составе базальной и апикальной (гликокаликс) клеточных мембран (Зиганшина М.М. и др., 2020), а также во внутриклеточных компартментах клеток, составляющих ткани и структуры промежуточных и терминальных ворсин зрелой нормальной плаценты человека (Зиганшина М.М., 2016). Установлено, что в норме в цитоплазме синцитиотрофобласта выявляется слабая экспрессия остатков N-ацетилглюкозамина (GlcNAc-), галактозы или N-ацетилгалактозамина (Gal-/GalNAc-), тогда как в гликокаликсе - высокая экспрессия остатков GalNAc- и GlcNAc- и единичные участки экспрессии остатков сиаловых кислот (Passaponti et al., 2021). В цитотрофобласте выявляется экспрессия остатков GlcNAc- и Gal/GalNAc-. В эндотелии фетальных капилляров наблюдается интенсивное окрашивание лектинами остатков маннозы и галактозы, а также экспрессия типичных для эндотелия других отделов сосудистой системы сиалогликанов и фукогликанов. В гликокаликсе клеток Хофбауэра экспрессируется высокий уровень остатков GlcNAc (Tatsuzuki A. et al., 2009).

Также было продемонстрировано, что гликокаликс синцитио- и цитотрофобласта близок по составу: в небольшом количестве, в составе гликокаликса этих структур выявлены N-гликаны, терминированные полилактозамином, но в изобилии экспрессируются маннозобогатые N-гликаны и N-гликаны комплексного типа, которые представлены фукозилированными двухантенными гликанами, содержащими бисектный N-ацетилглюкозамин (Зиганшина М.М. и др., 2020; Chen Q. et al., 2016; Nishima W. et al., 2012). Большинство гликанов гликокаликса терминировано остатками $\alpha 2,3$ -сиаловой кислоты (Chen Q. et al., 2016). Экспериментально было показано, что двухантенные N-гликаны подобного типа подавляют цитотоксичность периферических NK-клеток *in vitro* (Ouagari K. E., Teissié J., Benoist H., 1995; Schust D.J. et al., 2021), что, вероятно, объясняет устойчивость синцитиотрофобласта к атаке NK-клеток.

Знания о гликотипе плаценты в норме значительно расширились благодаря исследованию углеводной части гликопротеинов, выделенных из ткани плаценты женщин первого и третьего триместров нормальной беременности, и идентифицированных с помощью обширного набора лектинов, присутствующих на чипе (лектинового эррея). Установлено, что N-гликом мембраны клеток и структур плаценты содержит высокоманнозные, асиалилированные и сиалилированные биантенные бисектные фрагменты; фрагменты с фукозой в коре, а также фукозилированные в других положениях (несущие концевые и/или антенные остатки Fuc), $\alpha 2,6$ - и $\alpha 2,3$ -сиалозиды. Использование MALDI-TOF масс-спектрометрии позволило идентифицировать более шестидесяти различных структур N-гликанов. Высокопредставленными в МС-спектрах являются: 1) двухантенные N-гликаны комплексного типа с бисектным остатком GlcNAc; 2) маннозобогатые структуры с фукозой в коре. Причем отмечалось, что факторами, влияющими на представленность гликанов, являются возраст матери и срок развития плаценты (Robajac D. et al., 2019).

При патологии беременности выявляются различные особенности содержания и распределения гликоконъюгатов в тканях плаценты. В частности, снижение, по сравнению с нормой, содержания терминальных остатков фукозы (с помощью LTA) и Gal $\beta 1,3$ GalNAc-мотива и повышение остатков Fuc $\alpha 1,2$ - (с помощью UEA-I) и GalNAc- установлено в плацентах пациенток как с легкой формой снижения инсулинорезистентности к глюкозе, так и с гестационным сахарным диабетом. Причем в последнем случае также выявляется снижение $\alpha 2,6$ -сиалозидов и повышение остатков GlcNAc- (Chen Q. et al., 2016).

При осложнениях беременности, связанных с патологией плацентации, выявляется измененный профиль экспрессии гликанов, что коррелирует с морфофункциональными изменениями плаценты и степенью тяжести заболевания. В частности, в ткани плаценты пациенток с ПЭ и ПЭ, осложненной HELLP-синдромом, выявляется снижение и/или отсутствие остатков маннозы, β -галактозы и GlcNAc- по сравнению с плацентой пациенток с гестационной артериальной гипертензией и нормальной беременностью. У пациенток с ГРБ в плаценте выявляется повышенная экспрессия остатков GalNAc-, а также отличное от нормы распределение различных типов сиаловой кислоты (Зиганшина М.М. и др., 2022а; Marini M. et al., 2011).

При тяжелой ЗРП, характеризующейся аномальным кровотоком (отсутствие или обратный поток крови) в артерии пуповины на сроках 29-37 недель беременности установлено снижение или полное отсутствие остатков маннозы, N-ацетил-D-глюкозамина, бета-N-ацетил-D-галактозамина, фукозы в гликокаликсе трофобласта и эндотелия фетальных капилляров ворсин плаценты по сравнению с нормой соответствующего гестационного срока. Также выявлялись качественные и количественные изменения гликанов клеток Хофбауэра при ЗРП (Мантрова Д.А., 2020). Исследователи предполагают, что подобные изменения негативной сказываются на росте и развитии плаценты, что неизбежно приводит к снижению эффективности газообмена и обмена метаболитов между организмами матери и плода (Sgambati E. et al., 2002).

В зрелой плаценте пациенток с осложненной беременностью (ПЭ, ЗРП и HELLP-синдром) методом ИГХ была проведена детекция гликанов, которые являются составной частью рецепторов селектинов (сиалил-Льюис А (sLe^A), sLe^X), а также гликана Льюис Y (Le^Y). Экспрессия гликана sLe^X выявлена во вневорсинчатом трофобласте и синцитиотрофобласте всех исследованных случаев; экспрессия sLe^A ограничена эпителием амниона. Установлено значимое снижение экспрессии sLe^X во вневорсинчатом трофобласте при ЗРП и умеренное снижение при ПЭ по сравнению с нормальными плацентами; в синцитии значимых различий не выявлено. Значимое повышение экспрессии Le^Y выявлено в цитотрофобласте и эндотелии ворсин плаценты при ЗРП и HELLP-синдроме (Зиганшина М.М. и др., 2022а); для ПЭ было характерно повышение плацентарной экспрессии этого гликана по сравнению с неосложненной беременностью. Результаты свидетельствуют, что снижение экспрессии гликана sLe^X во вневорсинчатом трофобласте связано с нарушениями кровотока при ПЭ и ЗРП (Minas V. et al., 2007).

Гликан Le^Y , который является ангиогенным фактором, активируется в ворсинах плаценты при состояниях, связанных с неправильной перфузией плаценты (Minas V. et al., 2007). Для поиска маркеров физиологической и патологической незрелости ворсинчатого дерева плаценты было проведено динамическое исследование экспрессии гликана Льюис X (Le^X) в нормальных плацентах разного гестационного срока и зрелых плацентах позднего гестационного срока пациенток с ПЭ, ЗРП, HELLP-синдромом и гестационным сахарным диабетом. Выявлено выраженное окрашивание анти- Le^X антителами эндотелия незрелых нормальных плацент и зрелых плацент пациенток с патологией беременности (Зиганшина М.М., 2016; Seidmann L. et al., 2014). Значимое снижение экспрессии Le^X коррелировало с морфологическими признаками зрелости ворсин плаценты при физиологическом и ускоренном созревании ворсин в норме и при ГСД, соответственно. Утверждается, что высокая экспрессия Le^X эндотелием является диагностическим маркером патологической фетоплацентарной незрелости (Ravikumar G. et al., 2019).

Исследование мембранных N-гликанов методом DSA-FACE, который позволяет идентифицировать сложные разветвленные N-гликаны, показало значительные изменения N-гликома плаценты при ПЭ осложненной ЗРП. Выявлено снижение фукозилированных и высокоманнозных гликанов, и напротив, повышение количества полиманнозных структур и структур с сокращенным числом маннозных остатков. Исследование гликозилирования функциональных мембранных рецепторов, регулирующих рост и развитие плода: рецептора инсулина и рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 типа (IR и IGF1R) показало снижение $\alpha 2,6$ -сиалозидов, связанных с IR в плаценте беременных с ПЭ в сочетании с ЗРП. (Robajac D. et al., 2016b).

Т.о., в соответствии с описанными выше фактами, гипотеза гликокода является молекулярной основой для понимания основных принципов, описанные в п.1.1.1., в соответствии с которыми происходит развитие периферической толерантности к аллоантигенам плода. Она указывает на гликаны и гликан-зависимые молекулярные механизмы, которые укладываются в описанную выше схему и способствуют снижению иммуногенности фетальных клеток, их иммунорегуляторному взаимодействию с клетками матери, что реализуется в развитии толерогенных фенотипов иммунных клеток матери, экспансии регуляторных клеток, стимуляции синтеза и секреции гуморальных факторов, протективных в отношении развивающегося плода. Несмотря на то, что описанные выше факты относятся к локальным взаимодействиям аллогенных клеток в плаценте, они инициируют изменения, которые носят системный характер. Однако гипотеза гликокода более обоснована для процессов морфогенеза плаценты и развития периферической

толерантности к плоду, и ее выводы носят больше локальный характер. Более целостное и универсальное описание многообразия процессов в иммунной и репродуктивной системах, основанных на углевод-белковых взаимодействиях, продемонстрировано в основных положениях гипотезы фето-эмбриональной защиты (FEDS).

1.2.4. Центральная и периферическая толерантность при беременности: обоснование с позиции гипотезы фето-эмбриональной защиты (FEDS)

Углево-белковые взаимодействия изначально были изучены в инфекционной иммунологии и иммунологии опухолей как взаимодействия, инициирующие эффекторные реакции при распознавании паттернов патогенности углеводной природы, которые в изобилии представлены на мембране возбудителей бактериальных и вирусных инфекций, и при изучении механизмов карцерогенеза и метастазирования (Зиганшина М.М. и др., 2019; Clark G.F., 2014). “Основываясь на этих данных, была обоснована гипотеза развития толерантности к аллоантигенам плода (Clark G.F. et al., 1996), поскольку патогены, а также опухолевые и фетальные клетки используют похожие механизмы для уклонения от иммунной системы, за счет имитации или биосинтеза тех же функциональных групп углеводов, которые маскируют их биологическую метку “чужой”, представляющую опасность для организма на метку “свой”, что предотвращает иммунный ответ” (Мантрова Д.А., 2020; Clark G.F. et al., 2001; Clark G.F., Schust D.J., 2013; Kui Wong N. et al., 2003).

Гипотеза фето-эмбриональной защиты основана на том, что гликаны, которые экспрессируются на клетках органов репродуктивной системы, в том числе и плаценты, и секретируются в составе биологических жидкостей, ингибируют потенциально агрессивный иммунный ответ организма матери против гамет и фетальных антигенов. Ингибирование осуществляется за счет: 1) блокирования специфических активирующих сигнальных взаимодействий - в частности, идентифицированы нейтральные N-гликаны олигоманнозного и гибридного типа, выделенные из трофобласта, которые блокируют аллогенное распознавание в фетоплацентарной системе; 2) синтеза “измененных” гликанов, что является одним из механизмов, маскирующих фетальные антигены от атаки материнской иммунной системы (Зиганшина М.М. и др., 2017а; Arkwright P.D. et al., 1994); 3) связывания с эндогенными лектинами (лектинами С-типа, галектинами, сиглеками), локализованными на иммунных клетках. Действие описанных механизмов приводит к активации сигнальных путей, влияющих на передачу ингибирующих сигналов; достигаемый при этом иммуномодулирующий эффект в фетоплацентарной системе способствует формированию толерантности к плоду как на системном уровне, так и в

плаценте при физиологической беременности (Clark G.F., Schust D.J., 2013; Pang P.-C. et al., 2016).

Гипотеза фето-эмбриональной защиты не является альтернативой существующим представлениям, а напротив, дает возможность нового взгляда на известные факты, поскольку указывает на конкретные молекулярные мишени и их рецепторы на иммунных клетках, значение которых для толерантности к фетальным антигенам обосновано как в предшествующие годы, так и в настоящее время. В частности, установлено, что:

- основные белки беременности и гормоны – α -фетопrotein, хорионический гонадотропин и гликоделин являются высокогликозилированными гликопротеинами, которые оказывают иммуномодулирующий эффект при беременности; их функциональная активность зависит от числа сайтов гликозилирования и состава гликанов молекулы, которые часто имеют уникальную структуру (Fournier T., Guibourdenche J., Evain-Brion D., 2015; Lee C.-L. et al., 2009; Pang P.-C. et al., 2016; Toftager-Larsen K., 1990) (было рассмотрено выше);

- молекулы HLA гликозилированы и гликаны могут обуславливать их разнообразие (Clark G.F., Schust D.J. 2013; Marino F. et al., 2015; McMaster M. et al., 1998), а также взаимодействие с рецепторами на иммунных клетках, т.к. установлено, что полилактозаминные остатки молекулы HLA-G обеспечивают связывание с ILT2, ILT4, KIR2DL4, CD8, CD160 (Pang P.-C. et al., 2016) (подробно освещено выше).

- большинство рецепторов иммунной системы относятся к углеводсвязывающим белкам – эндогенным лектинам, взаимодействие с которыми регулирует баланс между энергией и иммунным ответом на аллоантигены плода. В частности, рецептор DC-SIGN дендритных клеток, а также рецепторы CD94/NKG2 естественных киллерных клеток и CD8⁺ Т-лимфоцитов относятся к семейству лектинов С-типа, т.е. взаимодействие клеточных рецепторов с мишенями проходит по углевод-зависимому механизму (Зиганшина М.М., 2016)(подробно освещено ниже).

1.2.5. Общая характеристика основных семейств эндогенных лектинов организма

Углевод-белковые взаимодействия опосредуются углевод-связывающими белками, к которым относятся антигликановые антитела и эндогенные лектины. Последние представлены тремя семействами, члены которых экспрессированы на различных клетках

(но большинство - на клетках иммунной системы). Семейства эндогенных лектинов включают:

1) лектины С-типа – члены семейства MR (маннозный рецептор), DEC-205, DC-SIGN, MGL, Langerin, Dectin-1, Dectin-2, селектины (Е-селектин, Р-селектин, L-селектин) и др. Лектины С-типа специфически связываются с гликоконъюгатами двух типов: а) маннозо- (Man) и/или фукозо- (Fuc-) терминированными гликанами; б) галактозо- (Gal-) или N-ацетилгалактозамино- (GalNAc-) терминированными гликанами. Лектины С-типа представлены на макрофагах, ДК, NK-клетках, лейкоцитах. Они осуществляют функции паттернраспознающих рецепторов (PPRs), сигналинга и адгезии (Brown G. D., Willment J. A., Whitehead L., 2018; Kooyk Y. van, 2008). Обрами патогенности/опасности для них являются гликоконъюгаты – бактериальные липо-олигосахариды, пептидогликаны, а также молекулы образованные в результате повреждения ткани – фрагменты гиалуронана или гликозаминогликаны протеогликанов внеклеточного матрикса (ВКМ) и гликокаликса клетки (Varki A., 2011). Лектины С-типа являются трансмембранными рецепторами, которые связаны с ITAM- или ITIM-мотивами в цитоплазматической части молекулы, благодаря чему происходит проведение активирующего или ингибирующего сигнала в иммунные клетки и осуществляется регуляция иммунного ответа (Geijtenbeek T. B. H., Gringhuis S. I., 2009; Lepenies B., Lee J., Sonkaria S., 2013). Наиболее изученные молекулы, относящиеся к лектинам С-типа: селектины и рецепторы клеток миелоидного ряда (маннозосвязывающие рецепторы DEC-205 и маннозный рецептор CD206); дектин-1 и дектин-2, DC-SIGN (CD209), лангерин (CD207) (Erlebacher A., 2013b). Ярким примером углево-белковых взаимодействий с участием лектинов С-типа служит воспалительная реакция, центральным событием которой является контакт между лейкоцитами и эндотелием, с последующей миграцией иммунных клеток в очаг воспаления (Зиганшина М.М., 2016). Установлено, что все стадии воспалительной реакции опосредуются гликанами: роллинг лейкоцитов на эндотелии опосредуется взаимодействием Е-, Р- и L-селектинов с гликоконъюгатами, которые имеют терминальные остатки sLe^x (Golias C. et al., 2007); стадия прочной адгезии регулируется N-связанными гликанами ICAM-1, которые имеют особенности состава углеводной цепи, что определяет и опосредует взаимодействие ICAM-1 с лигандами семейства интегринов - Mac-1 и LFA-1 (Diamond M.S. et al., 1991; Stenqvist A.-C. et al., 2013; Wright R. D., Cooper D., 2014); молекулы, опосредующие трансмиграцию лейкоцитов - PECAM-1, JAM-1, ICAM-2 и VE-кадгерин – высокогликозилированы и предполагается роль гликанов в этом процессе (Зиганшина

M.M., 2016; Feduska J.M. et al., 2013; Lertkietmongkol P. et al., 2016; Sasaki N., Toyoda M., 2013; Scott D.W. et al., 2015).

2) сиглеки – лектины, специфически связывающие гликаны с терминальной сиаловой кислотой. В настоящее время семейство включает 17 членов, из которых 14 экспрессируются у человека (Зиганшина М.М., 2016; Macauley M. S., Crocker P. R., Paulson J. C., 2014). Общего лиганда для всех сиглеков не выявлено: отдельные члены семейства предпочтительно связываются с α 2-3, α 2-6 и/или α 2-8-связанными сиаловыми кислотами, или предпочтительно с N-ацетилнейраминовой кислотой (Neu5Ac) или N-гликолилнейраминовой кислотой (Neu5Gc) (Gonzalez-Gil A., Schnaar R. L., 2021). Лигандами сиглеков также служат гликаны сиалил-Tn (Neu5Ac α 2,6-GalNAc α -) и 6' сульфатированный sLe^X, причем последний также важен для селектин-опосредованной клеточной адгезии (Gonzalez-Gil A., Schnaar R. L., 2021; O'Sullivan J. A., Carroll D. J., Bochner B. S., 2017). Большинство членов этого семейства являются ингибиторными рецепторами. За счет связи молекулы сиглека в цитоплазматической части с тирозинсодержащей аминокислотной ингибирующей последовательностью (ITIM), осуществляется проведение ингибирующего сигнала в клетку (Crocker P. R., Varki A., 2001; Pillai S. et al., 2012). Сиглеки экспрессируются, главным образом, на иммунных клетках (Higuma-Myojo S. et al., 2005) и участвуют в негативной регуляции/ограничении чрезмерного активационного ответа при воспалительной реакции, инициируемой распознаванием pathogen-associated molecular patterns — (PAMPs) и damage-associated molecular patterns (DAMPs) (Hinek A. et al., 2008; Rosenstock P., Kaufmann T., 2021). Наличие терминальной сиаловой кислоты несет особый биологический смысл для организма (формирование общего отрицательного заряда клеточной поверхности, стабилизация конформации гликоконъюгатов, защита гликоконъюгатов и клеток от узнавания и деградации). Защитные свойства сиалирования проявляются не только во взаимодействии сиалированных структур с ингибиторными рецепторами, но и в маскировании остатков сахаров, являющихся антигенными детерминантами (Schauer R., 2000). Так, при десиалировании открываются остатки Gal β -, GalNAc-, маннозы, осуществляя взаимодействия с лектинами семейства галектинов и лектинами C-типа (Varki A., Gagneux P., 2012), значимые при метастазировании и развитии системного воспалительного ответа (СВО). Сиглеки осуществляют регуляцию клеточной пролиферации, дифференциации, апоптоза, адгезии, синтеза цитокинов, негативную регуляцию В-клеточного сигналинга (Зиганшина М.М., 2016; Duan S., Paulson J. C., 2020; Tsubata T., 2022).

Некоторые молекулы способны, подобно аутоантителам, взаимодействовать с собственными, неизменными антигенами (гликанами) организма, так называемыми собственными образами (SAMPs- self-associated molecular patterns) (Belisle J.A. et al., 2010; Paulson J. C., Macauley M. S., Kawasaki N., 2012; Varki A., 2011). В качестве собственных образов чаще всего выступают молекулярные паттерны, содержащие сиаловую кислоту и гепарин/гепаран сульфат (Varki A., 2011). Установлено, что в подобных взаимодействиях участвуют сиглеки, в частности, сиглек-8 и сиглек-10, которые связываются с этими SAMPs, что оказывает ингибирующее действие на иммунный ответ и поддерживает иммунный гомеостаз организма (Зиганшина М.М., 2016; Duan S., Paulson J. C., 2020; Varki A., 2011).

3) галектины – семейство включает 19 членов, из которых 13 идентифицировано у человека (Jovanović Krivokuća M. et al., 2021). Они содержат один или два высококонсервативных углевод-связывающих домена и являются секретируемыми белками (Laderach D.J. et al., 2009; Wright R. D., Cooper D., 2014). Галектины связываются преимущественно с галактозидами (β -Gal-терминированными гликанами), в первую очередь в составе N-ацетиллактозамина LacNAc- и полилактозамина гликопротеинов и гликолипидов клеточной поверхности и ВКМ (Hattori T., 2022; Nobumoto A. et al., 2008; Norling L. V., Perretti M., Cooper D., 2009). Галектины депонируются в цитоплазме многих типов иммунных и стромальных клеток, включая эндотелиальные клетки и эпителиальные клетки слизистой оболочки, кератиноциты, фибробласты и др., которые мигрируют в места проникновения патогенных микроорганизмов или любых объектов, несущих сигнал чужеродности или опасности (Зиганшина М.М., 2016). Несмотря на высококонсервативную природу углевод-связывающего домена галектинов, имеются тонкие, но значительные различия между членами семейства в аффинности связывания галектинов с углеводными лигандами, что еще не исследовано в полной мере. Отличительной особенностью галектинов от других углевод-связывающих белков является то, что, кроме зависимых от углеводов взаимодействий с внеклеточными гликоконъюгатами, также могут проявляться их независимые от углеводов взаимодействия с мишенями в цитозольном или ядерном компартментах клетки (Hattori T., 2022). Часть галектинов поливалентны за счет двух углевод-связывающих доменов (Гал-3,-4,-8,-9,-12), что позволяет им сшивать углеводные лиганды на мембране клетки, и приводит к образованию галектиновых решеток на клеточной поверхности, индуцирующих активацию сигнальных путей в клетке и эндоцитоз лигандов. Галектины вовлечены в многочисленные процессы жизнедеятельности клеток – регуляцию клеточного цикла, миграцию, передачу межклеточных сигналов, выполнение

эффекторных функций, апоптоз, иммунорегуляцию (Cedeno-Laurent F., Dimitroff C. J., 2012). Галектины могут как позитивно (Гал-3, Гал-8, Гал-9), так и негативно (Гал-1) регулировать воспалительную реакцию (Зиганшина М.М., 2016; Johannes L., Jacob R., Leffler H., 2018).

1.2.6. Регуляторные взаимодействия функциональных углеводных групп гликоконъюгатов с рецепторным аппаратом иммунных клеток на локальном и системном уровнях

Ведущую роль в распознавании и взаимодействии с экзо- и эндогенными гликоконъюгатами, которые являются составной частью образов патогенности и образов опасности, активирующих иммунную систему, имеют патоген распознающие рецепторы (PRRs): и лектины С-типа (CTLs), о которых упоминалось выше, и Толл-подобные рецепторы (TLRs) (Marongiu L. et al., 2019). PRRs экспрессированы на клетках врожденного иммунитета, которые участвуют в иммунном реагировании при воспалительной реакции, развивающейся как при воспалении с наличием инфекционного агента, так и в отсутствие такового (при “стерильном” воспалении) (Зиганшина М.М., 2016). Причем, если при инфекции PRRs связываются с PAMP (патоген-ассоциированными молекулярными паттернами) вирусов и бактерий, в которых в избытке присутствуют гликоконъюгаты (маннопротеины, β -глюканы и др.), то при “стерильном” воспалении паттерны для связывания PRRs образуются в результате ремоделирования ВКМ, в котором в избытке имеются структуры гликанов, а также в результате формирования неоантигенов, которые могут формироваться при активации воспалительной реакции даже в ткани нормальной плаценты.

- *Толл-подобные рецепторы (TLRs)*

Наиболее изучены и охарактеризованы – TLRs, которых описано, к настоящему времени, 13 членов. Среди всех TLRs, основными рецепторами, взаимодействующими с гликоконъюгатами, являются TLR2 и TLR4, которые экспрессируются моноцитами, макрофагами и миелоидными ДК. В тканях плаценты экспрессия TLR2 локализована в цито- и синцитиотрофобласте и в децидуальных стромальных клетках (Зиганшина М.М. и др., 2019) и повышается при воспалении (Rindsjö E. et al., 2007). Экспрессия TLR4 выявлена во вневорсинчатом и промежуточном трофобласте, клетках Хофбауэра ворсин нормальной и патологической плаценты (Amirchaghmaghi E. et al., 2013); в эндотелиальных клетках сосудов терминальных ворсин плаценты при внутриутробной инфекции, вызванной

грамотрицательными бактериями (Wang X., Athayde N., Trudinger B., 2005); в децидуальных макрофагах при ПЭ (Bernardi F. C. B. et al., 2012). Рецепторы TLR2 – пептидогликан грамположительных бактерий и различные бактериальные гликолипиды. TLR4 взаимодействует с более широким спектром гликан-содержащих лигандов. Основным лигандом TLR4 является липополисахарид (ЛПС) – основной компонент внешней мембраны грамотрицательных бактерий (Park B. S., Lee J.-O., 2013). ЛПС состоит из липидов и углеводов с высоким уровнем структурной сложности. Его основными компонентами являются: О-антиген (О-полисахаридные цепи различной длины, уникальны для каждого штамма бактерий), коровый олигосахарид и липид А (основная активность ЛПС) (Marongiu L. et al., 2019). Кроме PAMPs, TLR4 связывается с углеводными фрагментами ВКМ – протеогликанами и гликозаминогликанами (бигликаном, фрагментами гиалуроновой кислоты и гепарансульфата) (Molteni M., Gemma S., Rossetti C., 2016). При взаимодействии PAMPs с TLRs активируются сигнальные каскады, которые приводят к продукции медиаторов воспаления (Beutler B.A., 2009; Olejnik J., Hume A. J., Mühlberger E., 2018).

- Лектины С-типа

К лектинам С-типа относится значительное число PRRs. В частности, маннозный рецептор (MR, CD206) – лектин С-типа, экспрессированный на макрофагах и ДК, который распознает концевые остатки маннозы, фукозы, N-ацетилглюкозамина, а также ряд сульфатированных гликанов, в том числе сульфатированный sLe^X и sLe^A (также являются высокоаффинными рецепторами селектинов), что позволяет ему эффективно связывать антиген при воспалительном процессе. Т.к. MR одновременно относится к эндоцитарным рецепторам, он участвует в выведении гликоконъюгатов, высвобождаемых в кровотоке при патологии, за счет клатрин-зависимого эндоцитоза, что позволяет транспортировать связавшиеся гликоконъюгаты с мембраны в эндосому. MR детектируется в плаценте человека (Lennartz M.R. et al., 1987). В нормальной плаценте на доношенном сроке выявлялось дессиминированное распределение MR в тканях плаценты. На ранних сроках MR присутствует на децидуальных мононуклеарных клетках, преимущественно на макрофагах, которые концентрируются около маточных желез. Высокогликозилированный муцин TAG-72 (ассоциированный с опухолью гликопротеин-72), который экспрессируется в эпителии матки, снижал поглощение FITC-декстрана децидуальными макрофагами. Предполагается, что MR^+ макрофаги, окружающие децидуальные железы, способны интернализировать гликаны, включая TAG-72, способствуя элиминации апоптотических или стареющих клеток и ремоделированию тканей (Laskarin G. et al., 2005). Имеются данные,

указывающие на то, что связывание MR с соответствующим лигандом в составе гликопротеинов может приводить к запуску противовоспалительной и толерогенной программы в ДК (Chieppa M. et al., 2003), резидентированных в том числе в тканях плаценты, что стимулирует продукцию Th2-цитокинов и обеспечивает нормальное развитие беременности (Chaouat G. et al., 2003; Laskarin G. et al., 2005).

При инфекционном воспалении, связывание патогена с MR ведет к его поглощению макрофагами и продукции провоспалительных цитокинов. Установлено, что MR экспрессируется гигантскими клетками трофобласта мыши и участвует в макрофагоподобном захвате ими бактерий *Listeria monocytogenes* (индуцирующих самопроизвольный выкидыш), а также *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli* (не индуцирующих самопроизвольный выкидыш). Причем нокдаун у мышей по гену MRC1 или обработка клеток IFN- γ увеличивала временной промежуток для созревания фаголизосом. Предполагается, что этот эффект повышает патогенное влияние бактерий в плаценте и имеет ключевую роль в патогенезе самопроизвольного выкидыша (Hashino M. et al., 2012).

Ключевой молекулой для развития толерантности в фетоплацентарной системе является DC-SIGN (CD209). DC-SIGN также относится к семейству лектинов C-типа, экспрессируется макрофагами и ДК и специфически связывается с маннозосодержащими N-гликанами и фукогликанами Le^A, Le^B, Le^X, Le^Y и сульфо-Le^A (Feinberg H. et al., 2001), которые входят как в состав PAMPs многих патогенов, так и гликопротеинов человека (ICAM-2, ICAM-3, Mac-1, канцерозембриональный антиген, бутирофилин, липаза, миелин олигодендроцитов и кластерин спермы и др.) (Garcia-Vallejo J. J., Kooyk Y. van., 2013). Индукция толерогенных свойств DC-SIGN осуществляется посредством синергической стимуляции TLR4, что активирует экспрессию и секрецию IL-10, вызывает торможение пролиферации Т-клеток и стимуляцию дифференцировки T(рег)-клеток (Зиганшина М.М., 2016). В эксперименте показано, что при трансплантации органов от нокаутных мышей с двойным дефицитом ферментов фукозилтрансферазы 4 (FucT-IV) и фукозилтрансферазы 7 (FucT-VII) и отсутствием α 1,3-фукозилированных гликанов в аллогенном трансплантате, отсутствует индукция CD209⁺зависимой продукции IL-10. У CD209^{-/-} мышей не происходила аккомодация трансплантата из-за отсутствия продукции IL-10, необходимого для развития периферической толерантности (Garcia-Vallejo J. J., Kooyk Y. van., 2015). Результаты, полученные в экспериментах, позволяют позиционировать CD209 как молекулу, необходимую для поддержания периферической толерантности и иммунного гомеостаза (Brown G. D., Willment J. A., Whitehead L., 2018). Однако, отмечаются роль DC-SIGN в презентации антигена и иммунном ответе, в частности при вакцинации (Tacke P.

J. et al., 2005; Unger W.W.J. et al., 2012). Вследствие двойственной роли DC-SIGN в иммунной системе предполагается, что баланс между толерантностью и иммунным ответом определяется особенностями микроокружения CD209⁺ДК, в частности особенностями гликозилирования контактирующей клетки (Garcia-Vallejo J. J., Kooyk Y. van., 2015).

Кроме MR и DC-SIGN децидуальные лейкоциты плаценты экспрессируют и другие лектины С-типа. Так, количество M2-макрофагов фенотипа CD163⁺CD206⁺ увеличивалась ко второму триместру беременности, по сравнению с первым. Число промежуточных CD205⁺ДК, экспрессирующих лектин С-типа DEC-205, значимо снижалось к этому сроку, но количество незрелых CD209⁺ДК (DC-SIGN⁺клеток) и зрелых CD83⁺ДК не отличалось между триместрами. Предполагается, что эти особенности фенотипического состава ДК способствуют формированию толерогенного микроокружения в децидуальной ткани в середине беременности (Kwan M. et al., 2014). Исследование локализации антигенпрезентирующих клеток в плаценте, выполненное ИГХ-техникой показало, что клетки Хофбауэра с фенотипом CD163⁺, CD68⁺, CD45⁺, HLA-A,B,C⁺, CD209⁺, DC-LAMP/CD208⁻, CD86⁻, Langerin/CD207⁻, FXIIIa⁻, CD1a⁻, который подтверждает их макрофагальную природу, располагались в ворсинах хориона ниже синцитиотрофобласта и вблизи капилляров плода. Эти DC-SIGN⁺ клетки показали наряду с отсутствием экспрессии HLA-DR, -DP, -DQ экспрессию рецептора гиалуроновой кислоты LYVE-1. Децидуальная оболочка содержала субпопуляцию клеток фенотипа CD45⁺CD163⁺, DC-SIGN⁺, CD68⁺, HLA-DR⁺, HLA-A,B,C⁺. Зрелые ДК не выявлялись в доношенной плаценте человека. Содержание многочисленных DC-SIGN⁺клеток в ворсинах хориона в норме подтверждает иммунопривилегированный статус плаценты (Böckle B.C. et al., 2008), тогда как их снижение выявляется при патологии (Yang S.W. et al., 2017a).

Как уже указывалось выше, гликаны опосредуют все стадии воспалительной реакции. В частности, селектины, обеспечивающие начальные стадии взаимодействия лейкоцитов с эндотелием, взаимодействуют не только с гликоконъюгатами, терминированными остатками sLe^x, но и с гликанами в составе гепаран сульфата эндотелиального гликокаликса. Гликан 6-сульфо-sLe^x, который выступает в роли терминальной группы N-гликанов и О-гликанов муцинового типа, является лигандом L-селектина в специализированном эндотелии высокоэндотелиальных венул (HEV) (Ziganshina M.M. et al., 2018a). Молекула ICAM-1, имеет несколько сайтов N-гликозилирования. Mac-1 связывается с более высокой авидностью с ICAM-1, в которой N-гликаны представлены более короткими и простыми цепями, поскольку связывание с лигандом увеличивается после использования DMJ (дезоксиманножиримицина) –

ингибитора α -маннозидазы. Напротив, LFA-1 связывается с высокой аффинностью с гликоформами ICAM-1, которые имеют сложные N-гликаны, что свидетельствует о регуляции стадии прочной адгезии лейкоцитов гликозилированием молекулы ICAM-1 (Ziganshina M.M. et al., 2018a). Экспрессия молекул клеточной адгезии (Adu-Gyamfi E.A. et al., 2021; Dye J.F. et al., 2001; Sahin H. et al., 2014; Uszyński M., Uszyński W., Żekanowska E., 2008), их углеводных лигандов (гликана sLe^X, в частности) выявляется в тканях и структурах плаценты - вневорсинчатом трофобласте и синцитиотрофобласте как в норме, так и при патологии беременности (Ma Z. et al., 2021; Minas V. et al., 2007). Их функции в плаценте включают не только участие в воспалительной реакции, но и межклеточных контактах при морфогенезе органа, что определяет исключительную важность гликотипа плаценты для нормального течения беременности.

- Сиглеку

Значение сиглеков в формировании толерантности к собственным аутоантигенам, опухолям и некоторым патогенным бактериям показано в различных исследованиях. Интерес к ним обусловлен экспрессией на иммунных клетках и взаимодействием с функциональными остатками сиаловых кислот, активацией негативного сигналинга через цитозольные иммунорецепторные мотивы на основе тирозина (ITIM), что отрицательно регулирует иммунный ответ. Значительно меньше сиглеку исследованы в механизмах толерантности к плоду, и ограниченное число работ посвящено их детекции в тканях плаценты. Однако установлено, что протекция фетальных клеток от атаки иммунных клеток матери обеспечивается за счет экспрессии определенных паттернов поверхностного гликозилирования синцитиотрофобласта и ворсинчатого цитотрофобласта (Зиганшина М.М., 2016). Эти паттерны являются составной частью гликокаликса - входят в состав N- и O-цепей мембранных гликопротеинов, и действуют как щит, защищая фетальные клетки от проявления цитотоксичности, опосредованной НК-клетками. В состав таких паттернов, входит сиаловая кислота, и имеются данные об участии сиглека-9 в процессе уклонения от цитотоксических атак иммунных клеток (Belisle J.A. et al., 2010).

В норме в трофобласте выявляется соэкспрессия сиглека-6 и его углеводных лигандов – сиалогликанов (в частности, сиалил-Tn, Sia α 2–6Gal-NAc α 1-). Причем уровень экспрессии сиглека-6 был низким в плаценте после планового кесарева сечения и высоким после самопроизвольных родов. Однако для сохранения состояния толерантности и, напротив, инициации акта родов логично предположить обратную картину экспрессии сиглека-6 (Brinkman-Van der Linden E. C. M. et al., 2007). К аналогичным выводам подводит

исследование, в котором выявлена повышенная экспрессия сиглека-6 в плаценте беременных с ПЭ (Rumer K.K. et al., 2013; Stefanski A.L. et al., 2022; Winn V.D. et al., 2009). Поскольку предполагается, что сиглек-6 является сигнальной молекулой в трофобласте человека и негативная регуляция иммунных реакций в плаценте, осуществляемая сиглеками необходима для торможения родовой деятельности и сдерживания иммунных реакций на аллоантигены, необходимы дальнейшие исследования феномена сверхэкспрессии сиглека-6 при указанных состояниях. Поскольку в этих исследованиях не проводилось одновременной количественной детекции сиалогликанов, вероятно, особенности их экспрессии могут прояснить этот феномен. Имеются сообщения о повышенном содержании в ткани плаценты при ПЭ неклассической молекулы сиглек-6, а сиглек-6, которая имеет особенности гликозилирования, что, вероятно, влияет на ее функциональную активность (Зиганшина М.М., 2016). Это является альтернативным объяснением феномена сверхэкспрессии сиглека-6 при ПЭ, поскольку в нормальной плаценте абберантно гликозилированная форма сиглека-6 отсутствует (Awoyemi T. et al., 2020).

Методами ИГХ и иммунофлуоресценции установлено, что высокогликозилированный муцин CD24, который имеет сайты N- и O-гликозилирования, содержащий фукозилированные гликаны и гликаны сиалированные в различных положениях галактозы и N-ацетилгалактозамина (Ohl C. et al., 2003), (в частности, в его составе присутствует $\alpha 2,3$ -связанная сиаловая кислота и sLe^X (Lieberoth A. et al., 2009)), детектируется в тканях плаценты первого триместра. Выявлена высокая экспрессия CD24 в ворсинчатом и вневорсинчатом цитотрофобласте, умеренная – в стромальных клетках, и отсутствие - в синцитиотрофобласте. Совместная локализация CD24 и сиглека-10 выявлялась в железах эндометрия, децидуальных клетках, цитотрофобласте, в непосредственной близости от вневорсинчатого трофобласта. Коэкспрессия и селективное взаимодействие сиалогликопротеина CD24 и сиглека-10 подавляет активацию T-клеточного рецепторного комплекса и TLR-сигналинга, которые обычно активируются образами патогенности и образами опасности, что способствует формированию толерантности к аллоантигенам (Sammar M. et al., 2017).

Взаимодействие гликан-сиглек не только регулирует активность иммунной системы, но и межклеточные взаимодействия при плацентации. В экспериментах *in vitro* установлено, что высокогликозилированный белок гликоделин-A (GdA), синтезируемый децидуальной тканью, гликоформы которого имеют в своем составе сиалогликаны (Lee C.-L. et al., 2009), подавляет инвазию клеточных линий трофобласта посредством снижения

экспрессии и активности протеиназы. GdA подавляет фосфорилирование ERKs и экспрессию c-Jun, компонента белка-активатора фактора транскрипции-1 (AP-1) (Lam K. K. W. et al., 2009). Независимыми методами было доказана ключевая роль связывания сиглека-6 с GdA в подавлении инвазии трофобласта, поскольку десиаилирование GdA и использование анти-сиглек-6 антител снижает сродство GdA к сиглеку-6, экспрессируемому трофобластом, и активность белка путем подавления сигнального пути ERK/c-Jun (Lam K. K. W. et al., 2011).

• Галектины

Различные популяции трофобласта на границе матери и плода экспрессируют целый комплекс галектинов, что указывает на их важную роль во взаимодействиях аллогенных клеток и участие в морфогенезе плаценты, в частности в регуляции миграции и инвазии трофобласта, что осуществляется посредством их взаимодействия с белками ВКМ и подтверждено на первичных культурах и инвазивных клеточных линиях трофобласта (Kolundžić N. et al., 2011a; Wang M. et al., 2021a). Экспрессия Гал-1, -3, -8, -13, -14 и -16 регулируется в процессе морфогенеза, и зависит от дифференцировки трофобласта, причем экспрессия Гал-13, -14, -16 характерна исключительно для плаценты (Than N. G. et al., 2009). Специфичность галектинов определяется их консервативным углеводсвязывающим доменом, который у большинства галектинов связывается с лактозамином и полилактозаминовыми структурами гликанов. Однако их специфичность не охарактеризована в полной мере, и физиологические лиганды многих галектинов неизвестны, что создает определенную проблему при интерпретации данных, поскольку галектины являются биологически активными молекулами с широким спектром действия на клетки. Функции галектинов изучены как в экспериментальных, так и в клинических исследованиях (Таблица 3).

Таблица 3. Функции* галектинов в норме и при патологии беременности (из (Barrientos G. et al., 2014; Jovanović Krivokuća M. et al., 2021; Kolundžić N. et al., 2011a; Tang M. et al., 2018; Tirado-Gonzalez I. et al., 2013 с модификациями)

Процесс/Патология	Функция
Исследование влияния галектинов на функцию первичной культуры трофобласта нормальной плаценты и трофобластоподобн	- Гал-1: взаимодействует с цитотрофобластом первого триместра, регулирует инвазивные процессы, пролиферацию и дифференцировку трофобласта, а также экспрессию трофобластом иммунорегуляторных молекул (HLA-G) и продукцию гормонов - Гал-3: позитивно регулирует процессы миграции, инвазии и синцитиализации клеток трофобластоподобных клеточных

Процесс/Патология	Функция
ых клеточных линий при моделировании плацентации	линий и первичной культуры цитотрофобласта первого триместра; стимулирует ангиогенез - Гал-7: снижает адгезивные свойства клеток первичной культуры трофобласта первого триместра и клеток линии HTR-8/SVneo прикрепляться к эпителиальным клеткам эндометрия, ингибирует рост вневорсинчатого трофобласта первого триместра из плацентарных эксплантатов - Гал-9: выделенный из клеток трофобласта, способствует развитию иммунной толерантности на границе плода и матери; ингибируя проапоптотические сигналы и Th1-продукцию цитокинов трофобластоподобными клетками и повышает их адгезию к эндотелию - Гал-13: при моделировании вызывает гибель активированных Т-клеток и макрофагов, выделенных из децидуа, индуцирует регуляторный фенотип нейтрофилов, которые стимулируют пролиферацию различных клеточных популяций плаценты, включая азвитие сосудов плаценты - Гал-14: <i>in vitro</i> регулирует миграцию и инвазию трофобласта, продукцию ферментов ремоделирования матрикса, жэкспрессию молекул клеточной адгезии, регулирует ангиогенез плаценты
Изменение экспрессии галектинов в плаценте и содержания в крови при ПЭ по сравнению с нормой	- Гал-1: при поздней ПЭ выявляется гиперэкспрессия в основных структурах плаценты (трофобласте, строме ворсин, плацентарных макрофагах, эндотелии); при ранней ПЭ выявляется гипоекспрессия Гал-1 в синцитиотрофобласте и децидуа низкий уровень Гал-1 в сыворотке во втором триместре является риском развития ПЭ; доля Т- и НК-клеток периферической крови, экспрессирующих Гал-1, снижается у беременных с ПЭ, по сравнению с нормой - Гал-2: снижен уровень экспрессии в вневорсинчатом трофобласте; снижено содержание в крови - Гал-3: содержание в периферической крови и уровень экспрессии Гал-3 в тканях плаценты (вневорсинчатом трофобласте и цитотрофобласте) повышены - Гал-7: уровень в сыворотке крови выше - Гал-9: при ранней ПЭ в лимфоцитах периферической крови выявлено повышение экспрессии Гал-9 - Гал-13: при рПЭ и пПЭ снижен уровень экспрессии Гал-13 в ткани плаценты; при рПЭ и пПЭ уровень экспрессии Гал-13 повышен в мембране микроворсинок синцитиотрофобласта; низкий уровень Гал-13 в крови в первом триместре является прогностическим фактором развития ПЭ
Изменение экспрессии галектинов в плаценте и содержания в крови	- Гал-1: выявляется низкая экспрессия в плаценте и низкое содержание в крови - Гал-2: выявляется низкая экспрессия в плаценте беременных, вынашивающих плод мужского пола

Процесс/Патология	Функция
при ЗРП по сравнению с нормой	- Гал-3: снижен уровень экспрессии в вневорсинчатом трофобласте; уровень в пуповинной крови маловесных новорожденных значительно выше по сравнению с нормой - Гал-4,-8,-9,-12: экспрессия галектинов в плаценте гендер-специфична при ЗРП - Гал-13: снижена экспрессия в ворсинчатом и вневорсинчатом трофобласте при вынашивании плода мужского пола; низкий уровень в крови в первом триместре; высокий уровень во 2 и 3 триместрах; низкий уровень в I триместре прогнозирует преждевременные роды у беременных с ЗРП

Примечание: * - изученные в *in vitro* исследованиях на клеточных культурах, и в клинических исследованиях на когортах беременных

Наиболее изученный и полифункциональный из галектинов – Гал-1, который оказывает местный и системный противовоспалительный и иммуномодулирующий эффект. Секретируясь во внеклеточную среду, Гал-1 связывается с N-ацетиллактозамином, присутствующим на цепях N- или O-связанных гликанов в составе различных рецепторов клеточной поверхности, белках внеклеточного матрикса (ВКМ), включая ламинин и фибронектин (Menkhorst E. et al., 2021). Охарактеризовано несколько рецепторов в фетоплацентарной системе, которые экспрессируют углеводные лиганды для Гал-1, в частности, CD45, CD43, CD69, pre-BCR и VRGFR2 (Menkhorst E. et al., 2021).

Экспрессия Гал-1 регулируется половыми гормонами, зависит от фазы цикла и возрастает при имплантации и во время беременности (Than N.G. et al., 2008a). Выявлена детерминированная регуляция экспрессии Гал-1 на протяжении физиологической беременности у человека: возрастание экспрессии в тканях плаценты в первом триместре, пик экспрессии во втором, и значительное уменьшение перед родами (Blidner A. G., Rabinovich G. A., 2013). Высокая экспрессия Гал-1 выявляется в децидуальных стромальных клетках, эндоваскулярном и интерстициальном трофобласте, где Гал-1 регулирует их инвазивные свойства, а также способность вневорсинчатого трофобласта секретировать иммунорегуляторные белки, в частности экспрессию малополиморфной молекулы HLA-G на ранних сроках беременности (Barrientos G. et al., 2014; Tang M. et al., 2018; Tirado-Gonzalez I. et al., 2013). Экспериментально показано, что Гал-1 связывает гликоэпитопы на синцитиотрофобласте и клетках хориокарциномы (BeWo) (Михайлова В.А., 2019). Связывание эпитопов Gal β 1-4GlcNAc и Gal β 1-3GalNAc (TF) на клетках BeWo оказывает регулирующее действие на продукцию ХГЧ и прогестерона (Jeschke U. et al., 2007).

В нормальной плаценте dNK экспрессируют Гал-1 в более высоких количествах, чем периферические NK-клетки (Korcow H. D. et al., 2008; Korcow H. D. et al., 2010); при ПЭ экспрессия Гал-1 снижена (Molvarec A. et al., 2011). Показано, что Гал-1 регулирует фенотип и иммунорегуляторные свойства децидуальных ДК. В частности, при обработке Гал-1 ДК, выделенных из децидуальной ткани пациенток с нормальной беременностью, они приобретали способность индуцировать пролиферацию и экспансию T(reg)-клеток, экспрессирующих IL-10 (Blois S. M. et al., 2007a). При патологии беременности, развивается гиперэргический воспалительный Th1 ответ, который сопровождается иммуногенным фенотипом ДК и снижением децидуальной экспрессии Гал-1 (Blois S. M. et al., 2007a; Blois S. M. et al., 2007b).

Установлено, что Гал-1 избирательно контролирует численность Th1, Th2 и Th17 клеток через взаимодействие с гликанами, которые экспрессируют субпопуляции этих клеток. Гал-1 способен связываться только с гликанами, экспрессированными на Th1 и Th17-клетках. Гликаны Th2-клеток заблокированы для связывания с Гал-1 за счет наличия терминальных остатков α 2,6-сиаловых кислот, которые экранируют связывание бета-галактозидов с Гал-1 (Toscano M. A. et al., 2007). По-видимому, благодаря способности секретировать Гал-1, dNK клетки индуцируют апоптоз активированных Th1/Th17 клеток (Di Lella S. et al., 2011; Korcow H. D. et al., 2008). Механизм регуляции численности аллореактивных Т-клеток нарушается при ПЭ, вследствие пониженной секреции Гал-1, что ведет к развитию чрезмерного СВО, опосредованного Th1 и Th17-клетками (Blois S. M. et al., 2007a; Freitag N. et al., 2013; Molvarec A. et al., 2011).

Функция галектина-2 (Гал-2) в фетоплацентарной системе менее изучена, чем у других галектинов. Известно, что углеводные лиганды Гал-2 представлены на β 1 интегрине Т-клеток (Menkhorst E. et al., 2021; Sedlář A. et al., 2021). Его взаимодействие с лейкоцитами приводит к апоптозу активированных Т-клеток (Зиганшина М.М. и др., 2020; Sturm A. et al., 2004), ингибированию миграции моноцитов в сайт воспаления, предотвращению активации Т-клеток, вызванной макрофагами (Paclik D. et al., 2011). Гал-2 смещает профиль секреции цитокинов Т-клетками в Th2-фенотип, что сопровождается снижением INF- γ , TNF α и повышением уровня IL-5 (Sturm A. et al., 2004). Экспрессия Гал-2 максимальна в сайтах наиболее тесного контакта с материнской кровью: в синцитиотрофобласте I триместра и в ядрах клеток децидуа (Hutter S. et al., 2015). Патологически низкая экспрессия Гал-2 в плаценте выявляется при выкидышах (Unverdorben L. et al., 2016), ЗРП (Hutter S. et al., 2016), ПЭ (Hutter S. et al., 2015).

Для галектина-3 (Гал-3) характерна высокая аффинность связывания с олигосахаридами системы групп крови АВН и с полилактозаминазовыми группами в коровых областях О-гликанов и комплексных N-гликанов (Seetharaman J. et al., 1998). Гал-3 является мощным регулятором активации и дифференцировки различных субпопуляций иммунных клеток врожденного и адаптивного иммунитета. Осуществляет регуляцию острой воспалительной реакции: активацию и роллинг нейтрофилов, хемотаксис моноцитов/макрофагов (Sano H. et al., 2000) и дегрануляцию тучных клеток (Menkhorst E. et al., 2021). При длительном повреждении тканей Гал-3 способствует развитию хронического воспаления, ингибируя ответы Т-клеток (Fukumori T. et al., 2003; Morgan R. et al., 2004). Гал-3 является медиатором в защите от микробных инфекций, поскольку может связывать гликаны на поверхности потенциально патогенных микробов и функционировать как распознающий и эффекторный фактор врожденного иммунитета (Зиганшина М.М., 2016; Vasta G. R. et al., 2017). Регуляция Гал-3 адаптивного иммунитета осуществляется через стимуляцию толерогенных ДК, экспрессирующих фермент IDO, которые способствуют экспансии Т(рег)-клеток (Volarevic V. et al., 2019). Установлена двойственная роль Гал-3 в регуляции апоптоза Т-клеток, которая зависит от его локализации в клетке: секреция и связывание с лигандами вне клетки способствует апоптозу Т-клеток (Зиганшина М.М., 2016; Karlsson A. et al., 2008), напротив, внутриклеточное связывание Гал-3 оказывает защитный эффект и повышает их выживание (Yu F. et al., 2002). Также, было установлено, что Гал-3 оказывает мощное ингибирующее действие на активацию и функцию НК-клеток, связывая гликаны-лиганды в составе коровых структур типа 2 на О-гликанах клеток-мишеней (Tsuboi S. et al., 2011; Tsuboi S., 2012), либо взаимодействуя с рецепторами, активирующими НК-клетки (т.е. NKp30) (Зиганшина М.М., 2016; Menkhorst E. et al., 2021; Wang W. et al., 2014).

В ткани плаценты Гал-3 выявляется в децидуальных клетках (Wolff M. von et al., 2004), а также во всех типах дифференцирующегося трофобласта (Maquoi E. et al., 1997). Инвазивный вневорсинчатый трофобласт экспрессирует максимальные уровни Гал-3 (Freitag N. et al., 2020a). Дефицит экспрессии Гал-3 выявлен при нарушении дифференцировки трофобласта, усиленной инфильтрации dNK-клеток и дегрануляции, а также дефектной васкуляризации, что наблюдается при асимметричной форме ЗРП из-за плацентарной недостаточности (Freitag N. et al., 2020b; Menkhorst E. et al., 2021). Гал-3 может связываться с конечными продуктами гликирования, которые образуются в поврежденных клетках и способствуют накоплению активных форм кислорода и эндотелиальной дисфункции (Vlassara H. et al., 1995), что развивается при ПЭ.

Галектин-4 (Гал-4) экспрессируется преимущественно в слизистых оболочках, включая кишечник (Schrader S. et al., 2022). Высокоаффинными лигандами для Гал-4 являются сульфатированные гликолипиды рафтов клеточных мембран, взаимодействуя с которыми Гал-4 способствует кластеризации рафтов, и доставке белков в апикальную мембрану (Vasta G.R. et al., 2017). Наиболее изучены регуляторные эффекты Гал-4 при воспалительных заболеваниях кишечника, в частности, колите: установлены лиганды Гал-4 на Т-клетках памяти слизистой кишечника, представленные коровыми О-гликанами с кором типа 1 (Di Lella S. et al., 2011) и показано что связывание Гал-4 с лигандами Т-клеток индуцирует синтез IL-6 (Vasta G.R. et al., 2017). Также выявлен эффект Гал-4 в эпителизации ран и регуляции апоптоза Т-клеток слизистой оболочки (Paclik D. et al., 2011).

К настоящему времени имеются ограниченные данные об экспрессии Гал-4 в фетоплацентарной системе. В частности, Гал-4 выявляется в эпителии и эндотелии сосудов эндометрия крупного рогатого скота (Froehlich R. et al., 2012). Предполагается регуляторная роль Гал-4 в дифференцировке трофобласта, поскольку в плаценте крысы уровень его экспрессии реципрокно связан со степенью дифференцировки трофобласта (Arikawa T. et al., 2012). Гиперэкспрессия Гал-4 в ядрах и цитоплазме синцитиотрофобласта и клеток децидуальной оболочки выявляется в плацентах женщин с ГСД (Schrader S. et al., 2022).

Галектин-7 (Гал-7) регулирует межклеточную адгезию и миграцию иммунных клеток (Cao Z. et al., 2002; Di Lella S. et al., 2011; Guo J.-P., Li X.-G., 2017; Menkhorst E. et al., 2021; Sun X., Zhang W., 2019). В иммунном ответе Гал-7 выполняет двойственную функцию, которая определяется внутри- или внеклеточной локализацией Гал-7 и типом экспрессирующих его клеток. Так, он может выполнять функции “алармина” способствуя поляризации CD4⁺Т-клеток в Th1-фенотип (Luo Z. et al., 2018). Участвует во внутриклеточном иммунном ответе на инфекционные агенты, в частности при инфицировании стрептококком группы А (Cao Z. et al., 2002). В экспериментальных моделях у животных введение Гал-7 вызывает провоспалительный ответ с высокой экспрессией IL-1 β и IL-6 и снижением продукции мРНК IL-10 в плаценте мышей и развитием симптомов ПЭ (Menkhorst E. et al., 2020); внесение Гал-7 в культуру клеток Jurkat ингибирует секрецию IL-2 и INF- γ (Yamaguchi T. et al., 2013).

Умеренный уровень экспрессии Гал-7 выявляется в трофобласте и в иммунных клетках, локализующихся в децидуальной ткани матки (Menkhorst E. et al., 2021). Повышение экспрессии Гал-7 в синцитии выявляется при ранней ПЭ (Menkhorst E. et al., 2020). Предполагается, что в плаценте Гал-7 участвует в реакциях врожденного

иммунитета, о чем свидетельствует его низкая экспрессия в норме, и повышенная при патологии беременности, что сопровождается формированием провоспалительного паттерна клеток и гуморальных факторов плаценты и периферической крови.

Галектин-8 (Гал-8) способен модулировать взаимодействие клетки с матриксом (Zick Y. et al., 2002). Гал-8 экспрессируется трофобластом и децидуальными стромальными клетками в ранней беременности. Предполагается его участие в регуляции клеточного роста и адгезионных взаимодействиях трофобласта при морфогенезе плаценты (Kolundžić N. et al., 2011b). Кроме того известно, что Гал-8 регулирует пролиферацию Т-клеток, активацию тромбоцитов и ангиогенез (Blidner A. G., Rabinovich G. A., 2013). Сигналы, опосредованные Гал-8 оказывают стимулирующее влияние на врожденный иммунитет за счет стимуляции продукции нейтрофилами супероксида и регуляции адгезии нейтрофилов к ВКМ (Nishi N. et al., 2003). Данные указывают на то, что Гал-8 – это первая линия защиты от инфекции в слизистых оболочках – он опосредует распознавание гликанов на мембранах бактерий, по строению сходных с антигеном группы крови. Связывание с этим гликаном приводит к разрушению бактериальной мембраны и лизису бактерии (Stowell S.R. et al., 2010).

Галектин-9 (Гал-9) обладает широким спектром действия на иммунные клетки, регулирует развитие реакций врожденного и адаптивного иммунитета посредством взаимодействия с углеводными лигандами (Т-клеточный иммуноглобулин и муцин-3 (Tim-3)). Tim-3 экспрессируется трофобластом и различными иммунными клетками: макрофагами, моноцитами, ДК, NK- и NKT- клетками, Т-клетками (Th1, Th17, T(рег) и γ/δ Т-клетками) (Li F. et al., 2018; Zhao J. et al., 2009). Tim-3 является членом семейства гликопротеинов TIM, которые функционируют как ключевые ингибиторы контрольных точек иммунитета (Gomes de Moraes A. L., Cerdá S., Miguel M. de, 2022). Эти гликопротеины имеют множество сайтов О-гликозилирования, их О-связанные гликаны содержат сиаловую кислоту, фукозу и/или групповые антигены системы АВ0. Подробная карта гликанов TIM-3 полученная методом масс-спектрометрии представлена в (Chongsaritsinsuk J. et al., 2023). В связи с множественным влиянием на иммунную систему сформировано понятие о Гал-9/Tim-3 регуляторной оси, которая имеет ключевое значение в иммунологической толерантности, поскольку взаимодействие Гал-9 с Tim-3 индуцирует апоптоз и негативно регулирует развитие Th1 и Th17-клеток и Т-цитотоксических клеток, но, напротив, стимулирует развитие и экспансию Т(рег)-клеток (Зиганшина М.М., 2016; Heusschen R. et al., 2013; Meggyes M. et al., 2014; Oomizu S. et al., 2012a; Sabatos C. A. et al., 2003; Wang F. et al., 2008; Wang F. et al., 2009; Zhu C. et al., 2005). В экспериментах *in vitro*

воздействие IL-6 негативно регулирует число Гал-9⁺Th-клеток (Гал-9 секретирующих Th-клеток), но нейтрализация действия IL-6, напротив ведет к развитию Гал-9⁺Th-клеток, что сдвигает баланс от Th1/Th17-направленности иммунных реакций в сторону протективного для беременности Th2/T(рег) иммунного ответа (Oomizu S. et al., 2012b).

Гал-9 широко экспрессируется железистым эпителием эндометрия и клетками и структурами фетоплацентарной системы (Shimizu Y. et al., 2008; Wolff M. von et al., 2004), в частности эпителиальными и стромальными клетками децидуальной оболочки на ранних сроках беременности, а также цито- и синцитиотрофобластом (Sun J. et al., 2016). Взаимодействие Гал-9/Tim-3 индуцирует дифференцировку dNK-клеток из периферических NK-клеток (Li Y.-H. et al., 2016). С увеличением срока беременности повышается экспрессия Гал-9 T(рег)-клетками что коррелирует с повышением уровня Гал-9 в крови матери (Meggyes M. et al., 2014). При патологии беременности снижается экспрессия Tim-3 практически всеми субпопуляциями иммунных клеток: цитотоксическими Т-клетками, γ/δ Т-клетками, dNK-клетками и нарушается баланс продукции Th1/Th2 цитокинов (Li Y.-H. et al., 2016), в частности, при ПЭ выявляется снижение продукции TGF- β 1 (Li Y. et al., 2017), и усиление провоспалительного фона (Miko E. et al., 2009; Miko E. et al., 2013) и активацией Th1-иммунного ответа (Li F. et al., 2018).

К плацентарным галектинам, которые селективно экспрессируются тканью плаценты относятся: галектин-13 (Гал-13, PP13), галектин-14 (Гал-14) и галектин-16 (Гал-16); наиболее изучен из них Гал-13 (Than N. G. et al., 2009; Than N. G. et al., 2012). Специфичность плацентарных галектинов отличается от других членов семейства, в частности, Гал-13 связывает маннозу и N-ацетилглюкозамин (Зиганшина М.М., 2016; Si Y. et al., 2021; Su J. et al., 2018a; Su J. et al., 2018b; Than N. G. et al., 2004). Установлена высокая экспрессия плацентарных галектинов в синцитиотрофобласте (цитоплазме и мембранном гликокаликсе), умеренная - в вневорсинчатом трофобласте, эпителии амниона и фетальном эндотелии капилляров ворсин, отсутствие - в недифференцированном цитотрофобласте (Зиганшина М.М., 2016; Than N. G. et al., 2008b; Than N. G. et al., 2009).

Плацентарные галектины подобно Гал-1, индуцируют апоптоз не только активированных Т-клеток (Menkhorst E. et al., 2021; Than N. G. et al., 2009), но и поздний апоптоз любых Т-клеток независимо от статуса их активации, но преимущественно Т-цитотоксических клеток, вследствие предпочтительного, по сравнению с Т-хелперами, связывания с их углеводными лигандами (Balogh A. et al., 2019). Предполагается, что они имеют особое значение в развитии периферической толерантности к плоду, и выполняют

функцию ингибирования иммунного ответа на плацентарные аллоантигены. Было показано, что Гал-13 аккумулируется вокруг некротических зон, содержащих иммунные клетки, которые окружают маточные вены в I триместре беременности. В связи с особенностями локализации предполагается, что Гал-13 способствует созданию локального толерогенного микроокружения трофобласта, защищая его от атаки со стороны иммунных клеток матери и способствуя плацентации (Kliman H. J. et al., 2012).

Гал-13 существенно не влияет на апоптоз нейтрофилов, также как и на их функции, связанные с участием в воспалительной реакции. Его роль в формировании иммунорегуляторного фенотипа нейтрофилов заключается в индукции экспрессии лиганда запрограммированной смерти 1 (PD-L1), что регулирует их численность, и стимуляции синтеза и продукции цитокинов, факторов роста и ферментов ремоделирования матрикса (TNF α , HGF, VEGF, MMP-9), что позволяет нейтрофилам осуществлять защитный противоинфекционный контроль и способствовать росту и развитию плаценты (Vokalova L. et al., 2020). В контексте проангиогенного влияния плацентарных галектинов необходимо отметить стимуляцию продукции IL-8 T-клетками (Li A. et al., 2003). На животных моделях установлено, что Гал-13 стимулирует ремоделирование при гестационной перестройке сосудов матки и позитивно регулирует массу плаценты крысы, а также влияет на гемодинамику, вызывая продукцию оксида азота и системную вазодилатацию (Drobnjak T. et al., 2017; Drobnjak T. et al., 2019; Menkhorst E. et al., 2021). Значительное содержание Гал-13 выявляется в крови матери при нормальной беременности, низкое - при развитии патологии (Huppertz B. et al., 2008; Than N. G. et al., 2008b). Патология беременности характеризуется снижением экспрессии плацентарных галектинов, что ассоциировано с нарушениями морфогенеза плаценты и периферической толерантности.

Таким образом основываясь на углевод-опосредованных взаимодействиях в иммунной и репродуктивной системах, гипотеза фето-эмбриональной защиты (FEDS) объясняет взаимодействия между фетальными и материнскими клетками и их влияние на развитие центральной и периферической толерантности во время беременности. Эти данные расширяют представление о молекулярных механизмах развития ключевых системных протективных для плода изменений в иммунной системе матери: доминированию Th2-реакций, развитию толерогенных фенотипов клеток, ограничению провоспалительного Th1/Th17 – иммунного ответа и экспансии регуляторных клеток.

1.2.7. Антигликановые антитела - регуляторные молекулы иммунной системы

Гликаны представляют собой молекулы с высокой структурной изменчивостью, которые представлены в ассоциированном с плазматической мембраной поверхностном слое – гликокаликсе. В составе этого сложного надмолекулярного комплекса они рассматриваются как молекулы распознавания, опосредующие разнообразные контакты между клетками (подробно рассмотрено выше), и как мишени для патологических антител, что показано в ряде работ, исследующих аутоиммунные и онкологические заболевания (Mestecky J. et al., 2013; Sheikh K. A., Zhang G., 2010; Stuchlová Horynová M. et al., 2013).

Основной акцент в исследовании роли антител при беременности смещен в сторону изучения “патологических” антител, появление или возрастание содержания которых связывают с развитием осложнений. В этом контексте при патологическом течении беременности широко исследуются антифосфолипидные (АФА), антиэндотелиальные (АЭАТ) и “антиотцовские” антилейкоцитарные антитела (АОАТ) (Зиганшина М.М. и др., 2017b). Установлена их связь с частотой невынашивания беременности, степенью тяжести ПЭ и ЗРП. Но общей проблемой в изучении подобных антител является наличие единичных охарактеризованных мишеней, вследствие чего наблюдается высокая частота серонегативных результатов при подтверждении морфологической картины отторжения с участием антител. Можно предположить, что часть антител из пула АФА, АОАТ и АЭАТ связываются с гликанами, так как эти иммуноглобулины имеют сайты связывания на клеточных мембранах, а для некоторых мишеней достоверно известно, что они гликозилированы (Зиганшина М.М. и др., 2017b).

Антигликановые антитела (АгАТ) – углевод-связывающие белки, которые присутствуют в крови здорового человека в первый год жизни без явной антигенной стимуляции (естественные АгАТ, еАгАТ), а также продуцируются в ответ на гликаны возбудителей инфекций (адаптивные АгАТ) (Kariuki T. M. et al., 2008; Petralia L. M. et al., 2023; Polonskaya Z. et al., 2019; Yang Y. Y. M. et al., 2017b). Предполагается, что одним из путей индукции синтеза еАгАТ являются бактерии нормальной микрофлоры, которые колонизируют организм. Вследствие этого еАгАТ, распознающие различные бактериальные гликаны, обнаружены в крови здоровых людей и животных (Nores G. A. et al., 2008). Пул еАгАТ разнообразен и традиционно считается, что еАгАТ, вырабатываются В1-клетками, тогда как IgG⁺В2-клетки памяти являются источником адаптивных АгАТ (Temme J. S. et al., 2022), которые преимущественно направлены к гликанам, являющимся составной частью паттернов патогенности и ассоциированы с вирусным, бактериальным или паразитарным инфицированием. Ввиду значительных сложностей идентификации сложно разграничить естественные и адаптивные АгАТ.

АгАТ выполняют в организме множество функций: противоинфекционной и противоопухолевой защиты, физиологического клиренса, поддерживают гомеостаз микробиома (Michaud E. et al., 2022; Tikhonov A. et al., 2020). Но кроме положительного влияния на организм, АгАТ могут оказывать и негативное воздействие, выступая в качестве ассоциированных с патологией антител. Содержание еАгАТ некоторых специфичностей достигает примерно 0,1% от общего количества иммуноглобулинов; иммуноглобулины класса М доминируют для большинства специфичностей еАгАТ, составляя до 80-90%. По классификации, предложенной Бовиным Н.В., их можно разделить на три группы: 1) консервативные еАгАТ, сходные у всех здоровых индивидов по углеводной специфичности и по содержанию в крови; 2) еАгАТ, являющиеся аллоантителами, направленными к антигенам группы крови; 3) группа пластичных еАгАТ, в которую входят антитела из первых двух групп и уровень которых может значительно меняться в период острых и хронических заболеваний (Bovin N. V., 2013). Отдельную группу составляют АгАТ, продукция которых происходит в ответ на измененные собственные гликаны организма, что наблюдается при различных патологиях и связано с нарушениями гликозилирования или повреждением структур гликанов, в частности, в связи с токсическими, или провоспалительными воздействиями, или канцерогенезом, что ведет к образованию “неоантигенов”. В мировой науке существует дискуссия по вопросу: можно ли часть АгАТ отнести к аутоиммунным антителам, несмотря на то, что по каноническим представлениям об аутоиммунитете, они не укладываются в это понятие.

Наиболее известные и широко изученные АгАТ – это естественные АгАТ к углеводным группоспецифическим антигенам крови. К настоящему времени описано 45 систем групп крови (<https://www.isbtweb.org/resource/tableofbloodgroupsystems.html>), из которых 8 классифицированы на основе углеводных антигенов (Таблица 4). Установлен серологический и структурный полиморфизм систем углеводных групп крови, который определяет защиту человека как вида от патогенов, но, также, служит причиной развития различных осложнений при несовместимости по группам крови внутри вида (Dotz V., Wuhrer M., 2016; Jajosky R. P. et al., 2023).

Основное внимание при исследовании группоспецифических антител уделяется антигенам АВ0(Н)-системы, в связи с их важностью для гемотрансфузии и трансплантации органов. При беременности опасность представляет конфликт матери и плода по АВ0(Н) антигенам, что вызывает гемолитическую болезнь новорожденных (ГБН), когда материнские алло-антитела IgG класса проходят через плаценту и разрушают эритроциты плода, что может приводить к выкидышу, патологии у новорожденного или его

гибели (Обухова П. С. и др., 2021). Причем в АВ0-конфликте участвуют не только предрасполагающие естественные IgG матери, но и продуцируемые в результате изоиммунизации адаптивные группоспецифические IgG. Особое значение в развитии АВ0-ГБН имеет подкласс IgG антител, в отношении которых идет дискуссия, но доказано, что клиническое значение для диагностики и прогноза тяжести ГБН имеют, прежде всего, IgG₁ и IgG₃, которые обладают более выраженной гемолитической активностью. Подробно особенности структурного и серологического полиморфизма АВ0-антигенов, причины, механизм и факторы, влияющие на развитие ГБН-АВ0, описаны в обзоре (Обухова П. С. и др., 2021). Несмотря на то, что показана связь между группами крови АВ0 и рядом сердечно-сосудистых, инфекционных и онкологических заболеваний, для патологии беременности этот вопрос остается дискуссионным (Franchini M., Mengoli C., Lippi G., 2016). Имеются данные о более высокой частоте развития ПЭ и ЗРП у беременных с определенными группами крови (Bahkali N. M. et al., 2023; Erden A. et al., 2016), а также предполагается их влияние на частоту развития венозной тромбоэмболии, послеродового кровотечения и гестационного сахарного диабета (Franchini M., Mengoli C., Lippi G., 2016), но роль группоспецифических АгАТ в патогенезе осложнений беременности и родов еще не обоснована. Кроме антигенов системы АВ0(Н), представляют интерес и имеют клиническое значение антигены системы Р1Рк и GLOB и соответствующие им АгАТ. В частности, анти-Р-IgG антитела могут быть причиной патологии беременности. Особую важность для акушерства имеют анти-РР1Рк антитела: они вызывают не только ГБН, но и повторные выкидыши из-за высокой экспрессии антигенов Р и Рк в интерстициальном и вневорсинчатом трофобласте (Jajosky R. P. et al., 2023). Клиническое значение антител к другим группоспецифическим системным антигенам углеводной природы (LE и I) в акушерстве пока не обосновано.

Кроме аллогенной несовместимости по углеводным группоспецифическим (алло-) антигенам, клиническое значение имеет несовместимость по углеводным ксеноантигенам, в частности, при ксенотрансплантациях. Основной углеводный ксеноантиген Галили (Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -), который часто для простоты обозначают как α Gal-эпитоп, обнаруживается в составе N-цепей гликопротеинов и гликолипидов млекопитающих (не приматов), полуобезьян (лемуров) и обезьян Нового Света. Минимальный фрагмент ксеноантигена – дисахарид Bdi (Gal α 1-3Gal β). Его синтез осуществляется ферментом α 1-3-галактозилтрансферазой, которая отсутствует у человека и у приматов Старого Света в связи с инактивацией в процессе эволюции гена, кодирующего этот фермент (Зиганшина М.М., 2016). Антиген Галили отсутствует у человека (Galili U., 2001), но близкий по составу

эпитоп обнаруживается на опухолевых клетках и способствует их инвазии и метастазированию. В частности, известно, что в составе секретируемых гликозилированных белков ламининов, которые являются составными компонентами базальной мембраны и ВКМ и принимают участие в межклеточных коммуникациях, имеются углеводные цепи с терминальными остатками Gal α - и GalNAc α - (Tanzer M. L. et al., 1993) , которые определяют функции ламининов (Dean J. W., Chandrasekaran S., Tanzer M. L., 1990). eAgAT к антигену Галили, присутствующие у всех людей в значительном количестве (Galili U., 2001) и выполняют надзорную функцию, ингибируя адгезивные взаимодействия между опухолевой клеткой и ламинином (Tanzer M. L. et al., 1993).

Таблица 4 Системы групп крови, классифицированные на основе углеводных антигенов (с модификациями из (Обухова П.С. , 2011; Jajosky R. P. и др., 2023)

№	Системное название группы крови	Фермент	Носители	Антитела, (класс антител)	Основные антигены
1	AB0	А-трансфераза: α 1-3-N-ацетилгалактозаминилтрансфераза, A3GALNT В-трансфераза: α 1-3-галактозилтрансфераза, A3GALT1	гликосфинголипиды, N-/О-гликопротеины, свободные гликаны	анти-А антитела анти-В антитела IgM (преимущественно), IgG, IgA	A:A1; A2 B
2	LE	α (1,3/4)-фукозилтрансфераза, фукозилтрансфераза 3, FUT3, Le-FUT	гликосфинголипиды, N-/О-гликопротеины, свободные гликаны	анти- Le ^a антитела (IgM и IgG) анти- Le ^b антитела (IgM)	Le ^a Le ^b
3	H	Галактозид 2- α -L- фукозилтрансфераза 1, FUT1, H-FUT Галактозид-2- α -L-фукозилтрансфераза 2, фукозилтрансфераза 2, FUT2	гликосфинголипиды, N-/О-гликопротеины, свободные гликаны	анти-H антитела (IgM и IgG) имеются только у лиц фенотипа Bombay	H
4	I	N-ацетилактозаминид β -1,6-N-ацетилглюкозаминилтрансфераза, изоформа А (I-разветвляющий фермент)	гликосфинголипиды, N-/О-гликопротеины	анти-I антитела анти-i антитела (IgM)	i I

№	Системное название группы крови	Фермент	Носители	Антитела, (класс антител)	Основные антигены
5	P1PK	Лактозилцерамид-4-альфа-галактозилтрансфераза (Gb3-синтаза; P1/Pk-синтаза)	гликосфинголипиды	анти-P, P1, Pk антитела IgM и IgG (преимущественно IgG3) анти P1 (IgM) анти-PX2 антитела (IgM и IgG) анти-NOR-антитела (IgM)	P1 Pk NOR PX2
6	GLOB	β -1,3-N-ацетилгалактозаминилтрансфераза 1 (глобозидсинтаза)	гликосфинголипиды	анти-P антитела (IgM и IgG)	P
7	FORS	Глобозид α (1,3)-N - ацетилгалактозаминилтрансфераза 1 (Fs-синтаза)	гликосфинголипиды	FORS1 антитела (IgM)	FORS1
8	SID	β -1,4 N-ацетилгалактозаминилтрансфераза 2	N-гликопротеины	анти- Sda антитела (IgM)	Sda

Наличие у человека значительного количества естественных анти- α Gal антител (IgM и IgG) к антигену Галили, является причиной отторжения при ксенотрансплантации сердца и почки свиньи вследствие развития гуморальных реакций сверхострого отторжения (Cooper D. K. C., 2022). Установлено, что развитие отторжения при ксенотрансплантациях сопровождается повышением в крови человека анти- α Gal антител (в 64 раза) (Cooper D. K. C., 1998). Создание гомозиготных свиней с отсутствием гена, кодирующего фермент, синтезирующий антиген Галили, частично решило проблему ксенотрансплантации. Однако, при отсутствии реакций острого отторжения трансплантата, отмечено продолжающееся повреждение трансплантированной ткани по механизму хронического отторжения и/или микроангиопатии. Т.е иммунный ответ развивается уже не на Gal α -эпитоп (Christiansen D. et al., 2012), на другие антигены. Среди мишеней для eAgAT называют антигены, подобные Sid группы крови (Sd(a)) (Зиганшина М.М., 2016; Miyagawa S. et al., 2012), а также антигены Forssman (Cooper D. K. C., 1998) и Neu5Gc N-гликолилнейраминную кислоту (Cooper D. K. C., 2022).

АгАТ практически не исследованы в акушерстве, но известно, что они имеют общие мишени с антиэндотелиальными и антифосфолипидными антителами, в частности, мишенями являются гепаран сульфат, глоботрисаилилцерамид (Gb3/CD77) и др. (Зиганшина М.М. и др., 2020; Ziganshina M.M. et al., 2018b). “Установлено, что привычный выкидыш у пациенток с АФС ассоциирован с повышенным содержанием в крови АгАТ(IgG) против гликанов с треминальным остатком GalNAc β -. Патогенетический эффект этих антител был подтвержден в *in vivo* и *in vitro* исследованиях. Аффинно выделенные из крови пациенток в невынашивании анти-GalNAc β - антитела, при введении беременным мышам, вызывали самопроизвольное прерывание беременности (модель *in vivo*). Эффект анти-GalNAc β - антител на инвазию клеток линии хориокарциномы (JAR) в матрикеле проявлялся в ингибировании ее инвазивных свойств и снижении способности продуцировать матриксные металлопротеиназы, которые ремоделируют ткань (модель *in vitro*)” (Зиганшина М.М., 2016). Имеются сообщения об одновременной детекции высокого уровня АФА и АгАТ к моно- и олигосахаридам GlcNAc β -, GalNAc α -, GalNAc β - и β 4GlcNAc β - (Зиганшина М.М., 2016; Blank M. et al., 2012).

В тканях плаценты беременных с самопроизвольным выкидышем при ИГХ-окрашивании выявлен сниженный, по отношению к норме того же гестационного срока, уровень экспрессии Галили-подобного эпитопа. Поскольку в норме уровень экспрессии этого эпитопа на инвазивном вневорсинчатом трофобласте определяется как “высокий”, а на низкоинвазивном ворсинчатом трофобласте как “низкий”, то предполагается, что уровень экспрессии Галили-подобного эпитопа может быть маркером инвазивных свойств

трофобласта. В пользу этого предположения были получены результаты, свидетельствующие, что при ПЭ – в некоторых фрагментах трофобласта установлено полное отсутствие его экспрессии. Но одновременно, при ПЭ детектируется высокий титр анти α Gal-антител, что предполагает их ингибирующее влияние на межклеточные инвазивные взаимодействия между трофобластом и ВКМ (Christiane Y. et al., 1992).

АгАТ являются привлекательными объектами исследований, и рассматриваются в качестве терапевтических препаратов и маркеров для диагностических целей. Например, моноклональные АгАТ, обладающие специфичностью в отношении ТАСА (опухолеассоциированные углеводные антигены), используются в клинике как в диагностических, так и в терапевтических целях (Amon R. et al., 2020; Gillmann K.M. et al., 2023; Pochechueva T. et al., 2016; Smorodin E. et al., 2018; Vankemmelbeke M., Chua J. X., Durrant L. G., 2016). Благодаря интенсивно развивающейся технологии гликановых эрреев (в виде микрочипов) появилась возможность одновременной детекции АгАТ большого числа специфичностей (более 800 иммуноглобулинов классов: М, G, А и Е) к различным гликанам (Park S. et al., 2013), что позволяет изучать представительный пул АгАТ при различных заболеваниях (Temme J.S. et al., 2022; Tikhonov A. et al., 2020).

Опираясь на представленные данные о функциях гликанов в межклеточных взаимодействиях и механизмах иммунологической толерантности, можно предположить, что АгАТ могут рассматриваться как значимые в нескольких аспектах:

- как ингибиторы при межклеточных взаимодействиях, осуществляемых при морфогенезе плаценты;
- как конкуренты при иммунных реакциях, опосредуемых эндогенными лектинами;
- как маркеры, косвенно отражающие изменение паттерна гликозилирования;
- как блокирующие антитела, распознающие мишени в плаценте.

Т.о. представленные данные литературы свидетельствуют, что гликаны играют центральную роль в системе опознавания “свой - чужой” и регуляции баланса между гомеостазом и иммунным ответом. Схематически данные представлены на Рисунке 3, адаптированном из (Alves I et al., 2022). Для репродукции эти данные находятся в стадии накопления. Гипотезы “гликокода” и эмбриональной защиты пока имеют теоретическое значение, поскольку клинических исследований проведено недостаточно: мало исследований, доказывающих значение изменения гликанов и АГАТ при развитии патологии у матери, и отсутствуют данные об их изменениях и влиянии этих изменений на здоровье плода.

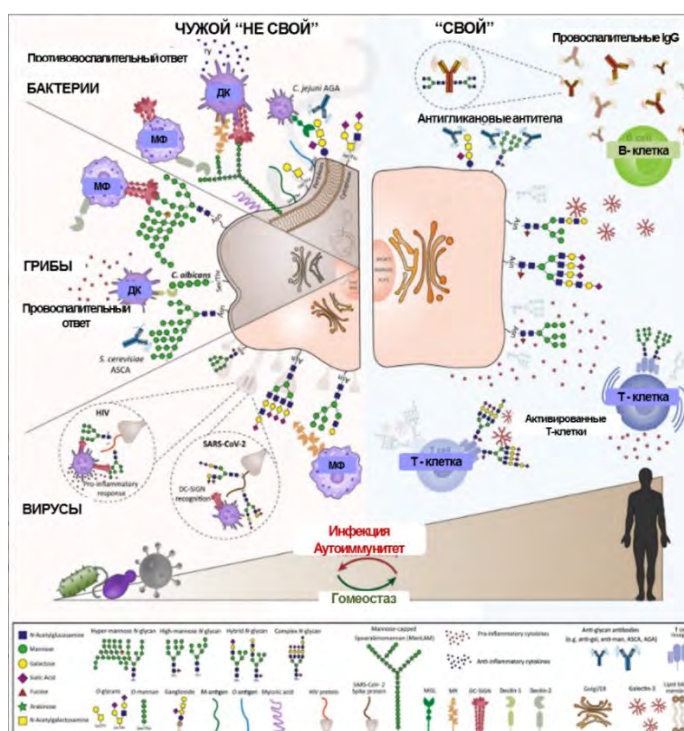


Рисунок 3. Гликаны как центральные молекулы в распознавании “свое/чужое”. У микроорганизмов и человека имеются различные паттерны гликанов, что лежит в основе распознавания “свое/чужое”. Клетки врожденного и адаптивного иммунитета имеют множество рецепторов, распознающих гликаны (TLRs, лектины С-типа, галектины и сиглеки), которые способны специфически связывать, и распознавать различные структуры гликанов, регулируя про- или противовоспалительные реакции, развивающиеся при инфекции, воспалении, и аутоиммунной патологии. Антигликановые антитела участвуют в гликан-зависимых процессах распознавания, играя важную роль в иммунных реакциях хозяина и, следовательно, в инфекции и воспалении. Гликаны могут модулировать активность и функцию иммунных клеток, таких как Т-клетки, а также эффекторные функции антител (Зиганшина М.М. и др., 2020; Alves I. et al., 2022).

1.3. Гликопатология

“Изменения экспрессии гликанов в тканях и на клетках иммунной и других систем описываются, главным образом, как изменения гликозилирования, или гликокода, гликотипа (под которыми понимают изменения углеводного фенотипа клетки)” (Зиганшина М.М., 2016). Однако более подходящим термином, который должен использоваться для характеристики подобного рода является “гликопатология” – как раздел патологии, описывающий нарушения биосинтеза, экспрессии и функции гликанов в организме (<https://www.nature.com/collections/icijbaidh>). В современной литературе обнаружено использование этого термина в контексте гистохимических исследований изменений гликозилирования в различных тканях с помощью лектинов и антител (Зиганшина М.М. и др., 2019). Такая “трансляция” или перевод гликанового кода с помощью углеводсвязывающих белков известной специфичности позволяет судить об особенностях экспрессии гликанов в разных органах и тканях в норме, и их изменениях при

патологическом процессе и, следовательно, резюмировать о гликопатологии органа или клетки (Gabius H.-J., Kayser K., 2014).

Однако паттерны гликозилирования специфичны для клеток и тканей, и зависят от процесса, при котором они выявляются. Одной из наиболее распространенных причин изменений гликозилирования является воспаление, поскольку медиаторы воспаления индуцируют модификации гликозилирования клеток (Alves I. et al., 2022). В частности, было описано, что при воспалении, ассоциированном с ревматоидным артритом, провоспалительные цитокины инициируют изменения гликома синовиальных фибробластов (Wang Y. et al., 2021b). При воспалительной реакции в сосудах под влиянием IFN- γ в моноцитах происходит изменение экспрессии и активности фермента GnT-V и, соответственно, его продукта - β 1,6-связанного GlcNAc, что реализуется в усилении адгезии моноцитов к эндотелию сосудов и их трансмиграции (Yang H.-M., Yu C., Yang Z., 2012). Воспаление также сопровождается изменениями гликома эндотелия. При *in vitro* моделировании воспаления на линии эндотелиальных клеток было показано, что TNF α увеличивает экспрессию α 2,6-сиалогликанов (Willhauck-Fleckenstein M. et al., 2010). Воспалительная реакция и связанные с ней “медиаторы модифицируют программу гликозилирования в клетке: происходит синтез “усеченных” гипогликозилированных гибридных N-гликанов (Зиганшина М.М. и др., 2022а) на поверхности клеток, а также повышается уровень экспрессии генов” (Зиганшина М.М., 2016), ответственных за фукозилирование и сиалирование. Доказательства этому были получены лектиновой гистохимией по изменению окраски продукта гистохимической реакции в клетках в экспериментах *in vitro*. Изменения гликома ассоциировано с повышением их адгезии к эндотелию (Scott D. W., Patel R. P., 2013). Изменение паттернов гликозилирования клетки при воспалении предлагается рассматривать как сайт или «почтовый индекс» для навигации лейкоцитов с целью их рекрутирования в различные отделы сосудистого русла в ответ на провоспалительные стимулы (Wright R. D., Cooper D., 2014).

Изменения гликозилирования могут привести к нарушениям идентификации собственных (“своих”) гликанов, вызывая, модификации “SAMPs” и переход их в статус “DAMPs”. Установлено, что при вирусе гриппа происходит индукция экспрессии высокоманнозных гликанов в клетках человека, что распознается как паттерн для маннозо-связывающего лектина 2 (MBL2) и ведет к активации системы комплемента и развитию гиперэргических реакций воспаления (Heindel D. W. et al., 2020). Также известно, что инфекция, вызываемая *Helicobacter pylori* индуцирует гиперэкспрессию альфа-1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы (α 4GnT) в слизистой оболочке желудка, что

способствует колонизации этими бактериями и прогрессирующему воспалению (Matsuzwa M. et al., 2003).

С изменениями гликозилирования (гликопатологией) ассоциирована опухолевая трансформация клеток, причем изменения затрагивают “как N-, так и O-связанные гликаны (Pinho S. S., Reis C. A., 2015). Гиперэкспрессия фермента GnT-V и синтезируемых им β 1,6-GlcNAc разветвленных N-гликанов, оказывает ингибирующее влияние на ERK/MAPK сигнальный путь и стимулирует” (Зиганшина М.М., 2016) инвазию и развитие метастазов при раке желудочно-кишечного тракта (Guo H.-B. et al., 2003). Эти разветвленные N-гликаны, являются контрольной точкой иммунного ответа при колоректальном раке и их гиперэкспрессия предотвращает иммунное распознавание (за счет маскирования маннозобогатых гликанов, распознаваемых как сигнал “чужой” и вызывающих иммунный ответ) и способствуют уклонению опухоли от иммунного ответа, в частности, создавая иммуносупрессивное микроокружение путем ингибирования продукции $IFN\gamma$ (Pinho S. S., Reis C. A., 2015; Silva M. C. et al., 2020). Напротив, воздействие фермента маннозидазы ведет к демаскированию остатков маннозы, усилению воспалительной реакции, и способствует подавлению пролиферативного потенциала клетки, и замедлению роста опухоли счет связывания манногликанов с лектинами С-типа (MR и DC-SIGN), экспрессируемых макрофагами и ДК (Loke I. et al., 2016).

Необходимо отметить сложность и неоднозначность регуляции гликозилирования и его влияния на патофизиологические процессы в организме. Приведенный выше пример маскирования маннозобогатых гликанов при онкотрансформации свидетельствует о негативном влиянии этого процесса на развитие противоопухолевого иммунного ответа и прогрессу заболевания. Однако маннозобогатые гликаны иммуногенны и показана их роль в индукции аутоиммуноподобного заболевания (похожего на СКВ) у мышей (Зиганшина М.М. и др., 2019). Дефицит альфа-маннозидазы-II (α -M-II) у животных вызывает повышение иммуностимулирующих маннозобогатых гликанов, которые, являясь лигандами для лектиновых рецепторов клеток врожденного иммунитета, вызывают реакции развития стерильного воспаления с соответствующей клинической картиной. Таким образом, разветвление “N-гликанов за счет активности фермента GnT-V, способствует маскированию эндогенных сигналов чужеродности (Green R. S. et al., 2007), но ведет к развитию иммуносупрессии, поскольку биосинтез β 1,6-GlcNAc-разветвленных гликанов, которые в терминальной части имеют остатки сиаловой кислоты” (Зиганшина М.М., 2016), ингибирует функции эффекторных Т-клеток и индуцирует *de novo* генерацию T(reg)-клеток благодаря связыванию с сиглеками (Perdicchio M. et al., 2016).

В литературе неоднократно встречается термин “гликопатология”, применяемый при нарушении О-маннозилрования (добавление специфической маннозилтрансферазой остатка α -маннозы - по кислороду серина или треонина в акцепторном белке), которое ассоциировано с генетическими заболеваниями – мышечными дистрофиями (Endo T., 2019). Отмечается особая роль О-маннозилрования в регуляции функции α -дистрогликана (α -DG), кадгеринов, протокадгеринов и плексина (Hang J. et al., 2022). Однако это единственный пример использования этого термина для описания патофизиологического процесса.

Некоторые углевод-зависимые иммунные реакции, которые выявляются при онкологических заболеваниях различной локализации, а также при инфекционных, воспалительных и аутоиммунных заболеваниях подробно описаны в обзоре (Alves I. et al., 2022). В репродукции, как отмечалось выше (см. разделы 1.2.2. и 1.2.3.), есть отдельные исследования, свидетельствующие об изменениях гликотипа плаценты при осложненной беременности, а также гликотипа эндометрия (Awoyemi T. et al., 2020; Ziganshina M.M. et al., 2017; Ziganshina M.M. et al., 2021). Обсуждаются иммунные реакции клеточного и гуморального иммунитета, которые участвуют в развитии толерантности к плоду, но без акцентов на гликаны и углевод-связывающие свойства их рецепторов на иммунных клетках. Но единой концепции, описывающей развитие гликопатологии в системе мать-плацента-плод не сформулировано, что ограничивает понимание патофизиологии осложненной беременности.

Таким образом, в настоящее время, развитие иммунологической толерантности при беременности достаточно широко изучено в аспекте клеточных и гуморальных механизмов, участвующих в формировании этого феномена. Однако молекулярные механизмы, относящиеся к области углевод-белковых взаимодействий, исследованы ограничено, несмотря на то, что в других областях иммунологии накоплено достаточно фактов, свидетельствующих, что гликаны и гликан-связывающие белки являются ключевыми участниками межклеточных взаимодействий и регуляторами иммунных реакций. Наблюдается фрагментарность данных и отсутствие четко изложенной и аргументированной концепции, основанной на доказательстве взаимосвязанных процессов в плаценте и на системном уровне, которые регулируют развитие толерантности к плоду с акцентом на гликан-опосредованных взаимодействиях. В частности, фрагментарно описан углеводный фенотип клеток и структур фетоплацентарного комплекса в норме, и при патологии плаценты, которая ассоциирована с развитием БАС, связанных с дефектами плацентации (Зиганшина М.М. и др., 2019). В настоящее время не представлено достаточно

доказательств наличия конкретных углеводных структур в фето-плацентарной системе, выступающих в роли мишеней для блокирующих или патогенетических антител, взаимодействие с которыми инициирует эффекторные или регуляторные иммунные реакции. Отсутствуют данные о связи АгАТ с развитием патологии беременности и перинатальными осложнениями. Всестороннее изучение данной темы будет являться серьезным вкладом в иммунологию репродукции и послужит основой для поиска новых биомаркеров, которые будут востребованы в клинической практике.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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-морфологического 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 или из иммуноглобулинового препарата 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 EAy.926. В ткани плаценты оценивался профиль экспрессии иммунных факторов, регулирующих развитие толерантности к аллоантигенам (Рисунок 4).

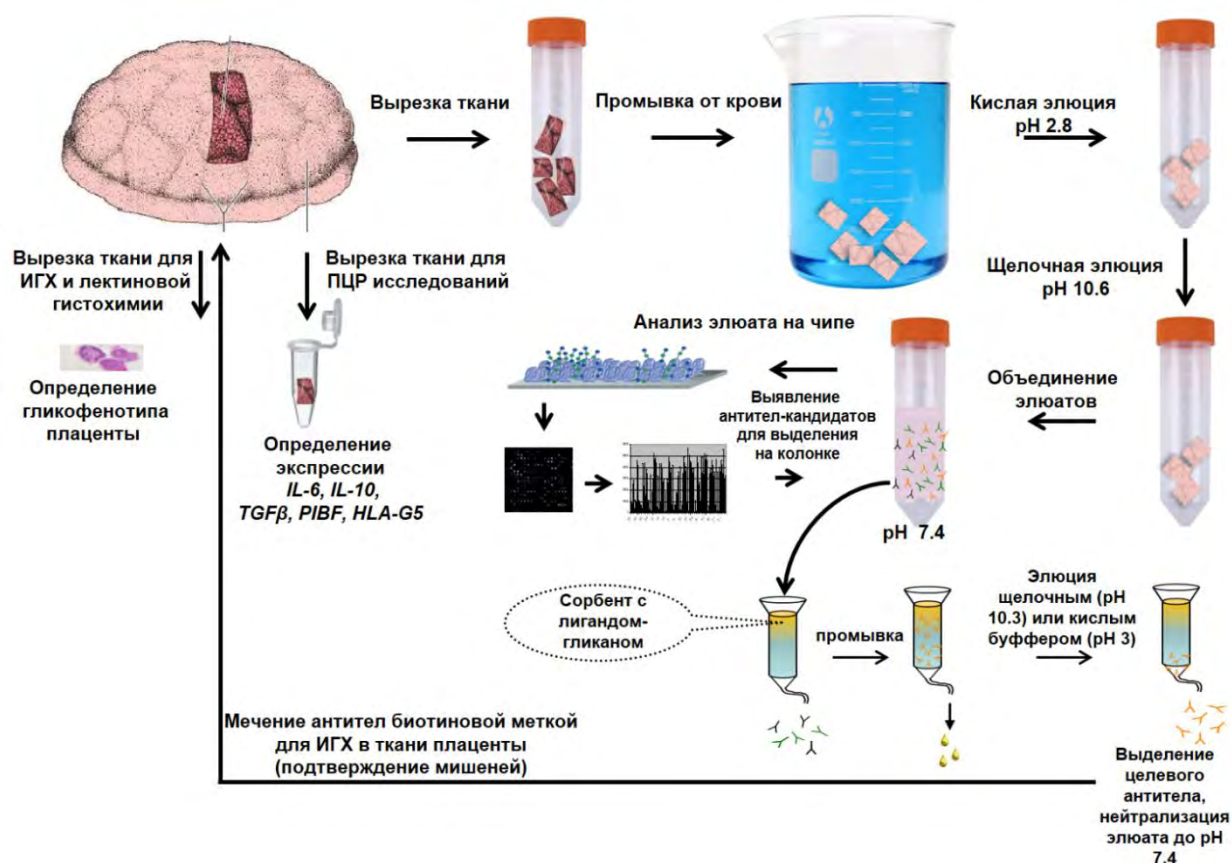


Рисунок 4. Исследование гликопатологии плаценты, включающее: изучение экспрессии мРНК генов факторов, регулирующих толерантность и связанных с гликозилированием, исследование гликотипа ткани плаценты, выделение и экспериментальное исследование пЛАгАТ и подтверждение их мишеней в плаценте (схема).

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 (Рисунок 5).

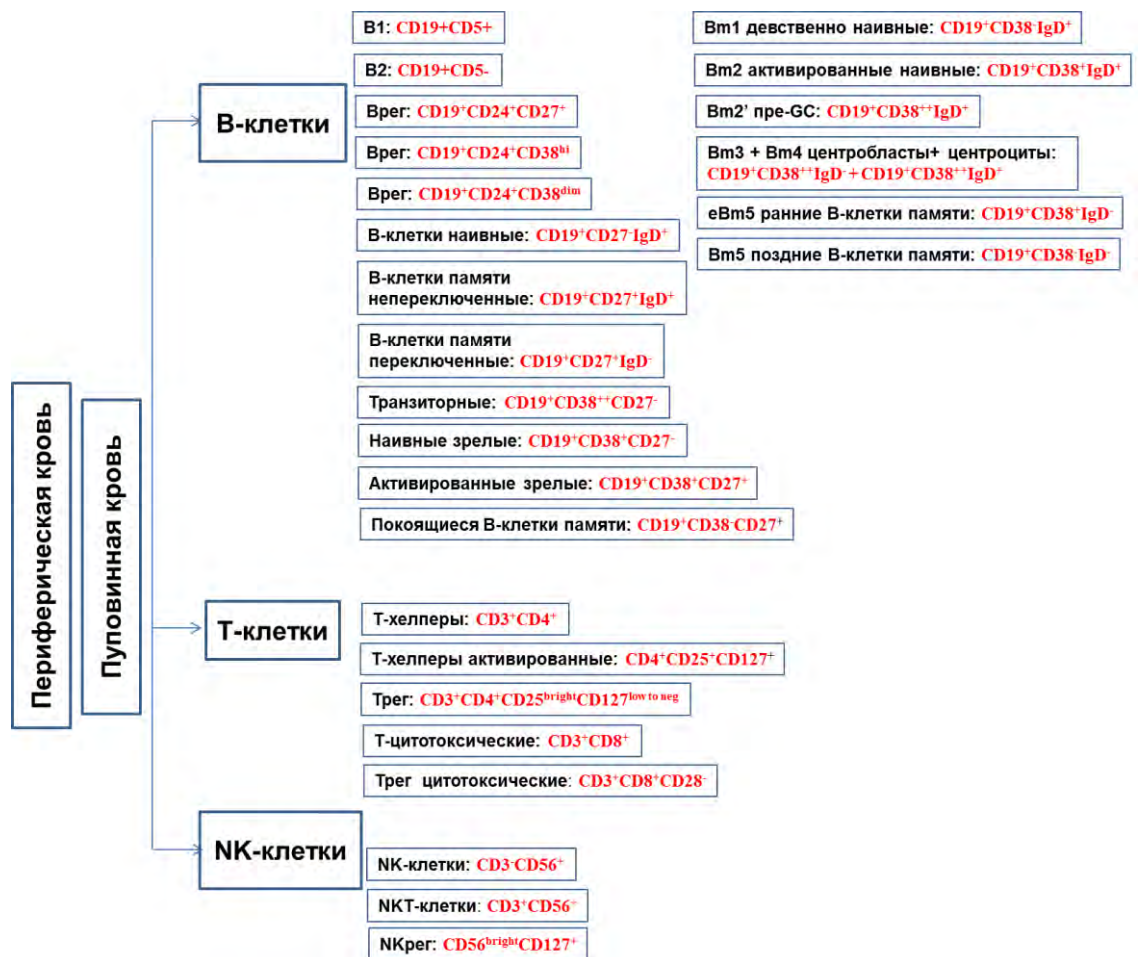


Рисунок 5. Субпопуляционный состав и фенотипы клеток иммунной системы периферической пациенток с физиологической и осложненной развитием ПЭ беременностью и пуповинной крови их новорожденных, исследованные в данной работе.

3. Изучение комплекса гуморальных факторов иммунитета (антител, цитокинов, гормонов). Выполнялось исследование:
 - а) АгАТ периферической крови при плацента-ассоциированных осложнениях беременности для выявления гликопатологии, специфичной для ПЭ и ЗРП. Проводилось комплексное исследование представительного спектра 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. (Рисунок 6).

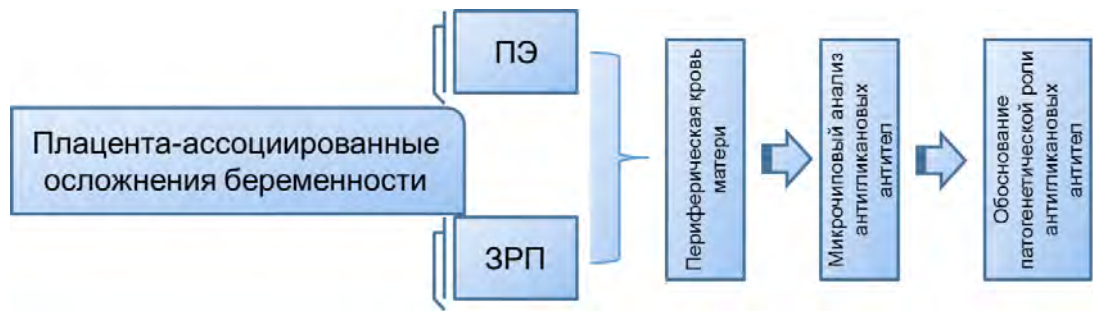


Рисунок 6. Этапы исследования, обосновывающие патогенетическую роль АгАТ при плацента-ассоциированных осложнениях беременности.

- 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 (Рисунок 7).



Рисунок 7. Этапы исследования, обосновывающие развитие гликопатологии у матери и младенца.

- 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.

2.1. Организация работы, объем и дизайн исследования

Клинической базой для решения поставленных задач явились: 1-е акушерское физиологическое отделение и 1-е акушерское отделение патологии беременности ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России (ФГБУ НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова МЗ РФ).

Экспериментальная работа выполнялась в лаборатории клинической иммунологии (руководитель лаборатории – д.м.н. Кречетова Л.В.), 2-м патолого-анатомическом отделении (руководитель – д.м.н., проф. Щеголев А.И.), клинко-диагностической лаборатории (руководитель – д.м.н. Иванец Т.Ю.), лаборатории онкологической генетики Института репродуктивной генетики (руководитель – д.б.н. Бурменская О.В. и д.б.н., чл-корр. РАН Трофимов Д.Ю.) ФГБУ НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова МЗ РФ. Часть экспериментальных исследований проводилось совместно с отделом химической биологии гликанов и липидов (руководитель д.х.н., проф. Бовин Н.В.) ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук (ФГБУН ГНЦ ИБХ РАН). Исследование было одобрено Комиссией по этике биомедицинских исследований Центра (протокол №3 от 21.03. 2019 г.). Каждая пациентка, включенная в исследование, подписывала добровольное информированное согласие на участие в исследовании и обработку персональных данных по одобренному комиссией образцу.

В соответствии с поставленными задачами в исследование были включены 399 проспективно обследованных пациенток II-го и III-го триместров беременности, поступившие в ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России, для пролонгирования беременности или родоразрешения.

Для решения задач 1-5 и 9 проводилось одномоментное исследование в параллельных группах (Рисунок 8). Объем выборки составил 153 человек (67 беременные второго и 86 беременных третьего триместра). Группу сравнения составили 15 условно-здоровых беременных II-го и 38 – III-го триместров беременности. В основную группу вошли 71 пациентки с ПЭ (37 беременные II-го и 34 – III-го триместров) и 29 беременных с ЗРП (15 беременных II-го и 14 - III-го триместров).

Для решения задачи 6, 7 и 9 проводилось одномоментное исследование в параллельных группах на расширенной выборке (Рисунок 9). Объем выборки составил 311 пациенток. Группу сравнения составили 81 условно здоровая беременная пациентка (17 пациенток II-го и 64 пациенток III-го триместров). В основную группу вошли 230 пациенток, из которых 47 с диагнозом ЗРП (15 пациенток II-го и 32 пациентки III-го триместров) и 183 беременных с гипертензивными расстройствами во время беременности (30 пациенток с тяжелой ПЭ II-го триместра; 153 пациентки III-го триместра: 21 пациентка с тяжелой ПЭ III-го триместра; 57 пациенток с умеренной ПЭ III-го триместра; 38 пациенток с хронической (ХАГ) и 37 с гестационной артериальной гипертензией (ГАГ).



Рисунок 8. Выборка пациенток и схема экспериментального исследования к задачам 1-5, 9.

Дизайн исследования к задачам 6, 7 и 9

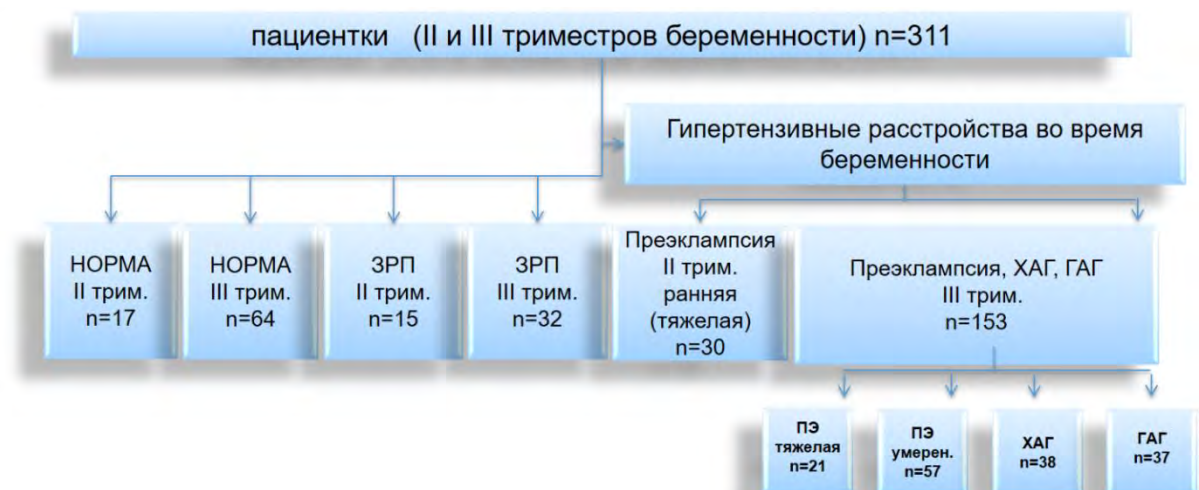


Рисунок 9. Выборка пациенток, включенных в группы исследования.

Дизайн исследования к задаче 8.

Экспериментальное исследование. Дизайн представлен на Рисунке 10.



Рисунок 10. Схема исследования углеводной специфичности галектинов человека (галектина -1,-2,-3,-4,-7,-8,-9)

Критерии включения в исследование:

Для всех групп:

- ✓ Одноплодная беременность, наступившая в естественном цикле;
- ✓ Возраст 18-40 лет;
- ✓ Информированное согласие на включение в исследование

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 ЭКО, ИКСИ, донации ооцита, эмбриона, суррогатное материнство;
- резус конфликт в настоящей беременности;
- острые и хронические воспалительные и вирусные заболевания;
- тяжелая экстрагенитальная патология;
- вращение плаценты;
- хромосомные аномалии у плода;
- дисплазия соединительной ткани;
- трансплантации внутренних органов и гемотрансфузии в анамнезе;
- иммунотерапия: лимфоцитиммуноотерапия, иммуноглобулинотерапия;
- прием ЛС, влияющих на выработку или маскировку аутоиммунных антител.

Беременные включались в исследование по методу подбора пар. Основными критериями для подбора “контролей” для каждого “случая”, включенного в данную выборку явились: возраст беременной, срок беременности, ИМТ. На каждом этапе в

исследование для решения поставленных задач было включено разное число “случаев”, но принцип подбора “контролей” соблюдался в соответствии с указанными критериями, как описано аналогично работам, выполненным в нашем коллективе (Долгополова Е.Л., 2023).

Материал исследования

Материалом исследования служила сыворотка периферической крови матери, сыворотка пуповинной крови и ткань плаценты. Забор периферической крови проводился из локтевой вены в утренние часы натощак, стандартно. Пуповинную кровь забирали при кесаревом сечении. Образцы сыворотки крови хранили при температуре -80°C в течение 2 лет.

Ткань плаценты исследовалась после оперативных родов. Забор ткани плаценты осуществлялся в течение 30 мин. после кесарева сечения. Из парацентральной зоны материнской части плаценты вырезались фрагменты ткани размером $0,5 \times 0,5$ см и помещались в криопробирки SARSTEDT (Германия) объемом 2,0 мл со средой для стабилизации мРНК RNeasy Protect Tissue Reagent (Qiagen, Германия) и хранили при температуре -80°C в течение 2 лет для ПЦР-исследований, как описано аналогично в работах нашего коллектива (Мантрова Д.А., 2020). Из аналогичных областей плаценты вырезались образцы ткани весом около 20 гр, удалялись кровеносные сосуды и сгустки крови, ткань помещалась в пластиковые пробирки SARSTEDT (Германия) объемом 50,0 мл и замораживались при температуре -80°C для последующей элюции антител из ткани плаценты. Для иммуно- и лектиновой гистохимии вырезали образцы из парацентральной области плаценты и изготавливали парафиновые блоки по стандартному протоколу для морфологических исследований для последующего окрашивания.

2.2. Стандартные методы исследования (Общеклинические, клинико-лабораторные и инструментальные методы)

Проведено комплексное обследование беременных, которое включало клиническое, гормональное, биохимическое, ультразвуковое и доплерометрическое обследование с учетом специфики каждого диагноза, как описано аналогично в работах нашего коллектива (Долгополова Е.Л., 2023). Использовались общепринятые методы: сбор анамнестических данных и общелабораторные исследования. При сборе анамнеза особое внимание обращалось на наличие клинических признаков иммунопатологических состояний.

Срок гестации вычисляли согласно информации о дате последней менструации и подтверждали с помощью данных ультразвукового (УЗ-) исследования. УЗ-исследования, выполненные в первом триместре, считали наиболее точным методом для определения

срока беременности (Practice Bulletin No. 134, 2013; Committee Opinion No 700: Methods for Estimating the Due Date, 2017).

“Диагноз задержка роста плода и дифференциация гипертензивных расстройств во время беременности проводились по МКБ-10 и клиническим рекомендациям. Измерение АД производилось по методу Н.С. Короткова ртутным тонометром в состоянии покоя после короткого (5 мин) отдыха пациентки 2 раза с интервалом не менее минуты на двух руках. При фиксировании различий между значениями 5 мм рт ст и более, производилось дополнительное измерение с усреднением двух первоначальных измерений. Учитывались более высокие значения. На основании степени повышения АД и выраженности протеинурии устанавливался диагноз из группы гипертензивных расстройств во время беременности.

ХАГ определяли как эссенциальную гипертензию без “установленной причины, с систолическим артериальным давлением выше или равным 140 мм рт ст, и/или диастолическим 90 мм рт. ст., возникшую до беременности или ранее 20 полных недель беременности. ГАГ определяли как гипертонию после 20-й недели беременности без протеинурии, симптомы которой исчезали после родов. ПЭ определялась как артериальная гипертензия после 20 недели беременности в сочетании с протеинурией $\geq 0,3$ г/л в суточной моче, отеками и проявлениями полиорганной /полисистемной недостаточности. Диагноз умеренная ПЭ ставился при систолическом артериальном давлении (САД) ≥ 140 мм рт.ст. или диастолическом артериальном давлении (ДАД) ≥ 90 мм рт.ст., проявившемся после 20-й недели беременности у женщин без артериальной гипертензии, протеинурии $\geq 0,3$ г/л. Критерии тяжелой ПЭ были следующие: САД ≥ 160 мм рт.ст. или ДАД ≥ 110 мм рт. ст. при двух измерениях в состоянии покоя с интервалом 6 ч; протеинурии ≥ 5 г/л в суточной моче или > 3 г/л в серии образцов мочи взятых с интервалом 6 часов; олигурии < 500 мл в течение 24 ч; нарушениях зрения, церебральных симптомах, отеке легких/легочной недостаточности, цианозе, нарушении функции печени, тромбоцитопении ($< 100 \times 10^6$ /л) и ЗРП” (Долгополова Е.Л., 2023). Точкой отсечки для ранней и поздней ПЭ считали срок беременности 34 недели”, как описано в аналогичных работах нашего коллектива (Долгополова Е.Л., 2023; Зиганшина М.М., 2016; Мантрова Д.А., 2020; Тютюнник Н.В., 2019).

Пренатальная диагностика ЗРП осуществлялась на основании УЗ- исследования на аппаратах «Aloka SSD-680» и «Toshiba-38A» (Япония) и доплерометрии маточно-плацентарного и фето-плацентарного кровотока на аппаратах «Aloka SSD-680» и «Aloka SSD-2000» (Япония). УЗ- исследование включало биометрию с определением

предполагаемой массы плода согласно формуле Hadlock (Hadlock F.P. et al., 1985), определение количества околоплодных вод и степени зрелости плаценты. При доплерометрии проводилась оценка кровотока в маточных артериях, пупочной артерии, средней мозговой артерии и определение церебро-плацентарного соотношения. Допплерометрия средней мозговой артерии и определение церебро-плацентарного соотношения играют важную роль для оценки состояния плода и выявления хронической гипоксии в случае нормальных показателей доплерометрии пупочной артерии (Oros D. et al., 2011). Диагноз ЗРП ставился при предполагаемой массе плода < 10-ого перцентиля, согласно общепринятой точке зрения (Boers K.E. et al., 2010; Lausman A. et al., 2013; Lees C. et al., 2013; Lees C.C. et al., 2020; Practice Bulletin No. 134, 2013). Также (Gordijn S. J. et al., 2016), при постановке диагноза ЗРП, учитывались показатели доплерометрии и индекс амниотической жидкости. Точкой отсечки для диагностики ранней и поздней форм ЗРП считали срок гестации 32 недели (Figueras F., Gratacós E., 2014). Постнатальная диагностика маловесных к сроку гестации новорожденных осуществлялась на основании общепопуляционных центильных таблиц и кривых роста Фентона для недоношенных с учетом пола новорождённых, а также данных клинического обследования (Fenton T. R. et al., 2013). С 32 недели для оценки состояния плода проводили антенатальную кардиотокографию на аппаратах 8030А фирмы «Hewlett Packard» (США), МТ-801 фирмы «Тоити 44» (Япония) и многофункционального монитора «Феталгарт-2000».

2.3. Специальные методы исследования

2.3.1. Морфогистохимические методы

Исследования плаценты проводились в нескольких аспектах, которые включали: 1) патогистологическое исследование плаценты, проводимое для подтверждения диагнозов плацента-ассоциированных осложнений беременности и выбора фрагментов ткани плаценты для дальнейших исследований; 2) лектиновую гистохимию и иммуногистохимию плаценты, проводимые для выявления патогенетически обусловленных изменений плацентарной ткани при плацента-ассоциированных осложнениях беременности. Лектиновая гистохимия и иммуногистохимия плаценты проводились как стандартным методом на срезах ткани, расположенных на стеклах, так и с использованием метода подготовки тканевых матриц (ТМА). Проводилась окраска ткани плаценты с использованием панели коммерческих биотинилированных лектинов фирмы Vector Labs, США; лектина из условно-патогенной бактерии *Burkholderia cenocepacia*, который был выделен, охарактеризован и предоставлен Anne Imberty (French National Centre for Scientific

Research, Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales); моноклональных антител (клон 12-4LE), предоставленные проф. J. Bara (CNRS, Laboratoire d'Immunochimie des mucines, Villejuif, Франция). Для подтверждения в плаценте мишеней для аффинно выделенных из препарата “Иммуноглобулин человека нормальный” (“Микроген НПО”, Россия) и охарактеризованных антител было проведено ИГХ исследование по особому протоколу (изложен ниже), в котором проводилась стадия демаскирования углеводных антигенов белковыми молекулами, включая антитела. Протоколы исследований приведены ниже.

- Патогистологическое исследование плаценты

Исследование плаценты проводили в соответствии с принципами, принятыми Амстердамским консенсусом в 2016 г. “Проводилась макро- и микроскопическая оценка последа (плодных оболочек и пуповины) для верификации диагнозов ПЭ и ЗРП, полученных в результате клинико-лабораторного обследования. Плаценту взвешивали без экстраплацентарных оболочек и пуповины, отмечали наличие и объем макроскопических патологических изменений. Для гистологического исследования вырезали фрагменты ткани через все отделы плаценты размерами 1,5х1х0,3 см (включающие ворсинчатый хорион, базальную и хориальную пластинки), полученные не позднее 5-10 мин. после кесарева сечения, фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине (Biovitrum, Россия) в течение 24 ч. После стандартного протокола проводки материал заливали в парафин по стандартной методике, изготавливали ступенчатые срезы толщиной 4 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином для микроскопической обзорной оценки препаратов и подбора образцов без кальцификатов и инфарктов для гистохимического исследования.

Исследовались не менее 7 “фрагментов плаценты (3 из центральной, 2 из парацентральной и 2 из периферической зон), включающих хориальную, базальную пластинки, а также по 2 образца пуповины и экстраплацентарных оболочек. Микроскопическое исследование включало обзорный анализ препаратов ткани плаценты, окрашенных гематоксилином и эозином. Отмечалось наличие или отсутствие патологических изменений: лимфоидной инфильтрации, оценивалась структура ворсинчатого дерева, а также количество синцитиальных почек, синцитио-капиллярных мембран, наличие или отсутствие инфарктов” (Мантрова Д.А. 2020), кровоизлияний, отложений солей кальция. В иммуно- и гистохимическое исследование включались образцы тканей плаценты с, не содержащие патологических изменений. Основным

методом, используемым в работе, был стандартный метод окрашивания срезов, расположенных на стеклах Superfrost plus (Menzel, Braunschweig, Germany) (Рисунок 11 А)”, как описано в аналогичных работах нашего коллектива (Зиганшина М.М., 2016; Мантрова Д.А., 2020). Также, на небольшой выборке, был использован метод окрашивания тканевых матриц (ТМА) (Рисунок 11 Б).

- Изготовление тканевых матриц

Методом тканевых матриц было исследовано по 2 образца плацентарной ткани от 10 пациенток с физиологической беременностью и по 2 образца от 10 пациенток с ЗРП. На окрашенных гематоксилином и эозином парафиновых срезах толщиной 4 мкм проводили обзорное микроскопическое исследование с целью исключения патологических участков: кровоизлияний, инфарктов, отложений фибриноида, кальцификатов. Отмечали участки, которые можно использовать для изготовления ТМА. Из каждого образца забирали по два фрагмента тканей для увеличения репрезентативности выборки данных. ТМА блоки изготавливали в соответствии с общепринятыми методами (Fowler C. B. et al., 2011).

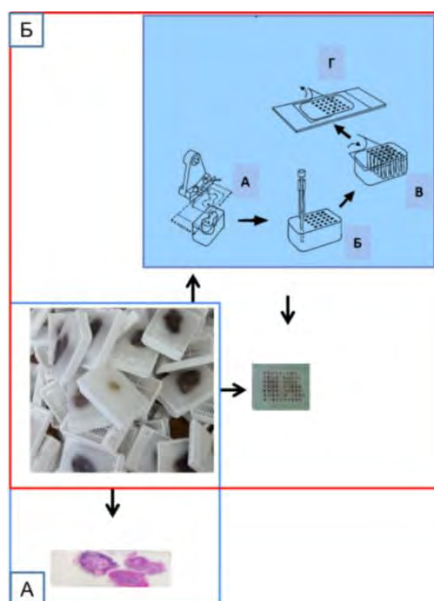


Рисунок 11. Схема исследования плацентарной ткани стандартным методом окрашивания срезов, расположенных на стеклах – синий блок (А), и методом тканевых матриц – красный блок (Б).

- Моноклональные антитела и лектины, использованные в анализе

Определение гликотипа плацентарной ткани проводилось с помощью панели растительных и бактериальных лектинов и моноклональных антител с известной углеводной специфичностью. Для лектиновой гистохимии, выполненной стандартным методом на срезах ткани, расположенных на стеклах, использовали лектины фирмы Vector Labs, США (Таблица 5). Методика окрашивания ткани и характеристика специфичности

лектинов представлена в руководстве по лектиновой гистохимии на сайте:
<https://go.vectorlabs.com>

Таблица 5. Характеристика специфичности лектинов, используемых в исследовании

№ п/п	Название лектина	Углеводная специфичность
1	MAL II (<i>Maackia amurensis</i> Lectin II)	2-3SiaLN (NeuNAc α 2,3Gal β 1-)
2	SNA (<i>Sambucus nigra</i> agglutinin)	2-6SiaGal (NeuNAc α 2,6Gal/GalNAc-)
3	ConA (Concanavalin A)	Остатки α -маннозы – связанные с коровыми гликанами; маннозобогащенные четырехантенные гликаны, коровые олигоманнозные N-гликаны; N-гликаны гибридного типа; двухантенные N-гликаны комплексного типа (не связывает три- и тетра-антенные N-гликаны олигоманнозного типа)
4	UEA-1 (<i>Ulex europaeus</i> agglutinin-I)	Остатки α -фукозы (L-Fuc α 1,2Gal β 1,4-GlcNAc β 1-) гликан Н тип 2 и гликан Le ^y
5	LTL (<i>Lotus tetragonolobus</i> lectin)	Терминальные остатки α -фукозы (Fuc α 1,6GlcNAc>Fuc α 1,2Gal β 1,4(Fuc α 1,3)-GlcNAc β , преимущественно в кластерах)
6	AAL (<i>Aleuria aurantia</i> lectin)	Остатки α -фукозы в положении α 1,6 к N-ацетилглюкозамину; α - фукоза в положении α 1,3 к структурам, родственным ацетиллактозамину; фукоза, связанная с нуклеиновыми кислотами; α 1,2, - α 1,4 остатки фукозы
7	ECA, ECL (<i>Erythrina cristagalli</i> agglutinin)	Лактозамин и терминальные остатки 1,4-связанной галактозы (Gal β 1,4GlcNAc β 1-; Gal)
8	GSL-I (<i>Griffonia simplicifolia</i> lectin-I)	Остатки α -галактозы и α GalNAc (N-ацетилгалактозамина) углеводные субъединицы В и А антигенов эритроцитов группы крови В и А, соответственно
9	GSL-II (<i>Griffonia simplicifolia</i> lectin-II)	Остатки α - или β -связанного ацетилглюкозамина (α -/ β -GlcNAc) на нередуцирующих терминальных гликанах
10	VVL (<i>Vicia villosa</i> lectin)	Связывает терминальные остатки α -/ β -GalNAc, особенно единичные остатки α - GalNAc связанные с серином или треонином (GalNAc α 1-Ser/ Thr, Tn-антиген) и остатки GalNAc α 1,3Gal β 1-
11	SBA (<i>Soybean</i> agglutinin)	Терминальные остатки GalNAc α / β - >Gal α -
12	DSL (<i>Datura Stramonium</i> Lectin)	β -1,4 связанные олигомеры N-ацетилглюкозамина (GlcNAc) _n , n=1-4, Gal β 1,4GlcNAc; преимущественно хитобиоза или хитотриоза а не единичные остатки GlcNAc; три- и тетра- антенные комплексные N-гликаны комплексного типа
13	WGA (Wheat Germ Agglutinin)	Терминальные остатки GlcNAc-; хитобиоза; (GlcNAc) _n , n=1-3 (преимущественно димеры или тримеры); остатки Neu5Ac

Для ТМА исследований были использованы анти-Lewis^Y (anti-Le^Y) моноклональные антитела (МАт) (клон 12-4LE, специфически связывающие углеводный антиген Lewis^Y (Le^Y) ((Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β -R)), предоставленные проф. J. Bara (CNRS, Villejuif, Франция). Биотинилированный растительный лектин *Ulex Europaeus* Agglutinin-I (UEA-I, специфичный к углеводным структурам с кором типа 2 Gal β 1-4GlcNAc β -, в том числе гликану Н тип 2: Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc β - и гликану Le^Y) (Vector laboratories, Perterborough, UK). Бактериальный лектин из условно-патогенной бактерии *Burkholderia cenocepacia* (BC2L-C-Nter, специфически связывающий углеводные структуры с кором типа 1 (Gal β 1-3GlcNAc β -)), биотинилированный с использованием EZ-link sulfo-NHS-LC-biotinylation kit from Pierce (Thermo Fisher Scientific) был предоставлен доктором A. Imberty (CNRS, Гренобль, Франция).

Для выявления мишеней АГАТ в плаценте были аффинно выделены антитела из аптечного препарата “Иммуноглобулин человека нормальный” производства фирмы “Микроген НПО”, Россия. Протокол аффинного выделения антител и подтверждения их специфичности проведены в данном исследовании и представлены ниже в разделе 2.3.3.

• Позитивные и негативные контроли для лектинов и моноклональных антител

Контрольное окрашивание (отрицательный контроль) проводили путем постановки параллельных реакций, в которых вместо лектинов и МАт вносился буфер PBS. Также проводилась инкубация с лектинами и МАт в присутствии избытка их конкурирующего сахара (Таблица 6). В качестве позитивного контроля, в образцах ткани которого должно быть получено окрашивание исследуемого антигена, использовали образцы зрелой плаценты при физиологической беременности (для UEA-I и Le^Y) и ткани карциномы легкого (для BL2LC-Nt).

В случае окраски ткани плаценты лектинами (MAL-II, SNA, ESL, WGA, SBA, VVL, GSL-I) проводилась параллельное окрашивание с предварительной обработкой ткани плаценты ферментом нейраминидазой (Neuraminidase from *Vibrio cholerae* Type III, Sigma-ALDRICH, США) для демаскирования остатков гликанов, специфически окрашиваемых лектинами. Стадию обработки нейраминидазой (50 мк.ед/мл в буферном растворе PBS) проводили до стадии окраски соответствующим лектином.

Таблица 6. * Ингибирующие сахара и ферменты, используемые для постановки отрицательных контролей при выполнении лектиновой гистохимии

№ п/п	Лектин	Конкурирующий сахар	Фермент
1	MAL II (<i>Maackia amurensis</i> Lectin II)	Гликофорин человеческий	нейраминидаза

№ п/п	Лектин	Конкурирующий сахар	Фермент
2	SNA (<i>Sambucus nigra</i> agglutinin)	Лактоза в забуференном солевом растворе+ацетиловая кислота	нейраминидаза
3	ConA (Concanavalin A)	α -Метилманнозид+ α -Метилглюкозид (Me α Man+ Me α Glc)	
4	UEA-1 (<i>Ulex europaeus</i> agglutinin-I)	L-фукоза (L-Fuc)	
5	LTL (<i>Lotus tetragonolobus</i> lectin)	L-фукоза (L-Fuc)	
6	AAL (<i>Aleuria aurantia</i> lectin)	L-фукоза (L-Fuc)	
7	ECA, ECL (<i>Erythrina cristagalli</i> agglutinin)	Лактоза	нейраминидаза
8	GSL-I (<i>Griffonia simplicifolia</i> lectin-I)	Галактоза/N-ацетилгалактозамин (Gal/GalNAc)	нейраминидаза
9	GSL-II (<i>Griffonia simplicifolia</i> lectin-II)	Гидролизат хитина/N-ацетилглюкозамин (GlcNAc)	
10	VVL (<i>Vicia villosa</i> lectin)	GalNAc	нейраминидаза
11	SBA (Soybean agglutinin)	GalNAc	нейраминидаза
12	DSL (<i>Datura Stramonium</i> Lectin)	Гидролизат хитина или GlcNAc с кислотой или солью	
13	WGA (Wheat Germ Agglutinin)	Гидролизат хитина или	нейраминидаза

* рекомендации по использованию отрицательных контролей выполнены в соответствии с руководством по лектиновой гистохимии, представленном на сайте: <https://go.vectorlabs.com>

- Лектиновая гистохимия и иммуногистохимия (основной протокол)

Окрашивание срезов ткани проводилось с использованием панели биотинилированных лектинов (Таблица 5). Для окрашивания ТМА блоков использованы лектины UEA-I, BC2L-C-Nter и первичные, неконъюгированные анти-Le^Y антитела (Зиганшина М.М. и др., 2019). Процедура и стадии обработки ткани для иммуно- и гистохимии на стеклах и ТМА блоках были одинаковы. “Парафиновые блоки были депарафинизированы в ксилоле, с последующим перенесением в спирт нисходящей концентрации (95%, 80%, и 70%) и последующей ре-гидратацией в фосфатном буферном растворе (PBS, pH 7,4). После депарафинизации стекла были обработаны 3% перекисью водорода. Для блокирования неспецифического связывания углеводсвязывающих белков с тканью, стекла и ТМА блоки выдерживали 60 мин при комнатной температуре в 3%-ном

растворе BSA”, как описано по стандартной методике (Трифорова Н.С., 2020). Перед нанесением первичных антител/лектинов белковый блок удаляли с поверхности срезов процедурой промывки с PBS. “Далее срезы инкубировали с раствором биотинилированных лектинов или первичных антител в течение 60 мин. при комнатной температуре. После промывания стекол и ТМА блоков раствором PBS, их инкубировали с конъюгатом авидин-пероксидаза хрена (Vector Laboratories, Burlingame, CA) (1:1000 в 1% BSA в PBS) в течение 60 мин. при комнатной температуре для детекции лектинов, меченых биотиновой меткой. Для детекции Le^Y антигена слайды инкубировались с биотинилированными кроличьими антителами против мыши (Interchim-Uptima, Франция), разведенными 1:1000 в PBS в течение 60 мин. Визуализацию структур плаценты, связывающих лектины и антитела, проводили в системе 0,02%-ный раствор 3,3'-диаминобензидина (ДАБ) (Spring Bioscience, USA) в течение 3 минут при окрашивании стекол” (Зиганшина М.М., 2016), как описано по стандартному протоколу, представленному в (Зиганшина М.М., 2016). В случае окрашивания блоков ТМА добавляли свежеприготовленный раствор субстрата АЕС (3-amino-9-ethyl-carbazole, Vector Laboratories). Позитивные клетки имели коричневое (в случае использования ДАБ), и красновато-коричневое (в случае использования АЕС) окрашивание. После проведения ИГХ и гистохимических реакций срезы контрастировали гематоксилином и заключали в водную среду Aquatex.

- Иммуногистохимия с аффинно выделенными из аптечного препарата анти-Gal⁺ антителами (протокол с демаскировкой поверхностных антигенов)

Для ИГХ исследования использовали депарафинированные и дегидратированные срезы плаценты и тканей легкого мыши (как положительный контроль, поскольку в ткани легкого мыши экспрессированы αGal-эпитопы), которые обрабатывали раствором 4М гидрохлорида гуанидина в 50мМ TRIS (pH=8,5) (с целью удаления ковалентно несвязанных с поверхностными структурами молекул, поскольку предполагается связывание антител с углеводными эпитопами, которые их маскируют) и инкубировали 30 мин. при 37°C для удаления белковых молекул, включая антитела, которые могут маскировать углеводные остатки. Далее срезы промывали раствором PBS, выдерживали 15 мин. при комнатной температуре с раствором Peroxide Block (Cell Marque, США) для блокирования эндогенной пероксидазы с последующим промыванием срезов раствором PBS. Далее проводилась инкубация срезов со Streptavidin/biotin blocking kit (SP-2001, Vector Laboratories, США), в соответствии с протоколом производителя. Для блокирования

неспецифического связывания, срезы дополнительно инкубировали с блокирующим раствором Carbo-Free™ (SP-5040, Vector laboratories, США) в течение 30 мин. при комнатной температуре. После промывания срезов раствором PBS добавляли биотинилированные анти- α Gal антитела (20 мкг/мл) и инкубировали 30 мин. при комнатной температуре. После промывания раствором PBS срезы инкубировали 30 мин. при комнатной температуре с VECTASTAIN® ABC (PK-6100, Vector laboratories, США), согласно инструкции производителя, представленном на сайте <https://go.vectorlabs.com>. После промывания раствором PBS на срезы добавляли осаждающий субстрат ImmPACT™ DAB (SK-4105, Vector laboratories, США) в разведении, рекомендуемом в инструкции производителя, и инкубировали 5 мин. при комнатной температуре. На заключительном этапе срезы промывали проточной водой, и окрашивали гематоксилином Майера. Для доказательства взаимодействия анти- α Gal антител с α Gal-эпитопом вводили дополнительную стадию, для чего срезы тканей до окраски антителами обрабатывали раствором фермента альфа-галактозидазы в TRIS HCl (pH=6,5) и инкубировали 145 мин., 25°C. В качестве отрицательного контроля рассматривались срезы ткани, окрашенные по приведенному протоколу без обработки ферментом альфа-галактозидазой с заменой антитела на раствор PBS.

- Оценка результатов иммуно- и лектиновой гистохимии на ТМА блоках

“После иммуно/гистохимического окрашивания срезов плаценты, расположенных на стеклах, оценивали выраженность экспрессии гликоконъюгатов по интенсивности окрашивания продукта реакции в структурных элементах терминальных ворсин (синцитиотрофобласте и эндотелии капилляров) центральной и парацентральной зон плаценты при помощи системы анализа изображения на базе микроскопа Nikon ECLIPSE”, как описано в (Зиганшина М.М., 2016; Зиганшина М.М. и др., 2020). Окрашенные ТМА блоки сканировали на Nanozoomer slide scanner (Hamamatsu, Hamamatsu City, Japan). Для получения репрезентативных данных, использовалась накладная сетка, разделенная на 100 квадратов размером 1 мм. В каждом случае с помощью генератора случайных чисел изучались 10 случайно выбранных полей зрения. Измерения обрабатывались автоматически как средние значения оптической плотности в исследуемой структуре плаценты с использованием анализа изображений с помощью программы NIS Elements Advanced Research 3.2 (Laboratory Imaging LTD, Чешская Республика).

- Оценка результатов иммуно- и лектиновой гистохимии на стеклах

Для оценки препаратов использовали световой микроскоп Nikon Eclipse 80i со встроенной цифровой камерой DS-Fi1 (Nikon); изображения анализировали с помощью программы NIS Elements Advanced Research 4.1.

“Интенсивность окрашивания антителами/лектинами оценивали в области цитоплазматической мембраны синцитиотрофобласта и эндотелия сосудов в терминальных ворсина плаценты в 10 полях зрения в каждом месте измерения. Выбор места измерения определялся в ручном режиме с целью исключения артефактов. Оценка интенсивности реакции определялась двумя независимыми исследователями «вслепую» (образцы были зашифрованы)”, как описано в аналогичных работах нашего коллектива (Тютюнник Н.В., 2019).

2.3.2. Молекулярно-генетические методы

- Определение в ткани плаценты экспрессии мРНК генов *IL-6*, *IL-10*, *TGFβ*, *PIBF1*, *HLA-G* методом обратной транскрипции и ПЦР в «реальном времени»

В ткани плаценты была изучена экспрессия мРНК генов *IL-6*, *IL-10*, *TGFβ*, *PIBF1*, *HLA-G* методом количественной обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени.

Во избежание деградации РНК взятие материала (парацентральная зона плаценты) осуществляли в пробирки с раствором для стабилизации РНК RNeasy Protect Tissue Reagent (Qiagen, Германия). Образцы хранили при температуре -80°C .

Выделение РНК осуществлялось с использованием QIAzol Lysis Reagent и RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия). Образцы переносили в раствор QIAzol Lysis Reagent, гомогенизировали, и выделяли РНК по инструкциям производителя. После предварительной обработки образцов раствором QIAzol Lysis Reagent сорбция и отмывка РНК осуществлялись на колонках. Осадки с колонки снимали очищенной от нуклеаз водой (вода, обработанная DEPC) в объеме 70 мкл. Концентрацию и чистоту РНК измеряли на спектрофотометре NanoPhotometer (Implen, Германия). Чистоту РНК оценивали по соотношению оптического поглощения растворов на длинах волн A260/A230 (наличие примесей органических соединений), соотношение оптической плотности A260/A280 (наличие примесей белков), нм.

“При постановке обратной транскрипции и ПЦР в работе использовались коммерческие реактивы («ДНК-Технология», Россия). Производитель гарантировал отсутствие амплификации на матрице геномной ДНК исследуемых и референсных генов

(GUSB и B2M). Это позволило не использовать дополнительный этап обработки нуклеиновых кислот ДНК-азой. Реакцию обратной транскрипции ставили в объеме 40 мкл (в реакцию брали 33 мкл образца РНК). В качестве праймеров для обратной транскрипции использовали специфические олигонуклеотиды. Реакцию проводили при температуре 40°C в течение 30 мин, с последующей инактивацией обратной транскриптазы при 95°C в течение 5 мин. Для увеличения объемов образцов после ОТ кДНК разводили в 4 раза в ТЕ-буфере.

Амплификацию осуществляли в режиме реального времени в объеме 35 мкл по следующей программе: 1 цикл – 80°C 30 сек, 94°C 1 мин 30 сек; 50 циклов – 94°C 20 сек, 64°C 20 сек; 10°C – хранение; с использованием детектирующего амплификатора «ДТ-964» («ДНК-Технология», Россия). Измерение уровня флуоресценции проводили на каждом цикле при температуре 64°C по каналу FAM. Реакцию ставили в двух повторах для каждой точки. Уровень экспрессии мРНК измеряли в относительных единицах относительно нормировочного фактора, рассчитанного на основе уровня экспрессии референсных генов B2M, GUSB. При расчете уровня экспрессии мРНК использован метод сравнения индикаторных циклов (метод ΔC_q), как описано в (Каримова Г.Н., 2017).

2.3.3. Биохимические методы

- Выделение плацента-ассоциированных антител из ткани плаценты

Выделение (элюция) антител с ткани плаценты выполнялась в два этапа: 1) отмывка ткани от крови; 2) собственно элюция антител.

1. Отмывка ткани плаценты

Образцы ткани плаценты, помещали на металлические поднос, размораживали при комнатной температуре, поместив в раствор PBS (50 мл) + ½ таблетки ингибитора протеаз (SIGMAFAST™ Protease Inhibitor Tablets). Расчет для добавления ингибитора 1 таблетка на 20 гр. клеточного экстракта. После размораживания куски плаценты извлекали из пробирки на металлический поднос и ткань разрезали на фрагменты размером 0,5х0,5 см. Из каждого фрагмента пинцетом удаляли кровеносные сосуды и сгустки. Фрагменты ткани помещали в исходный буфер на 10 мин.

Буфер удаляли и помещали образцы в стеклянный стакан объемом 1 л, добавляли 400 мл охлажденного до +4°C PBS+0,01% Na3N. Перемешивали на магнитной мешалке (250 об/мин) 30 мин. при комнатной температуре с 4-х кратной сменой буфера каждые

10 мин. Образцы ткани извлекали пинцетом и помещали на бумажную салфетку и отбирали ткань общей массой 10 грамм в центрифужную пробирку на 50 мл.

2. Элюция антител с ткани плаценты

Ткань заливали охлажденным до 4°C “кислым” буфером (0,2M Glycine-HCl+0,01% Na₃N pH=2,8 (25 мл)). Закрывали крышку пробирки и перемешивали ручным встряхиванием 3 мин. при комнатной температуре. Центрифугировали 10 мин (4°C 1500g). Получали элюат №1 и помещали его в отдельную пробирку.

Фрагменты ткани после кислой элюции заливали охлажденным до 4°C “щелочным” буфером (0,2M Tris/0,5M NaCl+0,01% Na₃N pH =10,6 (25 мл)). Закрывали крышку пробирки, перемешивали ручным встряхиванием 3 мин. при комнатной температуре и центрифугировали 10 мин (4°C 1500g), получали элюат №2.

Элюаты №1 и №2 объединяли, добавляли ингибитор протеаз, и доводили pH элюата до 7,4 с помощью HCl или NaOH.

- Аффинное выделение человеческих антител против Галили / Tn / Neu5Acβ-Bn из иммуноглобулинового препарата

Стеклянную колонку объемом до 5 мл упаковывали адсорбентом X-Sepharose 6FF (где X – лиганд Галили(три), трисахарид Galα1-3Galβ1-4GlcNAcβ- или Tn, моносахарид GalNAcα-, или Neu5Acβ-Bn, моносахарид Neu5Acβ-OCH₂C₆H₄-p-NHCOCH₂NH₂-) и уравнивали PBS/0,02% Na₃N/0,1% BSA (0,15 M, pH =7,4). “Иммуноглобулиновый препарат перед нанесением на колонку был разведен в PBS/0,02% Na₃N/0,1% BSA до концентрации иммуноглобулинов G 6 мг/мл. Раствор иммуноглобулинов наносили на адсорбент X-Sepharose 6FF со скоростью 0,5 мл/мин при комнатной температуре. Нагрузка иммуноглобулинов на адсорбент составляла 200 мг на 1 мл. Адсорбент сначала промывали PBS/0,02% Na₃N/0,1% Твин-20 (15 мл) и затем PBS/0,02% Na₃N (40 мл). Элюцию связавшихся с адсорбентом антител проводили щелочным раствором Tris/0,02% Na₃N (0,2 M, pH 10,4) со скоростью потока 70 мкл/мин при комнатной температуре. Появление антител в элюате определяли с помощью проточного УФ-детектора (BioRad, США). Фракции, содержащие антитела, немедленно нейтрализовали кислым буфером Gly-HCl (2 M, pH 2,5) до pH 7,5”, как описано в работах нашего коллектива (Зиганшина М.М., 2016; Обухова П.С., 2011). Затем полученный первичный элюат антител наносили на колонку с адсорбентом без углеводного лиганда, т.е. PAA-Sepharose 6FF (0,5 мл), уравновешенным буфером TrisOH/Gly-HCl (0,2M, pH 7,4). Целевые аффинно-очищенные антитела без неспецифических компонентов, т.е. прошедшие через PAA-Sepharose 6FF и несвязавшиеся

с ним, собирали. Количество выделенных антител во вторичном очищенном элюате определяли спектрофотометрически при $\lambda = 280$ нм, учитывая коэффициент экстинкции для иммуноглобулинов $G = 1,4$. Дополнительно концентрации выделенных антител верифицировали с помощью количественного ИФА с использованием IgG-стандарта с известной концентрацией.

- Аффинное выделение человеческих антител против Галили / Tn / Neu5Ac6-
Вн из элюата плаценты

Элюат плаценты, содержащий антитела, получали в соответствии с методикой, отработанной на первом этапе реализации проекта. Из 20 гр. ткани плаценты, выделенной из парацентральной зоны, было получено 80 мл элюата. Элюат без дополнительного разведения наносился на колонку в условиях, которые были аналогичны вышеописанным для иммуноглобулинового препарата.

- Биотинилирование аффинно выделенных антител

Аффинно-очищенные антитела в “буфере TrisOH / Gly-HCl / 0,02% NaN₃ (0,2M, pH 7,4) концентрировали и переводили в бикарбонатный буфер (NaHCO₃, 0,1 M, pH 8,4) с помощью концентрирующих фильтров в пробирках Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Unit, 10 kDa cutoff (Millipore, США), при 15°C, 5500g” (Игнатьева Н.В. и др., 2019). Методом поглощения при 280 нм на спектрофотометре определяли концентрацию антител в бикарбонатном буфере. “Биотин-сукцинимидный эфир растворяли в безводном DMSO (Merck, Германия) до концентрации 10 мг/мл и немедленно добавляли к раствору антител в бикарбонатном буфере из расчёта 0,5 мг биотин-сукцинимидного эфира на 1 мг антител. Приготовленную смесь инкубировали в темноте при комнатной температуре и перемешивании в течение 4 часов. Затем к реакционной смеси добавляли раствор NH₄Cl (1M, pH 4,0) из расчёта 40 мкл на 0,5 мг биотин-сукцинимидного эфира и инкубировали 30 мин при комнатной температуре и перемешивании”, как описано в (Обухова П.С., 2011). В результате были получены биотинилированные антитела, которые концентрировали и переводили в PBS (0,15 M, pH 7,4) помощью концентрирующих фильтров в пробирках Amicon Ultra-4 Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Unit, 10 kDa cutoff, при 15°C, 5500g. Степень биотинилирования антител и их активность была оценена методом ИФА с использованием конъюгата стрептавидин-пероксидаза хрена (Str-HRPO, Southern Biotechnology, США), разведение 1:8000.

Концентрация образца “анти-Галили антител IgG класса, меченых биотином, составила 1013 мкг/мл в PBS (0,15 M, pH 7,4). Концентрация образца анти-Галили антител

IgG, IgM, IgA классов, меченых биотином, составила 896 мкг/мл в PBS” (Обухова П.С., 2011). Активность двух образцов меченых анти-Галили антител проверена с помощью ИФА (Рисунки 12 и 13). Показано сохранение активности и специфичности биотинилированных анти-Галили антител, выделенных из препарата нормального иммуноглобулина G человека.

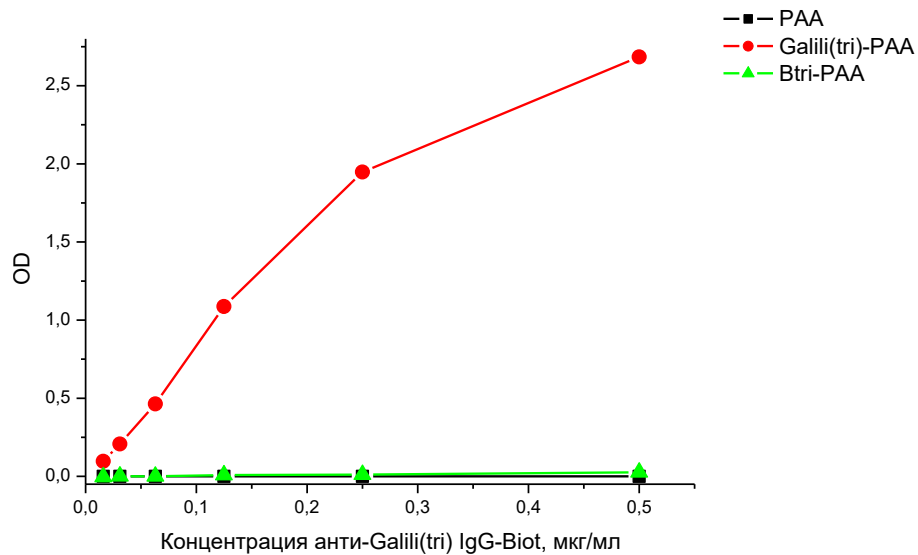


Рисунок 12. Результаты проверки активности и специфичности аффинно выделенных из препарата нормального IgG человека (“Иммуноглобулин человека нормальный”, производство фирмы “Микроген НПО”, Россия) и биотинилированных анти α Gal-антител.

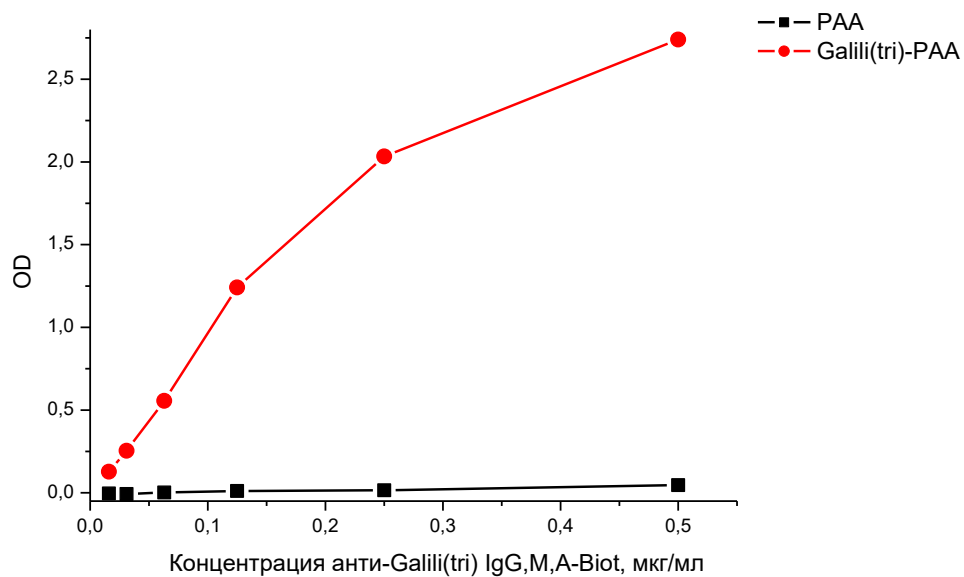


Рисунок 13. Результаты проверки активности и специфичности аффинно выделенных из КИП и биотинилированных анти α Gal-антител.

2.3.4. Иммунологические методы

- Определение содержания IL-6 и прогестерона в крови

Содержание IL-6 в периферической крови матери и пуповинной крови проводилось методом ИФА на коммерческих наборах реагентов для иммуноферментного определения концентрации интерлейкина-6 в сыворотке крови и моче (Вектор – Бест, А-8768, Россия) в соответствии с инструкцией фирмы производителя. Метод основан на трехстадийном «сэндвич»-варианте твердофазного ИФА с применением моно- и поликлональных антител к IL-6. На первом этапе анализа образцы сыворотки вносились в лунки планшета с иммобилизованными моноклональными антителами к IL-6, после инкубации и процедуры отмывки вносили конъюгат №1 (биотинилированные поликлональные антитела к IL-6 человека), с которыми взаимодействует IL-6, связавшийся на первом этапе. После инкубации и процедуры отмывки в лунки планшета вносили конъюгат №2 (стрептавидин с пероксидазой хрена), а затем тетраметилбензидин и перекись водорода, в результате чего образуется окрашенный продукт реакции, интенсивность окрашивания которого пропорциональна концентрации содержащегося в сыворотке IL-6. Концентрацию IL-6 в образце вычисляли по калибровочному графику со стандартными образцами, содержащими IL-6 в известной концентрации (0; 5,6; 16,7; 50; 150 и 300 пг/мл). Диапазон определения концентрации данным набором (0 – 300 пг/мл).

Содержание прогестерона в сыворотке крови матери производилось иммунохемилюминесцентным методом на иммунохимическом анализаторе cobas e 411 (Rack/Disk) с использованием реагентов в кассете для количественного определения прогестерона (Progesterone III Elecsys 07092539190) в соответствии с инструкцией фирмы производителя, представленной на сайте <https://labogids.sintmaria.be>. Набор дает диапазон измерений 0,159-191 нмоль/л или 0,05-60 нг/мл.

- Определение содержания и соотношения подклассов IgG в образцах аффинно выделенных антител

Исследование содержания и соотношения подклассов IgG в образцах антител проводили с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) в соответствии с этапами:

1) В лунки 96-луночного планшета (MaxiSorp, Nunc, Дания) были иммобилизованы исследуемые образцы аффинно-очищенных антител и контрольные образцы №1 и/или №2 (нанесены в параллельных рядах) в двукратных разведениях, с максимальной

концентрацией 10 мкг/мл, в натрий-карбонатном буфере (50 mM Na₂CO₃/NaHCO₃, pH 9,6), в объеме 50 мкл/лунку. Планшет инкубировали в термостате при 37°C, 1 час.

2) После инкубации раствор из лунок удаляли, вносили блокирующий буфер 1% BSA в PBS (0,15 M, pH 7,4) по 50 мкл/лунка и инкубировали в термостате при 37°C, 45 мин.

3) Вносили вторичные моноклональные мышинные антитела, меченые биотином, узнающие человеческие IgG₁, IgG₂, IgG₃ или IgG₄, при фиксированных разведениях в PBS/0,3% BSA по 50 мкл/лунка. Анти-humIgG₁ (Sigma-Aldrich, США, Cat# B6775) разводили 1:500, анти-humIgG₂ (Sigma-Aldrich, США, Cat# B3398) разводили 1:20000, анти-humIgG₃ (Sigma-Aldrich, США, Cat# B3523) разводили 1:20000, анти-humIgG₄ (Sigma-Aldrich, США, Cat# B3648) разводили 1:30000. Планшет инкубировали в термостате при 37°C, 1 час.

4) Добавляли Str-HRPO (Southern Biotechnology Associates, США, Cat# 7105-05) по 50 мкл в разведении 1:8000 в PBS/0,3% BSA и инкубировали при 37°C, 1 час.

Между каждым этапом производили промывание лунок раствором PBS (0,15 M, pH 7,4), содержащим 0,1% Tween-20, по 160 мкл/лунка, по четыре раза.

5) Добавляли фосфатно-цитратный буфер (0,075 M, pH 5,0), содержащий 0,04% о-фенилендиамина и 0,03% H₂O₂, 100 мкл/лунка, и инкубировали при комнатной температуре, 20 мин. Цветную реакцию останавливали 1 M H₂SO₄, 30 мкл/лунка. Оптическую плотность (OD) определяли при 492 нм на многопараметровом счетчике Wallac1420 Victor2. Полученные данные обрабатывали с помощью программы Microsoft Excel. Соотношения подклассов IgG выражали в %, принимая общее содержание всех подклассов IgG в образцах антител за 100%.

- Определение специфичности аффинно выделенных антител с помощью гликанового эррея

Аффинно очищенные антитела из иммуноглобулинового препарата в одинаковой концентрации 0,23 мкг/мл наносили на гликановый эррей (микрочип) в объеме 900 мкл и “инкубировали в увлажненной камере при 37°C и умеренном вращении на орбитальном шейкере-инкубаторе Heidolph Unimax 1010, Германия (32-34 об/мин), 3 часа. Чип промывали раствором PBS, содержащим 0,1% Tween 20 (PBS-0,1%), и инкубировали с биотинилированными козьими антимышиными антителами (Thermo Fisher Scientific, США) в концентрации 10 мкг/мл в PBS-0,1% в тех же условиях. Далее чип промывали PBS-0,001% и инкубировали с конъюгатом стрептавидин-Alexa-555 (Thermo Fisher Scientific, США) в концентрации 1 мкг/мл в PBS-0,1% при комнатной температуре (20°C) в течение

45 мин. После окончательной промывки PBS-0,001% и дистиллированной водой (марка Milli-Q) чипы сушили на воздухе и сканировали с помощью InnoScan 1100 AL (Innopsys, Франция) при длине волны 543 нм и разрешении 10 мкм. Полученные данные обрабатывали с помощью программы ScanArray Express 4.0 и метода фиксированного круга диаметром 70 мкм и программы Microsoft Excel. Данные для каждого антитела к конкретному олигосахариду в массиве представлены как медианы относительной интенсивности флуоресценции (RFU) сигналов повторов лигандов чипа, с межквартильным размахом. Сигнал, интенсивность флуоресценции которого превышал 5% от максимального сигнала, считали значимым”, в соответствии с работами нашего коллектива (Долгополова Е.Л., 2023; Зиганшина М.М., 2016; Тютюнник Н.В., 2019; Хасбиуллина Н.Р., 2019; Ziganshina M.M. et al., 2021).

- Исследование влияния аффинно выделенных антител на экспрессию маркеров активации эндотелиальными клетками линии EAhy.926 методом проточной цитофлуориметрии.

“Клетки линии EA hy.926 (гибридома, полученная слиянием клеток HUVES и клеток линии A549 – карциномы легкого человека) культивировали в пластиковых флаконах в среде DMEM с добавлением 25 мМ HEPES (ПанЭко, Россия), 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), 2 мМ L-глутамина (ПанЭко, Россия), 25 Ед/мл пенициллина, 25 мг/мл стрептомицина (Invitrogen, США) и НАТ (гипоксантин, аминоптерин и тимидин) (ПанЭко, Россия) при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂. При достижении субконфлюэнтного монослоя, клетки дезинтегрировали добавлением раствора Версена (ПанЭко, Россия) в течение 8-10 минут. Пассаж клеток производили 1 раз в 3-4 дня. Жизнеспособность клеток оценивалась по окрашиванию с 0,4% раствором трипанового синего на физиологическом растворе и составляла не менее 96% в каждом эксперименте” (Зиганшина М.М., 2016). Клетки разносились в 96-луночные планшеты в концентрации 50 000 клеток в 100 мкл среды/на лунку и помещались в инкубатор при 37°C и 5% CO₂. Далее проводилось изучение влияния эффекта аффинно выделенных антител на экспрессию клетками линии EAhy.926 маркеров активации в различных экспериментальных условиях. В качестве модельных вариантов, позволяющих оценивать воздействие антител на клетки, рассматривались:

1. Предобработка клеток выделенными антителами с последующим внесением в среду культивирования TNF α , что моделирует влияние предсуществующих естественных антител, присутствующих в крови на появление активационного маркера;

2. Активация клеток предобработкой TNF α с последующим внесением в среду культивирования антител, что моделирует эффект введения терапевтических антител в условиях расщипа системного воспалительного процесса и эндотелиальной активации;

3. Активация клеток предобработкой TNF α с последующей полной заменой среды с удалением TNF α и внесением в среду культивирования антител, что моделирует эффект влияния антител на восстановление физиологического фенотипа эндотелиальных клеток.

Для реализации первого варианта через 18 ч. при достижении монослоя клеток в лунке, в ряд лунок были добавлены выделенные антитела в концентрациях: анти-Tp и анти-Neu5Ac β – 10 мкг/мл; анти-Gal α – 20 мкг/мл. Инкубация с антителами проводилась в течение 22 ч. Далее в часть лунок был добавлен TNF α в концентрации 25 нг/мл, с которым клетки инкубировали 4 ч. В другую часть лунок TNF α добавлен не был, и общее время инкубации клеток с антителами составило 26 ч. Из всех лунок отбирали среду, клетки заливали р-ром Версена, снимали с лунки, центрифугировали, отмывали р-ром PBS, и окрашивали антителами к активационным маркерам CD 106, CD 54, CD62E. Окрашенные клетки фиксировали раствором Optilise и производили накопление на проточном цитометре NaviosTM (Beckman Coulter, США). Для получения воспроизводимых эффектов эксперимент повторялся три раза.

Для реализации второго варианта через 18 ч. при достижении монослоя клеток в лунке к клеткам добавляли TNF α в концентрации 25 нг/мл на 4 ч., затем, в среду культивирования вносили тестируемые антитела в концентрациях, указанных выше. Клетки инкубировали 24 ч., дезинтегрировали раствором Версена, окрашивали антителами к активационным маркерам CD 106, CD 54, CD62E. Окрашенные клетки фиксировали раствором Optilise и производили накопление на проточном цитометре NaviosTM (Beckman Coulter, США). Для получения воспроизводимых эффектов эксперимент повторялся три раза.

Для реализации третьего варианта через 18 ч. при достижении монослоя клеток в лунке к клеткам добавляли TNF α в концентрации 25 нг/мл на 4 ч., затем, проводили полную замену ростовой среды, и вносили тестируемые антитела в концентрациях, указанных выше. Клетки инкубировали 24 ч., дезинтегрировали раствором Версена, окрашивали антителами к активационным маркерам CD 106, CD 54, CD62E. Окрашенные клетки фиксировали раствором Optilise и производили накопление на проточном цитометре NaviosTM (Beckman Coulter, США). Для получения воспроизводимых эффектов эксперимент повторялся три раза. Полная схема эксперимента представлена на Рисунке 14.

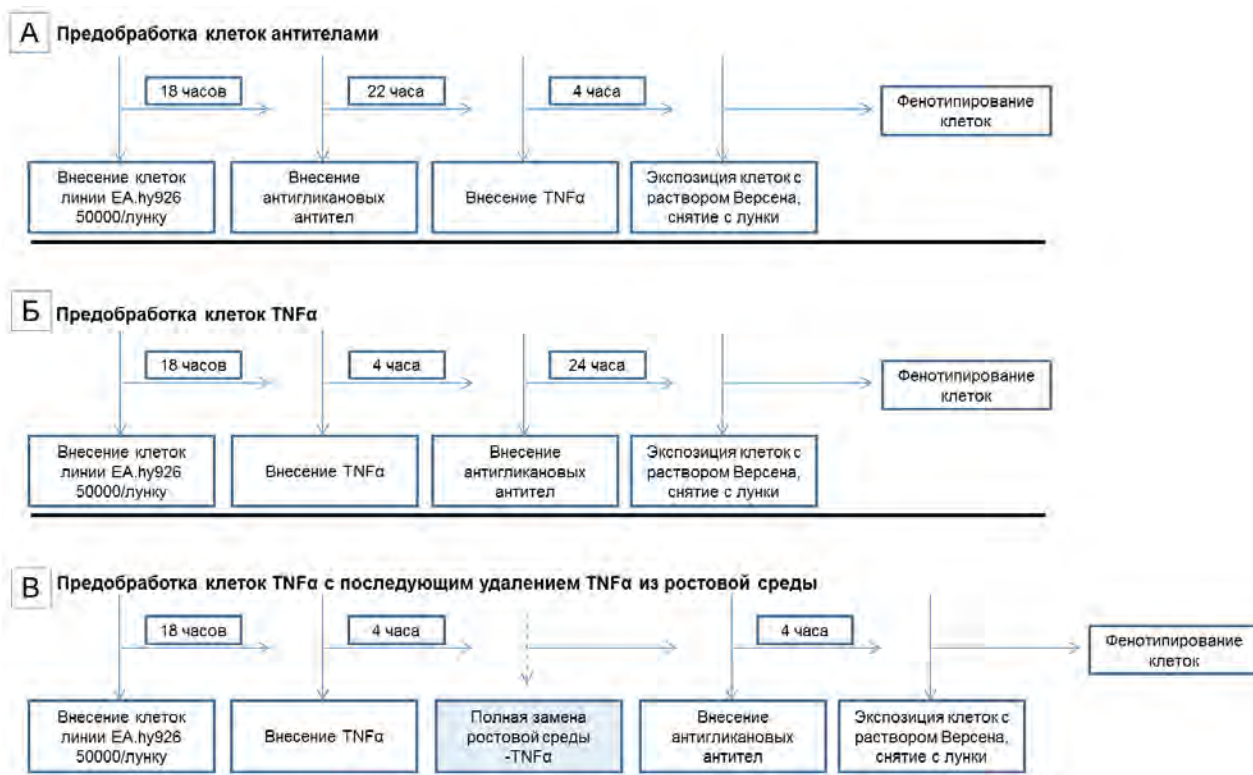


Рисунок 14. Схематическое представление этапов проведения экспериментов *in vitro* на клеточной линии EA hy.926 по оценке влияния аффинно очищенных антител на эндотелий с моделированием (А) влияния предсуществующих естественных антител, присутствующих в крови на появление активационного маркера; (Б) эффекта введения терапевтических антител в условиях разсития системного воспалительного процесса и эндотелиальной активации; (В) эффекта влияния антител на восстановление физиологического фенотипа эндотелиальных клеток.

Алгоритм выбора зоны анализа для определения пула клеток EA hy.926 состоял из этапов: на гистограмме распределения клеток по морфологическим параметрам (прямое FS и боковое SS светорассеяние) выделялась область (гейт), соответствующая живым клеткам и отсекали дебрис (мертвые и разрушенные клетки). В гейте по оранжевой флуоресценции (фикоэритрин, канал FL2) оценивали относительное количество клеток, экспрессирующих CD 106, CD 54, CD62E (%). Кроме этого, оценивали интенсивность флуоресценции, характеризующую количество антител, связавшихся с клеткой, (средняя интенсивность флуоресценции, СИФ). Представлено связывание МАт к исследуемым маркерам с неактивированными Рисунок 15(1) и активированными TNFα клетками Рисунок 15(2).

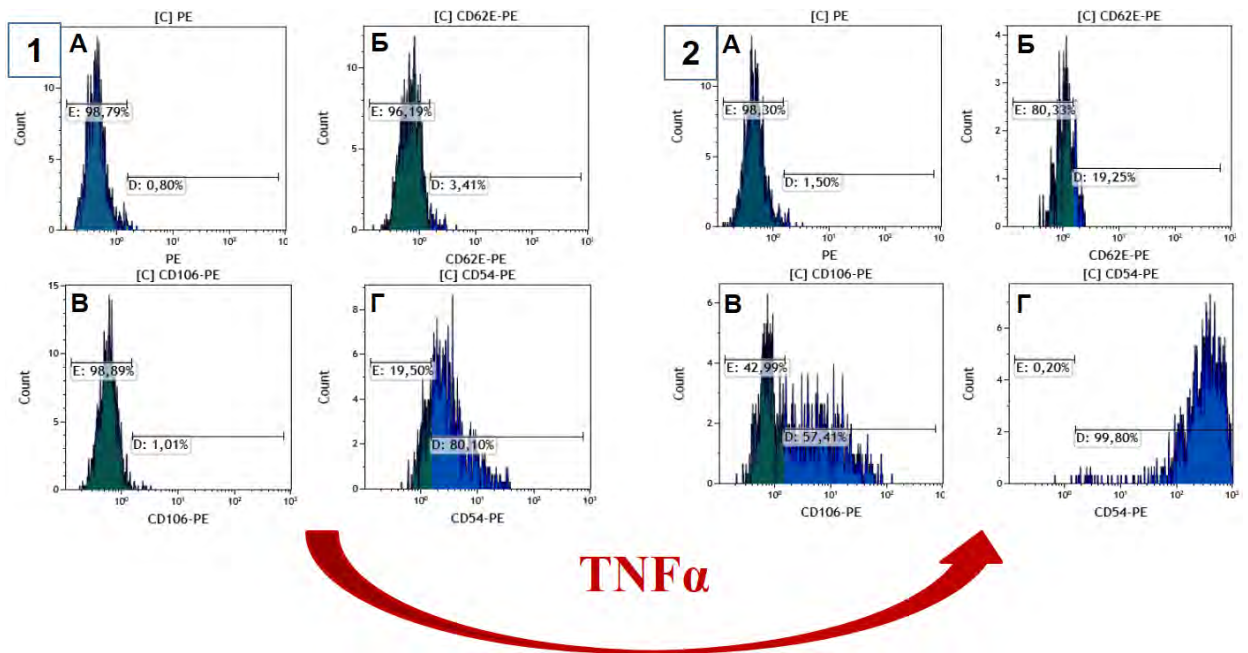


Рисунок 15. Гистограммы, демонстрирующие связывания клеток линии EA hy.926 с МАт к кластерам дифференцировки CD 106, CD 54, CD62E. (1)- с интактными, неактивированными клетками; (2) – с клетками после воздействия TNFα. А-фоновый контроль; Б – оценка экспрессии CD62E; В – оценка экспрессии CD 106; Г – оценка экспрессии CD 54.

- Иммунофенотипирование клеток периферической и пуповинной крови для оценки клеток регуляторных и активированных фенотипов

Иммунофенотипирование проводилось методом проточной цитофлуориметрии по определению экспрессии поверхностных рецепторов иммуннокомпетентных клеток, с использованием флуоресцентно меченных МАт) к поверхностным маркерам (Таблица 7), согласно инструкции фирмы-производителя.

Таблица 7. Панель моноклональных антител, использованных для фенотипирования лимфоцитов

№ п/п	Моноклональные антитела	Клон	Флюорохром	Фирма-производитель
1	Антитела к антигену дифференцировки 19 (CD19)	SJ25C1	FITC	BD Pharmingen™
2	Антитела к антигену дифференцировки 4 (CD4)	13B8.2	FITC	IOtest Beckman Coulter
3	Антитела к антигену дифференцировки 8a (CD8a)	RPA-T8	FITC	BioLegend™
4	Антитела к иммуноглобулину Д (IgD)	IA6-2	PE	BD Pharmingen™
5	Антитела к антигену дифференцировки 28 (CD8)	CD28.2	PE	BD Pharmingen™

№ п/п	Моноклональные антитела	Клон	Флюорохром	Фирма- производитель
6	Антитела к антигену дифференцировки 127 (CD127)	HIL-7R-M21	PE	BD Pharmingen™
7	Антитела к антигену дифференцировки 45 (CD45)	J33	ECD	IOtest Beckman Coulter
8	Антитела к антигену дифференцировки 3 (CD3)	HIT3a	APC	BioLegend™
9	Антитела к антигену дифференцировки 27 (CD27)	M-T271	APC	BD Pharmingen™
10	Антитела к антигену дифференцировки 5 (CD5)	UCHT2	APC-Cy7	BD Pharmingen™
11	Антитела к антигену дифференцировки 27 (CD27)	1A4LDG5	PC5	IOtest Beckman Coulter
12	Антитела к антигену дифференцировки 24 (CD24)	ML5	PerCP-Cy5.5	BD Pharmingen™
13	Антитела к антигену дифференцировки 38 (CD38)	LS198-4-3	PC7	IOtest Beckman Coulter
14	Антитела к антигену дифференцировки 25 (CD25)	M-A251	PE-Cy7	BioLegend™
15	Антитела к антигену дифференцировки 56 (CD56)	N901(NK H-1)	PC5.5	IOtest Beckman Coulter

Примечание: FITC – флюоресцеинизотиоцианат; PE – фикоэритрин; PerCP–перидинин хлорофилл протеин; PerCP-Cy5.5 – перидинин хлорофилл протеин комбинированный с цианином; PE-Cy7 – фикоэритрин-цианин 7; APC – аллофикоцианин; APC-Cy7 – аллофикоцианин -цианин 7; ECD – R-фикоэритрин-Texas Red-X; PC5 – фикоэритрин-цианин 5; PC5.5 - фикоэритрин-цианин 5; PC7 - фикоэритрин-цианин 7.

Согласно стандартной процедуре окрашивания, 50 мкл цельной крови инкубировали с МАт в течение 15 мин. в темноте при комнатной температуре. После окрашивания во всех пробах проводили процедуру лизиса эритроцитов с одновременной фиксацией лейкоцитарных клеток раствором OptiLyse C (Beckman Coulter, Франция), клетки вортиксировали и инкубировали 20 мин в тех же условиях. В пробы добавляли фосфатный буфер, вортиксировали, инкубировали 10 мин. и отмывали путем центрифугирования дважды (1500 об/мин, 5 мин). Надосадочную жидкость удаляли, клетки ресуспендировали в 500 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS), содержащего фиксатор (0,1% параформальдегид). Пробоподготовка для цитометрического анализа проводилась в соответствии с (Хайдуков С.В. и др., 2012). Для фенотипирования мажорных и минорных субпопуляций иммунных клеток использовались сочетания антител, конъюгированных с флуорохромами согласно Таблице 8.

Таблица 8. Сочетания МАт для определения фенотипа регуляторных клеток в 50 мкл цельной крови

субпопуляция	FL1	FL2	FL3	FL4	FL5	FL6
Tc(per)	CD8-FITC	CD28-PE	CD45-ECD			CD3-APC
Th (per)	CD4-FITC	CD127-PE	CD45-ECD		CD25-APC-Cy7	
Общие В	CD19-FITC	IgD-PE	CD45-ECD	CD27-PC5	CD38-PC7	
B(per)	CD19-FITC		CD45-ECD	CD24-PerCP-Cy5.5	CD38-PC7	CD27-APC
B1	CD19-FITC		CD45-ECD		CD5-APC-Cy7	CD27-APC
NK(per)		CD127-PE	CD45-ECD	CD56-PC5.5		CD3-APC

Tc (per)– Т-цитотоксические регуляторные клетки

Th (per)–Т-хелперные регуляторные клетки

Анализ образцов осуществляли на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, Франция). Полученные данные обрабатывали с использованием программного обеспечения Kaluza 2.0 (Beckman Coulter, Франция). Методика гейтирования осуществлялась в соответствии со стандартизированной технологией определения субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови (Хайдуков С.В. и др., 2012). Протокол для оценки регуляторных клеток включал корректную настройку параметров для каналов прямого и бокового светорассеяния, а также каналов флуоресценции (Хайдуков С.В. и др., 2012). Многоцветный анализ проводили с помощью протоколов исследования, включающих в себя логические ограничения, позволяющие исследовать исключительно живые клетки в соответствии с их фенотипом.

1. Оценка субпопуляций В-клеток

В лейкоцитарном (CD45⁺)-гейте выделяли В-клетки по экспрессии CD19⁺ (гейт по В-клеткам), в котором затем визуализировали клетки:

- экспрессирующие маркер CD5;
- экспрессирующие маркеры CD27 и IgD;
- экспрессирующие маркеры CD27 и CD38;
- экспрессирующие маркеры CD38 и IgD;
- экспрессирующие маркеры CD24, CD27 и CD38

Анализ дифференцировки В-лимфоцитов проводился по оценке основных мажорных субпопуляций В-клеток, включая CD19⁺CD5⁺ (B1-лимфоциты) и CD19⁺CD5⁻ (B2-лимфоциты). Использование панели МАт к CD 19, CD 24, CD 27, IgD и CD 38 (Таблица

4) позволило оценить содержание субпопуляций В-клеток, регулирующих иммунный ответ и В-клеточную иммунологическую память.

Использование МАт к дифференцировочным кластерам CD45, CD19, CD27 и IgD позволило визуализировать субпопуляции наивных клеток и клеток памяти. В основном лейкоцитарном гейте, ограниченном по CD45⁺ лейкоцитарному маркеру проводили дополнительное гейтирование с ограничением В-лимфоцитов по CD19⁺ антигену. В CD19⁺ лимфоцитарном гейте определяли относительное содержание клеток с фенотипом: CD19⁺CD27⁻IgD⁺ (наивных), CD19⁺CD27⁺IgD⁻ (“переключенных” В-клеток памяти), CD19⁺CD27⁺IgD⁺ (“непереключенных” В-клеток памяти) (Рисунок 16).

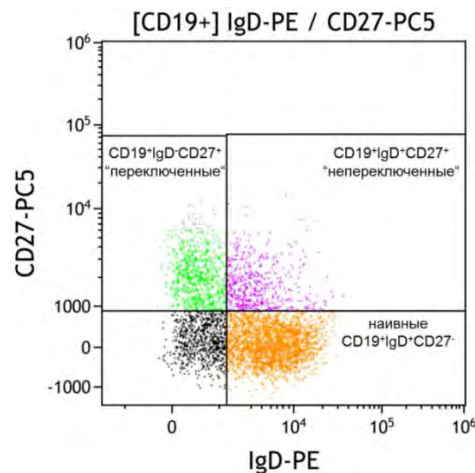


Рисунок 16. Выявление субпопуляций В-клеток с использованием МАт к дифференцировочным кластерам CD45, CD19, CD27 и IgD.

Аналогичная стратегия с использованием МАт к CD45, CD19, CD27, CD38 позволила визуализировать и оценить CD19⁺CD38⁺⁺CD27⁻ (транзиторные), CD19⁺CD38⁺CD27⁻ (наивные зрелые), двойные негативные (CD19⁺CD38⁻CD27⁻), активированные зрелые (CD19⁺CD38⁺CD27⁺) и полежащие В-клетки памяти (CD19⁺CD38⁻CD27⁺) (Рисунок 17).

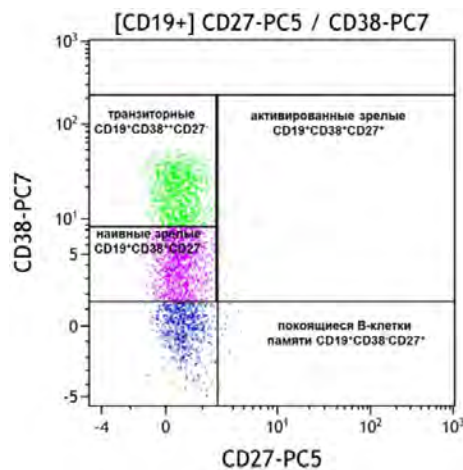


Рисунок 17. Выявление субпопуляций В-клеток с использованием МАт к дифференцировочным кластерам CD45, CD19, CD27 и CD38.

Сочетание МАт к дифференцировочным кластерам CD45, CD19, CD38 и IgD позволило дать подробную характеристику клеток иммунной памяти (Bm) в соответствии с классификацией Bm1-Bm5 (Bohnhorst J. Ø. et al., 2001). На Рисунке 18 представлено распределение зрелых наивных В-клеток Bm1 ($CD19^+IgD^+CD38^-$), активированных наивных В-клеток Bm2 ($CD19^+IgD^+CD38^+$), предшественников GC В-клеток, пре-GC Bm2' ($CD19^+IgD^+CD38^{++}$), центробластов и centroцитов Bm3+Bm4 ($CD19^+IgD^-CD38^{++} + CD19^+IgD^+CD38^{++}$), ранних В-клеток памяти eBm5 ($CD19^+IgD^-CD38^+$) и поздних В-клеток памяти Bm5 ($CD19^+IgD^-CD38^-$).

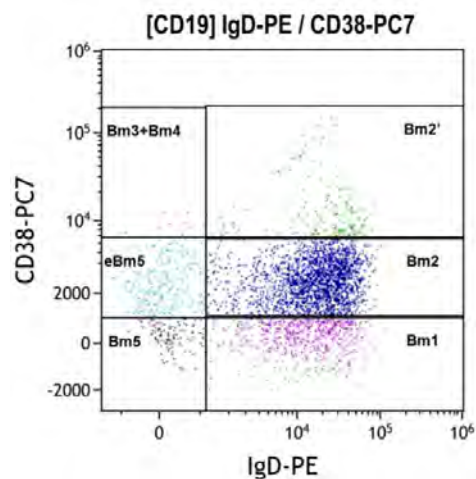


Рисунок 18. Выявление субпопуляций В-клеток памяти с использованием МАт к дифференцировочным кластерам CD45, CD19, CD38 и IgD.

Оценка минорной субпопуляции В-клеток с фенотипом регуляторных клеток (B-рег) проводилась с использованием МАт к CD45, CD19, CD24, CD27 и CD38 (Таблица 8), что позволило визуализировать В-клетки с фенотипом регуляторных клеток в нескольких фенотипических вариантах: $CD19^+CD24^+CD27^+$, $CD19^+CD24^+CD38^{high}$ и $CD19^+CD24^+CD38^{dim}$ (Рисунок 19).

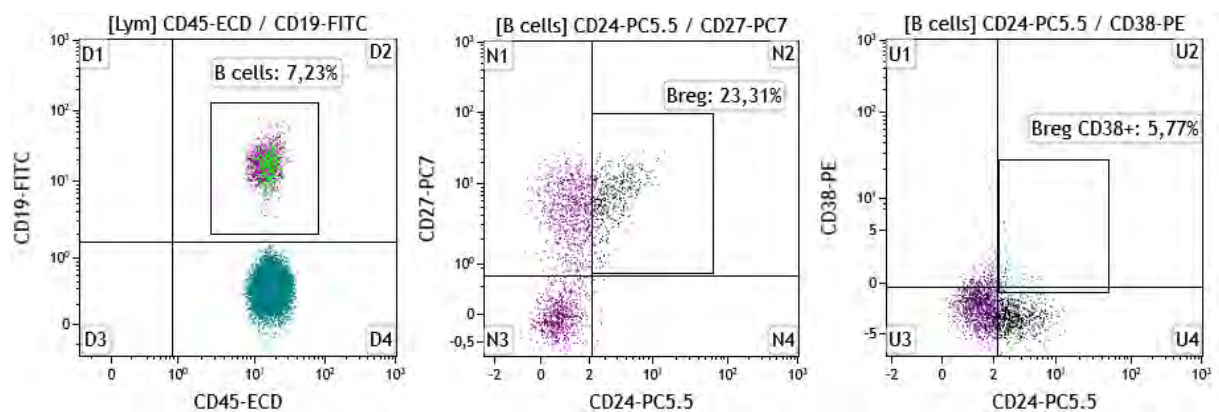


Рисунок 19. Алгоритм гейтирования для выделения субпопуляции В-клеток с фенотипом В-рег клеток по экспрессии маркеров CD45, CD19, CD24, CD27 и CD38. (Результаты опубликованы в (Зиганшина М.М., Хайдуков С.В., 2021)).

2. Оценка субпопуляций Т-клеток

Дополнительно проводилось определение основных субпопуляций Т-клеток, в том числе Т-хелперов $CD3^+CD4^+$, с анализом активированных Т-хелперов ($CD4^+CD25^+CD127^+$) и Т-клеток с фенотипом регуляторных ($CD3^+CD4^+CD25^{bright}CD127^{low\ to\ neg}$), а также цитотоксических Т-клеток $CD3^+CD8^+$ с анализом двух субпопуляций Т-цитотоксических клеток: $CD3^+CD8^+CD28^+$ и регуляторных Т-цитотоксических $CD3^+CD8^+CD28^-$ клеток.

Стратегия гейтирования и визуализации Т-регуляторных клеток в субпопуляциях Т-хелперов и Т-цитотоксических клеток описана ниже. В лейкоцитарном ($CD45^+$)-гейте выделяли Т-клетки по экспрессии $CD3^+$, в котором затем визуализировали клетки экспрессирующие $CD4^+$ и $CD8^+$ (основные субпопуляции Т-клеток). Далее в популяции Т-клеток хелперов, экспрессирующих маркер $CD4^+$ визуализировали субпопуляцию Т-клеток экспрессирующих $CD25^+$ и $CD127^+$ и параллельно – субпопуляцию, характеризующуюся яркой экспрессией $CD25^+$ и слабой, до негативной экспрессии $CD127^+$ (Рисунок 20). В популяции цитотоксических Т-клеток, экспрессирующих маркер $CD8^+$, визуализировали Т-регуляторные цитотоксические клетки по отсутствию экспрессии маркера $CD28^+$ (Рисунок 21).

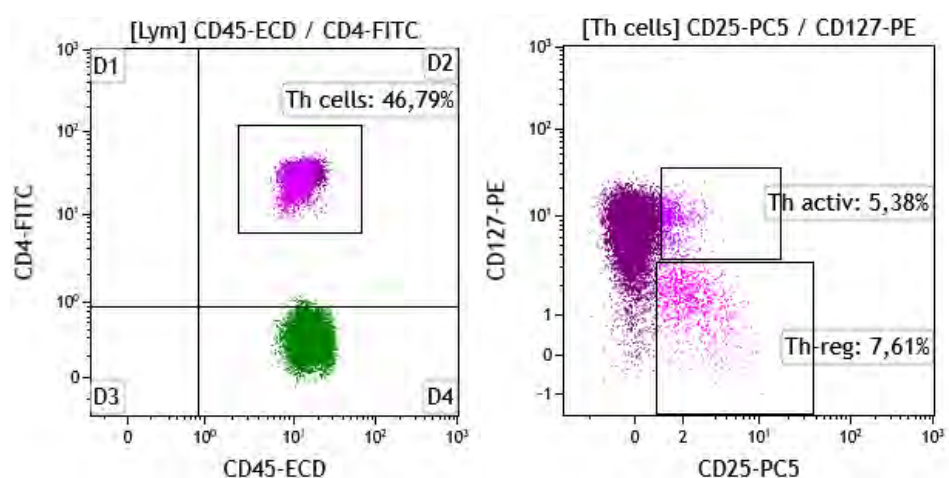


Рисунок 20. Алгоритм гейтирования для выделения субпопуляции Т-хелперов по экспрессии маркеров CD45, CD4, CD25 и CD127 с визуализацией Т-клеток с фенотипом регуляторных и Т-активированных хелперов.

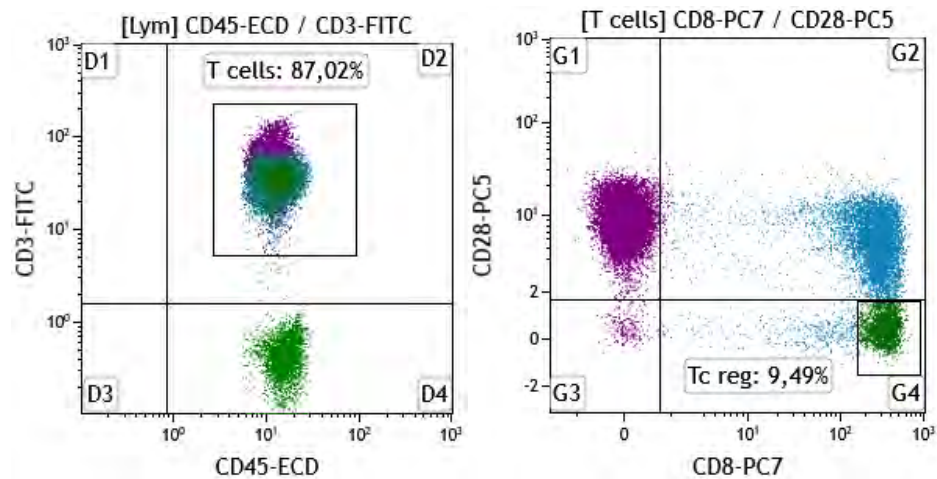


Рисунок 21. Алгоритм гейтирования для выделения субпопуляции Т-цитотоксических клеток по экспрессии маркеров CD45, CD8, CD28 с визуализацией Т-клеток с фенотипом регуляторных и Т-активированных хелперов.

3. Оценка NK-клеток

В лейкоцитарном ($CD45^+$)-гейте визуализировались клетки экспрессирующие CD56 и одновременно Т-клеточный маркер CD3 (NKT-клетки) и не экспрессирующие его (естественные киллерные NK-клетки). В субпопуляции NK-клеток, визуализировали клетки одновременно экспрессирующие CD127 и высокий уровень CD56 (Рисунок 22). Соответственно было оценено содержание фенотипов: NK-клеток ($CD3^-CD56^+$), NKT-клеток ($CD3^+CD56^+$) и NK-регуляторных клеток ($CD56^{bright}CD127^+$).

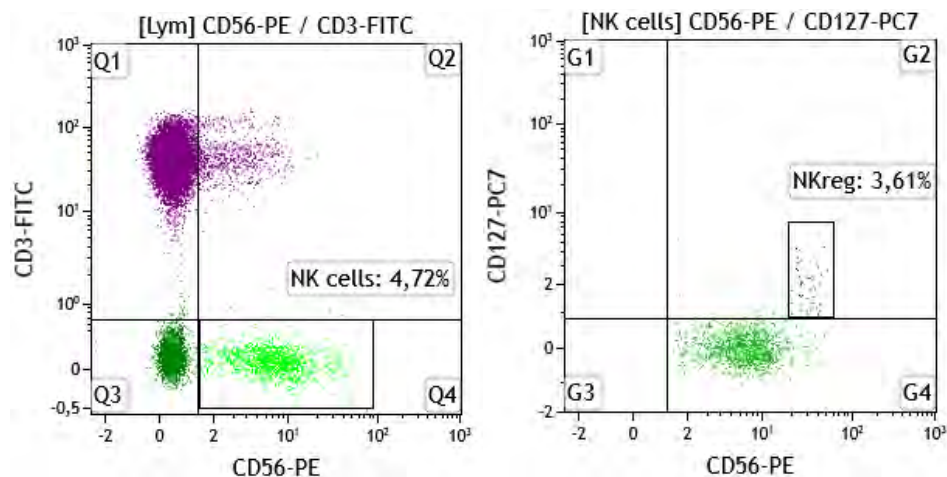


Рисунок 22. Алгоритм гейтирования для выделения субпопуляции NK-, NKT- и NK-регуляторных клеток по экспрессии маркеров CD3, CD56, CD127.

- Микрочиповый анализ антигликановых антител сыворотки периферической и пуповинной крови

1. Печать и контроль качества данных гликановых эрреев (чипов)

“Чипы были напечатаны методом бесконтактной печати на приборе SciFLEXARRAYER S5 при 50% влажности на подложке, в качестве которой использовали стекла с активированным полимером (3-D Hydrogel, 3-D Polymer), производства Schott Nexterion slide H (Schott Nexterion®, Майнц, Германия). Печать чипов осуществлял ООО “Семиотик” с использованием библиотеки лигандов, включающей синтетические гликаны, синтезированные в лаборатории углеводов ФГБУН ИБХ РАН (чистота > 95%); липополисахариды и О-полисахариды бактерий, получение и характеристика которых осуществлялась в ФГБУН ИОХ им. Н.Д. Зелинского РАН (соответствующие структуры и ЯМР-спектры содержатся в базе данных <http://csdb.glycoscience.ru/bacterial>). Каждый лиганд был напечатан в 6 повторах. Полный список лигандов, которые были использованы для печати приведен в Приложении. В исследовании было использовано два варианта дизайна чипов: **1** - содержащий 689 лигандов (473 гликана, 216 полисахаридов) использовали для изучения АгАТ у пациенток с ГРБ и ЗРП; **2** – содержащий 400 лигандов использовали для определения специфичности плацента-ассоциированных АгАТ (пЛАгАТ) и АгАТ пуповинной и периферической крови соответствующих пациенток, из плаценты которых были выделены пЛАгАТ.

Обязательной процедурой каждого эксперимента являлось:

- использование положительных (флуоресцентно-меченный Alexa555 и Alexa-647 стрептавидин, 20 мкмоль/л) и отрицательных (блокирующий буфер и/или трегалоза, 50 мМ) контролей, используемых для адекватной оценки флуоресцентных сигналов, считываемых с чипа;
- визуальный контроль качества результатов, полученных с чипа, включающий контроль наличия видимых дефектов (повреждения чипа, смазанные и поврежденные споты, высокий уровень фона и его неоднородность, низкая интенсивность сигналов флуоресценции)”, как описано в (Хасбиуллина, 2019);
- межслайдовый контроль качества, включающий выбор чипов случайным образом из разных партий и оценки коэффициентов межслайдовой корреляции, используя согласованный коэффициент корреляции Лина
- внутрислайдовый контроль (описание дано в статистических методах – см. ниже)

2. Пробоподготовка образцов сыворотки крови и элюатов плаценты для нанесения на чип

А. “Сыворотку периферической и пуповинной крови размораживали при +4°C и разводили в соотношении 1:50 буфером PBS + 1%BSA, 0,01%NaN₃, 1%Tween 20. Затем термостатировали при 37°C 5 мин, центрифугировали 3 мин. при 12 000 об/мин.

Б. Элюат плаценты наносили на чип без разведения, добавляя Tween 20 до 0,1%.

3. Процедура выполнения чипового анализа:

Чипы помещали во влажную темную камеру и выдерживали в течение 15 мин в 0,1 М изотоническом фосфатном буфере (ИФБ) (0,01 М Na_2HPO_4 , 0,01 М NaH_2PO_4 , 0,138 М NaCl и 0,0027 М KCl , pH 7,4), содержащем 0,1%-ный Tween 20 (0,1%-ный ИФБ) и промывали тем же буфером дважды. На чипы наносили анализируемые сыворотки крови, разбавленные в 15 раз в 0,1%-ном ИФБ, содержащем 3% БСА”, как описано в (Тютюнник Н.В., 2019; Хасбиуллина Н.Р., 2019). Элюаты плаценты вносили без разведения. Объем наносимого образца составлял 700 мкл. Один образец сыворотки или элюата наносили на один чип. Далее “гликочипы инкубировали в темной камере на шейкере (32-34 об/мин) при относительной влажности около 80% в течение 60 мин и промывали двухкратно ИФБ+0,1% Tween-20, после чего наносили 20 мкг/мл раствора вторичных антител в 0,1%-ном ИФБ (goat-anti-human IgG-Alexa 555 и goat-anti-human IgM-Alexa 647). После инкубации на шейкере при относительной влажности 80% в течение 60 мин чипы промывали сначала 0,05%-ым ИФБ, затем бидистиллированной водой и высушивались на центрифуге для чипов Slide Spinner, Labnet.

Анализ галектинов, конъюгированных с биотином, выполняли используя чипы с аналогичным набором лигандов: галектины растворяли в 0,1%-ном ИФБ, содержащем 3% БСА, в концентрации 50 мкг/мл, наносили на чип и выдерживали на шейкере при относительной влажности 80% в течение 1 ч. После этого чипы промывали 0,05%-ым ИФБ и добавляли флуоресцентно-меченный стрептавидин (Streptavidin-Alexa 555) в концентрации 1 мкг/мл в 0,1%-ном ИФБ, содержащем 3% БСА. После инкубации на шейкере при относительной влажности 80% в течение 45 мин. чипы промывали сначала 0,05%-ым ИФБ, затем бидистиллированной водой.

Относительную интенсивность флуоресценции (ОИФ) измеряли с помощью конфокального сканера Innoscan AL1100 с разрешением 10 мкм. Полученные данные обрабатывали с помощью программного обеспечения ScanArray Express 3.0, используя метод фиксированных колец диаметром 100 мкм”, как описано в работах нашего коллектива (Зиганшина М.М., 2016; Мантрова Д.А., 2020; Хасбиуллина Н.Р., 2019).

2.3.5. Статистические методы

“Формирование баз данных с результатами исследований, математическую обработку и графическое представление полученных данных проводили с применением методов вариационной статистики и пакетов прикладных программ Microsoft Office Excel 2010, Statistica for Windows версия 10, MedCalc версия 12 и программы R.

Нормальность распределения данных проверяли по критерию Шапиро-Уилка. Количественные данные представлены в виде медианы (Me) и максимального и минимального значения (Q0 0-й перцентиль; Q4 100-й перцентиль). Межгрупповые различия при сравнении трех и более групп по количественному показателю, распределение которого отличалось от нормального рассчитывались с помощью критерия Краскелла-Уоллиса с поправкой Бонферрони при $p < 0,025$. Для апостериорных сравнений использовали U-критерий Манна-Уитни, при $p < 0,050$. Нулевая гипотеза отвергалась при значении p -критерия менее 0,050. Корреляционный анализ проводился с вычислением коэффициента ранговой корреляции Спирмена; различия считали значимыми при $p < 0,050$. Учитывая объем выборок в рассмотрение принимали сильные корреляционные связи с r_s от $\pm 0,9$ до $\pm 1,0$.

Для математической обработки результатов гликанового эррея использовался следующий алгоритм:

Первичную обработку данных проводили с помощью Microsoft Office Excel: рассчитывали медиану сигналов и отклонение медианы по 6 повторам каждого лиганда. Значимыми считали сигналы, которые превышали фон (т.е. сигнал от поверхности, не содержащей лиганд) в 5 раз.

Статистический анализ проводился с помощью программы R и включал в себя процедуры контроля качества данных, проводимые как описано в (Vuskovic M. I. et al., 2011): нормализацию данных и их нормализующую трансформацию, а также установление межгрупповых отличий по антигликановым антителам (как класса G, так и M).

Процесс проведения процедуры **внутрислайдового контроля качества** (нормализации данных) состоял из четырех стадий. В результате каждой стадии из рассмотрения исключались либо данные целого чипа, либо те или иные лиганды, не проходящие по определенным критериям:

1. Проверка данных чипа на воспроизводимость между 6 повторами. Для каждого чипа рассчитывался обобщенный коэффициент согласованности (overall concordance correlation coefficient, OCCC) как описано в (Barnhart H. X., Haber M., Song J., 2002) и чипы с $OCCC < 0,9$ отсеивались. В результате данные по IgG с 5 чипов и данные по IgM с 17 чипов были удалены из рассмотрения.

2. Фильтрация лигандов, для которых флуоресцентная интенсивность была меньше или равна 95-ому перцентилю абсолютного отклонения медианы между повторами для (как минимум) $n-4$ образцов (n – общее число образцов)

3. Исключение лигандов с высокой вариацией между повторами (коэффициент вариации был больше или равен 0,5 для 50% образцов).

4. Оценка внутриклассового коэффициента корреляции (interclass correlation coefficient, ICC), т.е. соотношения между биологической вариабельностью и общей вариабельностью данных для каждого лиганда. Пороговое значение для ICC было 0,85.

В результате нормализации было нивелировано линейное межслайдовое смещение с незначительными потерями данных. Однако нормализация данных привела к появлению сигналов, которые были ниже значения медианы сигналов всех AgAT на слайде, и имели отрицательные значения.

Следующий этап включал нормализующее преобразование данных, в результате которого получается переменная, распределение которой более соответствует нормальному (симметричному), чем исходное. Для имеющейся выборки было использовано преобразование Бокса-Кокса (Box G. E. P., Cox D. R., 1964) с поправками, предложенными авторами (John J. A., Draper N. R., 1980) для решения проблемы учета отрицательных значений данных. Полученные результаты представлены как медианы преобразованных сигналов в группах и ее отклонения.

Далее для установления межгрупповых различий был использован непараметрический тест Вилкоксона-Манна-Уитни (WMW-тест). Значимыми считали отличия, для которых величина $p < 0,00017$, что соответствует уровню значимости 0,05 после поправки на множественность ($415 < 0,00017$), как описано в работах нашего коллектива (Зиганшина М.М., 2016; Мантрова Д.А., 2020; Тютюнник Н.В., 2019).

Поиск диагностических сигнатур, основанных на AgAT, осуществляли с помощью блочного гибридного генетического алгоритма с методом оптимизации Тагучи как описано в (Tsai J.-T., Liu T.-K., Chou J.-H., 2004) с некоторыми изменениями: 1) поиск статистически значимых признаков осуществляли с помощью WMW-теста; 2) в качестве основного классификатора использовался метод опорных векторов; 3) для повышения оценки качества сигнатуры использовался метод кросс-валидации Leave-One-Out. Для полученной сигнатуры рассчитывались следующие показатели: AUC, чувствительность, специфичность.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследование плаценты выполнялось в три этапа: на первом этапе проведено комплексное макроскопическое, детальное микроскопическое исследование, на втором – количественное гистохимическое исследование тканей плацент пациенток с физиологической и осложненной беременностью на сроках, соответствующих манифестации ранней ПЭ и ЗРП и поздней ПЭ и ЗРП, на третьем этапе – определение экспрессии мРНК генов иммунорегуляторных белков в тканях плаценты беременных с поздней ПЭ и ЗРП.

3.1. Макро- и микроскопическое исследование ткани плаценты

По результатам макро- и микроскопического исследования выявлено несоответствие массы плаценты и развития ворсинкового хориона гестационному сроку, а также выраженная облитерация, атероз сосудов створчатых ворсин, множественные инфаркты ворсинкового дерева, выраженные дистрофические изменения в виде массивных отложений фибриноида и конгломератов солей кальция у пациенток с осложненной ПЭ и ЗРП беременностью, по сравнению с пациентками с физиологической беременностью, что может свидетельствовать о плацентарной дисфункции, влияющей на рост и развитие плода, и укладывается в известные факты, связанные с изменениями плаценты при плацента-ассоциированных осложнениях беременности.

3.2. Иммуно- и гистохимическое исследование ткани плаценты

Проведено изучение углеводного фенотипа ткани плаценты методом лектиновой гистохимии с использованием панели из тринадцати биотинилированных растительных лектинов: SNA, MAL-II, UEA-I, Con A, ECA, (в соавторстве с Мантровой Д.А. и Тютюнник Н.В. (Мантрова, 2020; Тютюнник, 2019)) LTL, AAL, DSL, GSL-I, GSL-II, SBA, VVL, WGA. Панели лектинов для окрашивания ткани плаценты пациенток с ЗРП и ПЭ несколько отличались, что было обусловлено необходимостью более углубленного исследования особенностей экспрессии фукозилированных гликанов при ПЭ и N-ацетилглюкозамин-содержащих гликанов и фукозилированных гликанов при ЗРП.

В соответствии со специфичностью лектинов, указанной в Таблице 5, проводилась детекция α 2,3-сиалогликанов и α 2,6-сиалогликанов лектинами MAL-II и SNA, соответственно. Маннозобогатые гликаны детектировались лектином Con A. Для детекции паттернов фукозилированных гликанов, использовались следующие лектины:

детектирующие α 1,2-фукогликаны (окрашиваемые UEA-I, который связывается с α 1,2-фукозой, присоединенной к β -галактозе); α 1,6-фукогликаны (окрашиваемые лектином LTL, взаимодействующие преимущественно с α 1,6-остатками фукозы, связанными с N-ацетилглюкозамином (Fuc α 1,6GlcNAc)) (Зиганшина М.М. и др., 2022а); а также лектин AAL детектирующий широкий спектр фукозилированных структур, в т.ч. α 1,2-, α 1,3-, α 1,4- и α 1,6- фукогликаны. Для детекции широко представленных в гликокаликсе фрагментов N-ацетил-лактозамина (Gal β 1,4GlcNAc β 1-) в составе N-гликанов комплексного типа и 1,4-связанной терминальной β -галактозы (Gal β), использовался лектин ECA. Терминальные и олигомерные остатки N-ацетилглюкозамина выявлялись лектинами WGA и DSL. Для детекции остатков Gal α и GalNAc α использовался лектин GSL-I; терминальных остатков GlcNAc α / β – лектин GSL-II, а также лектин SBA, имеющий схожую специфичность с GSL-I, но детектирующий β -конфигурацию GalNAc. Также был использован лектин VVL, детектирующий кроме терминальных остатков α -/ β -GalNAc, еще и α -GalNAc, связанный с серином или треонином (GalNAc α 1-Ser/ Thr, Tn-антиген).

Проведен количественный анализ с использованием метода ручного выделения зоны измерения. Результаты измерений были получены в виде средних значений оптической плотности в автоматическом режиме с помощью программы анализа изображений NIS Elements Advanced Research 3.2 program (Laboratory Imaging LTD, Czech Republic). Также проводилась постановка отрицательных и положительных контрольных реакций, что позволило выбрать рабочую концентрацию лектинов и доказать отсутствие неспецифического связывания с тканью. В частности, проводилась предварительная обработка образцов ткани плаценты ферментом нейраминидазой, которая отщепляет терминальные остатки сиаловой кислоты, и демаскирует группы гликанов, окрашиваемых лектинами SNA, MAL-II, ECL, SBA и WGA. Подобный подход позволяет получать адекватные результаты, свидетельствующие об удалении терминальной сиаловой кислоты и, в результате - демаскировании субтерминальных остатков (например, лактозамина, N-ацетилгалактозамина и β -галактозы), а также и количественном содержании как терминальных, так и субтерминальных моносахаридных остатков. Кроме того, действие нейраминидазы оказывает также эффект «физического» демаскирования, т.е. экспозиции до этого пространственно скрытых фрагментов гликанов, которые становятся доступны для связывания лектинов; впрочем, нельзя исключить и противоположный эффект - маскировку соседних с десиалированными углеводных цепей из-за снижения отталкивающего эффекта отрицательного заряда сиаловых кислот.

3.2.1. Особенности гликанового профиля плаценты при ЗРП

“Измерение оптической плотности окрашенных лектинами гликоконъюгатов проводилось в области апикальной мембраны синцитиотрофобласта и эндотелия терминальных ворсин плаценты – структур плаценты, которые входят в состав плацентарного барьера. Гликаны, ассоциированные с апикальной мембраной синцития и эндотелия капилляров ворсин плаценты являются составной частью гликокаликса – внешнего, ассоциированного с мембраной слоя, который играет ключевую роль в процессах межклеточных взаимодействий и регулирует основные функции эндотелиальных клеток” (Мантрова Д.А., 2020). Окрашенные гликоконъюгаты визуализировались в обеих структурах плаценты, но интенсивность окрашивания была различной как между структурами, так и между группами сравнения. Гистохимическое исследование выявило измененный гликотип в структурах плаценты при ЗРП, что выражалось в изменениях как поверхностных (терминальных) фрагментов гликанов, так и внутренних (субтерминальных) при обеих формах ЗРП по сравнению с физиологической беременностью.

“Установлено, что физиологическая беременность характеризуется значимой представленностью α 2,6-сиалогликанов (SNA) и маннозобогатых гликанов (Con A) в эндотелиальном гликокаликсе терминальных ворсин плаценты, но, напротив экспрессия ряда гликанов, в частности, маннозобогатых гликанов, α 2,3-сиалогликанов (MAL-II) и остатков N-ацетилглюкозамина (GSL-II) в гликокаликсе синцитиотрофобласта выражена слабее относительно патологии. Значения оптической плотности окрашенных лектинами гликоконъюгатов, которая отражает количество представленных в гликокаликсе остатков гликанов в соответствии со специфичностью связывающихся с ними лектинов, представлены в Таблицах 9 и 10 и Рисунке 23 и Рисунке 24.

Ранняя ЗРП характеризуется выраженным изменением гликотипа как синцитиотрофобласта, так и эндотелия терминальных ворсин. В составе эндотелиального гликокаликса значимо снижены по сравнению с физиологической беременностью α 2,6-сиалогликаны (SNA), остатки маннозы (Con A) и олиго-N-ацетиллактозаминовые фрагменты гликанов (ECL), но, напротив, повышены фукогликаны (UEA-I), α 2,3-сиалогликаны (MAL-II), остатки N-ацетилглюкозамина (GSL-II) и N-ацетилгалактозамина (VVL). В гликокаликсе синцитиотрофобласта при ранней ЗРП установлено значимое повышение экспрессии маннозобогатых цепей гликанов (Con A), α 2,3-сиалогликанов (MAL-II), терминальных остатков N-ацетилглюкозамина (GSL-II), и остатков N-ацетилгалактозамина (VVL)” (Зиганшина М.М. и др., 2019; Зиганшина М.М. и др., 2020; Зиганшина М.М. и др., 2022а), но снижена экспрессия фукогликанов (UEA-I), олиго-N-ацетиллактозаминовых фрагментов гликанов (ECL), остатков N-ацетилгалактозамина

(SBA). Вышеописанные изменения затрагивают терминальные остатки гликанов. После ферментативной обработки ткани плаценты нейраминидазой значительно и значимо увеличилось связывание лектина SBA с гликоконъюгатами эндотелия терминальных ворсин плаценты; субтерминальные структуры синцитиотрофобласта не демонстрировали изменений (Таблица 9 и 10, Рисунок 23, Рисунок 24).

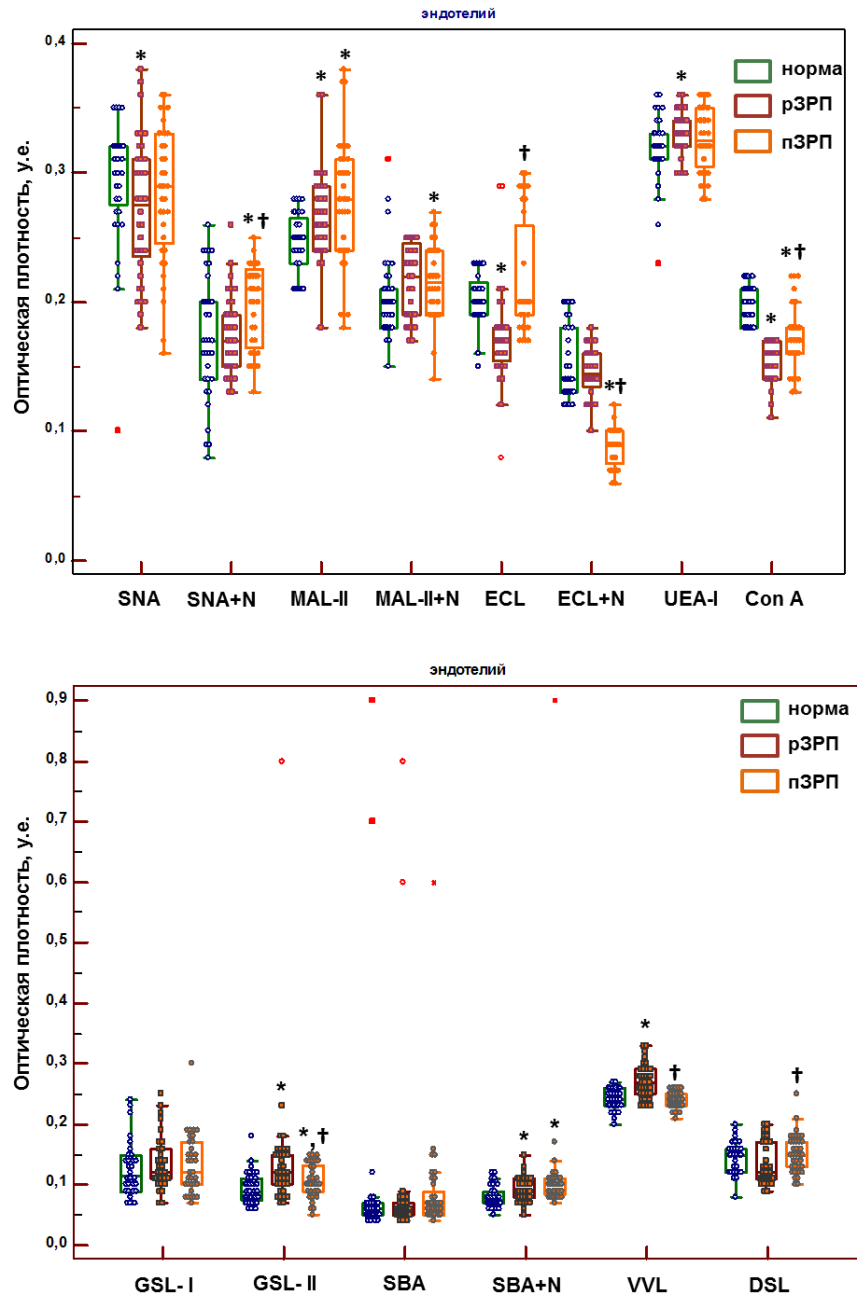


Рисунок 23. Содержание гликоконъюгатов, окрашиваемых лектинами в фетальном эндотелии капилляров терминальных ворсин плаценты у пациенток с физиологической беременностью и беременностью, осложненной развитием ЗРП ранней и поздней манифестации, * - сравнение с нормальной беременностью, † - сравнение рЗРП и пЗРП, $p < 0,05$.

“При поздней ЗРП выявлено значимое повышение экспрессии $\alpha 2,3$ -сиалогликанов (MAL-II) в гликокаликсе обеих исследованных структур плаценты. Экспрессия

маннозобогатых гликанов (Con A) была снижена в эндотелии и, напротив, повышена в синцитиотрофобласте” (Зиганшина М.М. и др., 2022а). “Повышенная экспрессия α 2,6-сиалогликанов (SNA) и олиго-N-ацетиллактозаминовых фрагментов гликанов (ECL) установлена только в составе гликокаликса синцитиотрофобласта. В эндотелиальном гликокаликсе фетальных капилляров при поздней ЗРП выявляется повышение экспрессии N-ацетилглюкозамина (GSL-II), однако менее выраженное, чем при ранней ЗРП.

Особенности гликотипа плаценты при поздней ЗРП проявляются в более выраженных изменениях экспрессии субтерминальных гликанов. В частности, после ферментативной предобработки ткани, в составе гликокаликса синцитиотрофобласта выявляется сниженная экспрессия N-ацетиллактозаминовых фрагментов гликанов (ECL). Более разнообразные изменения, затрагивающие внутренние структуры гликанов, обнаружены в гликокаликсе эндотелия фетальных капилляров терминальных ворсин плаценты” (Мантрова Д.А., 2020). Так, установлено значимое снижение экспрессии субтерминальных N-ацетиллактозаминовых фрагментов гликанов (ECL). Также выявлен значимо повышенный уровень экспрессии остатков α/β -N-ацетилгалактозамина и α -галактозы, окрашиваемых SBA.

Ввиду отсутствия группы сравнения для ранней ЗРП, особенный интерес представляет сопоставление изменений гликанов в структурах плаценты при ранней и поздней ЗРП. “Анализ данных показал, что при ранней ЗРП значимо ниже экспрессия N-ацетиллактозаминовых фрагментов гликанов (ECL) и, напротив, выше экспрессия остатков N-ацетилглюкозамина (GSL-II) в гликокаликсе обеих исследованных структур плаценты. Также, при ранней ЗРП значимо выше экспрессия маннозобогатых гликанов (Con A), остатков α/β N-ацетилгалактозамина (VVL) и ниже экспрессия фукогликанов (UEA-I) в гликокаликсе синцитиотрофобласта терминальных ворсин плаценты. В составе эндотелиального гликокаликса установлена повышенная экспрессия остатков α/β N-ацетилгалактозамина (VVL), но снижена экспрессия β -1,4 связанных олигомеров N-ацетилглюкозамина (DSL).

Повышенная экспрессия гликанов с остатками α/β N-ацетилгалактозамина и α -галактозы (Рисунок 23) выявляется при обеих формах ЗРП в гликокаликсе эндотелия терминальных ворсин после ферментативной обработки, демаскирующей субтерминальные моносахаридные остатки” (Зиганшина М.М. и др., 2019). Но при поздней ЗРП изменения внутренних структур гликанов гликокаликса структур плаценты более выражены, что выявляется после действия нейраминидазы. “В обеих структурах терминальных ворсин плаценты при поздней ЗРП значимо снижены олиго-N-ацетиллактозаминовые фрагменты гликанов, демаскированные после отщепления

сиаловой кислоты (Рисунок 23, Рисунок 24). Микрофотографии, демонстрирующие окрашенный лектинами продукт реакции в тканях плаценты при нормальной беременности и осложненной развитием ЗРП ранней и поздней манифестации представлены на Рисунке 25” (Зиганшина М.М. и др., 2022а).

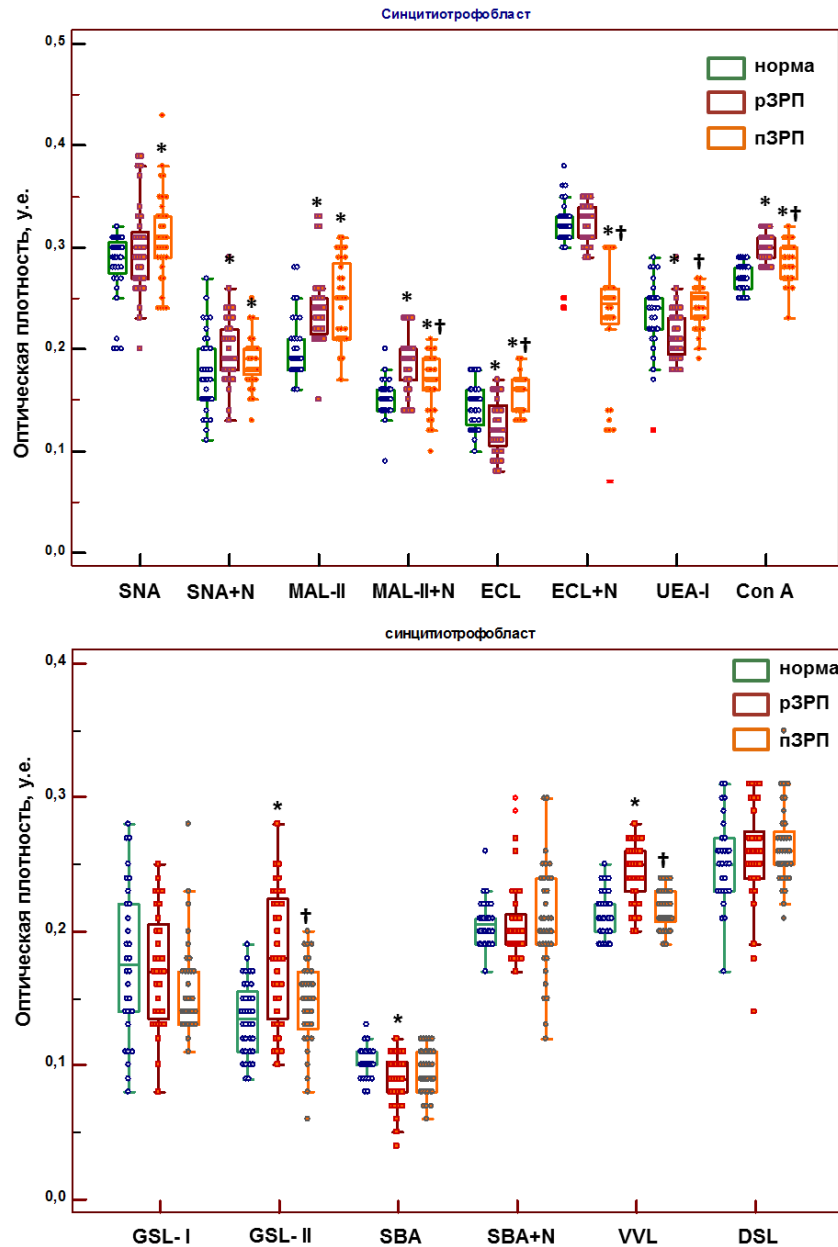


Рисунок 24. Содержание остатков гликанов, окрашиваемых лектинами в синцитиотрофобласте терминальных ворсин плаценты у пациенток с физиологической беременностью и беременностью, осложненной развитием ЗРП ранней и поздней манифестации, * - сравнение с нормальной беременностью, †- сравнение рЗРП и пЗРП, $p < 0,05$.

“Таблица 9. Содержание гликоконъюгатов, окрашиваемых лектинами в гликокаликсе синцитиотрофобласта при нормальной беременности и задержке роста плода.

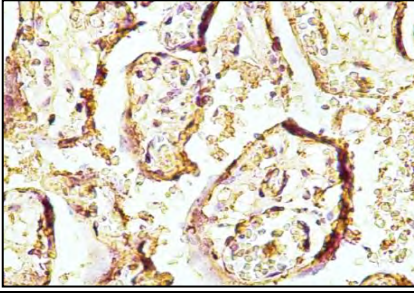
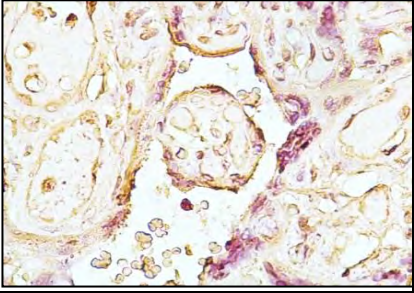
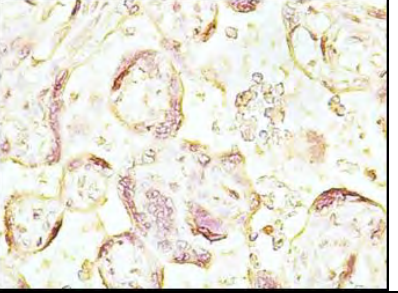
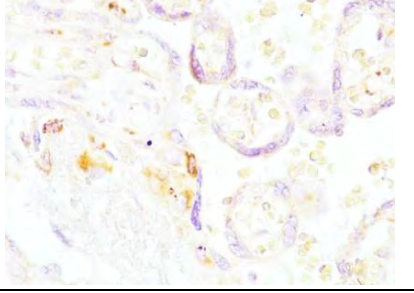
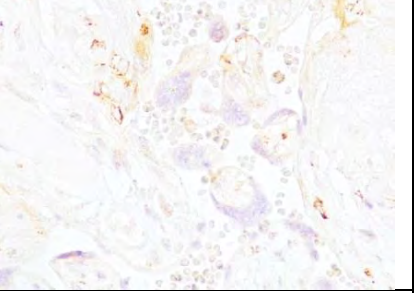
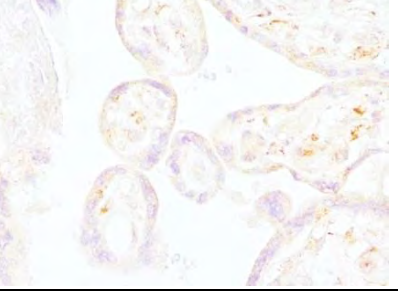
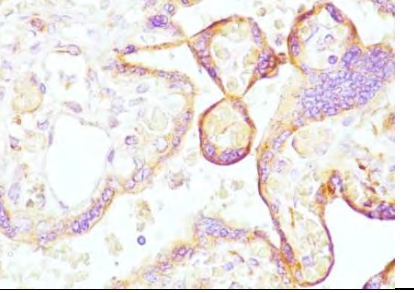
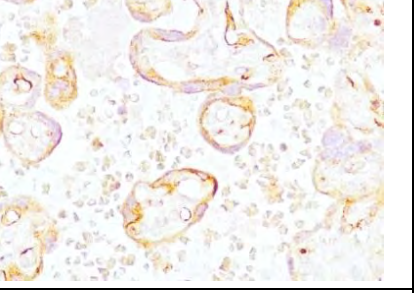
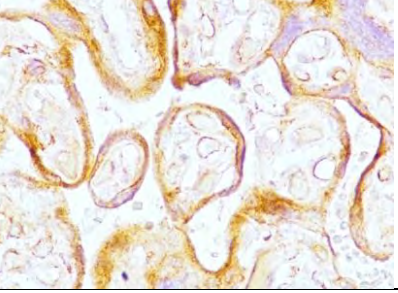
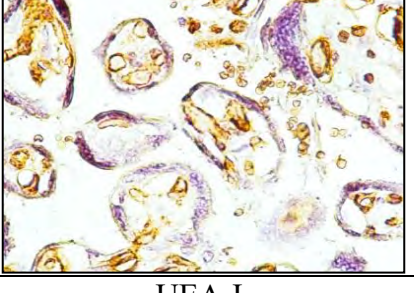
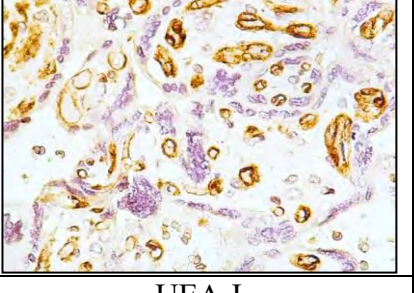
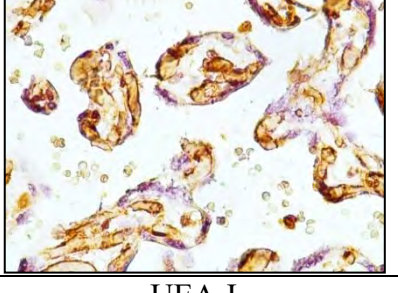
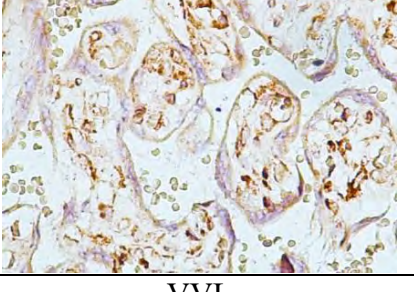
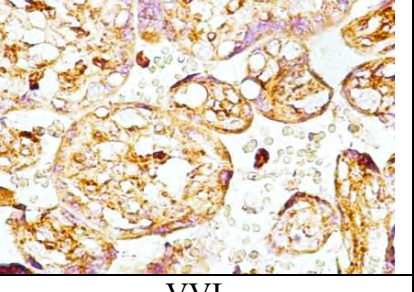
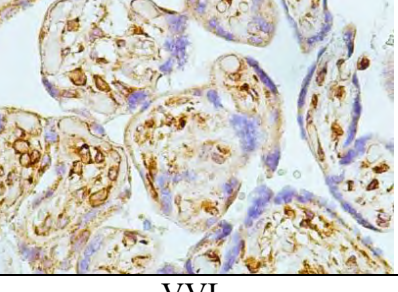
Лектин	Физиологическая беременность (n=11)	Ранняя ЗРП (n=10)	Поздняя ЗРП (n=10)	p ₁ -уровень ФБ/рЗРП	p ₂ -уровень ФБ/пЗРП	p ₃ -уровень рЗРП/пЗРП
Concanavalin A (Con A)	0,280 (0,260; 0,280)	0,300 (0,290; 0,310) †	0,290 (0,270; 0,300) †,‡	<0,001	0,001	0,003
<i>Ulex europaeus</i> agglutinin-I (UEA-I)	0,230 (0,220; 0,250)	0,210 (0,195; 0,230) †	0,240 (0,230; 0,255) ‡	0,006	0,256	<0,001
<i>Maackia amurensis</i> Lectin II (MAL-II)	0,190 (0,180; 0,210)	0,240 (0,215; 0,250) †	0,250 (0,210; 0,285) †	<0,001	<0,001	0,685
MAL-II+нейраминидаза	0,150 (0,140; 0,160) *	0,190 (0,170; 0,200) *,†	0,170 (0,160; 0,190)*,†,‡	<0,001	0,001	0,001
<i>Sambucus nigra</i> agglutinin (SNA)	0,290 (0,275; 0,305)	0,290 (0,270; 0,315)	0,310 (0,290; 0,330) †	0,685	0,005	0,115
SNA+нейраминидаза	0,170 (0,150; 0,200) *	0,190 (0,180; 0,220) *,†	0,190 (0,175; 0,200) *,†	0,004	0,033	0,244
<i>Erythrina cristagall</i> Agglutinin (ECA)	0,150 (0,125; 0,160)	0,120 (0,105; 0,145) †	0,160 (0,140; 0,170) †,‡	0,002	0,004	<0,001
ECA+нейраминидаза	0,320 (0,310; 0,330) *	0,330 (0,310; 0,340) *	0,245 (0,225; 0,260)*, †,‡	0,632	<0,001	<0,001
<i>Griffonia Simplicifolia</i> Lectin I (GSL-I)	0,175 (0,140-0,220)	0,170 (0,135-0,205)	0,140 (0,130-0,170)	0,683	0,128	0,145
<i>Griffonia Simplicifolia</i> Lectin II (GSL-II)	0,135 (0,110-0,155)	0,180 (0,135-0,225) †	0,150 (0,130-0,170) ‡	<0,001	0,085	0,005
Soybean Agglutinin (SBA)	0,100 (0,100-0,110)	0,090 (0,080-0,100) †	0,090 (0,080-0,110)	0,014	0,119	0,269
SBA+нейраминидаза	0,205 (0,190-0,210)*	0,200 (0,190-0,210)*	0,200 (0,190-0,240)*	0,277	0,932	0,598
<i>Vicia villosa</i> Lectin VVL	0,210 (0,200-0,220)	0,250 (0,230-0,260) †	0,210 (0,210-0,230) ‡	<0,001	0,487	<0,001
<i>Datura Stramonium</i> Lectin DSL	0,250 (0,230-0,270)	0,260 (0,240-0,270)	0,260 (0,250-0,275)	0,370	0,161	0,804

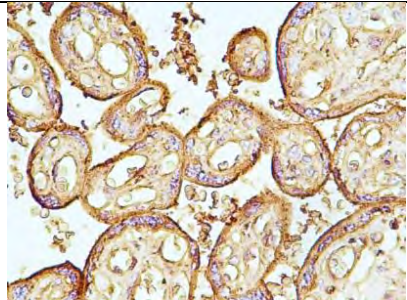
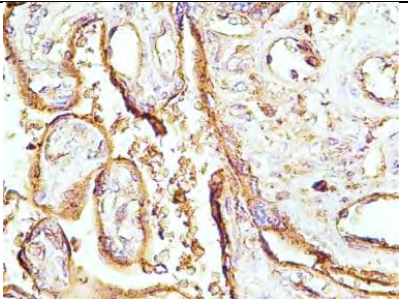
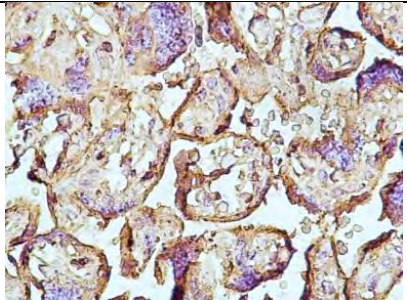
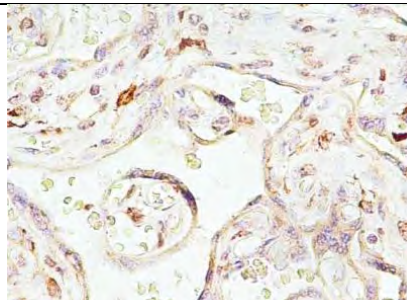
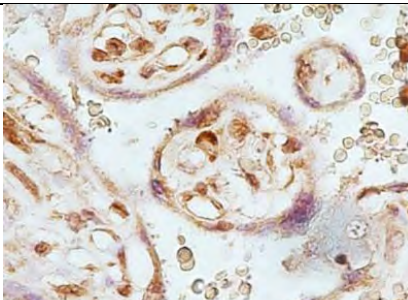
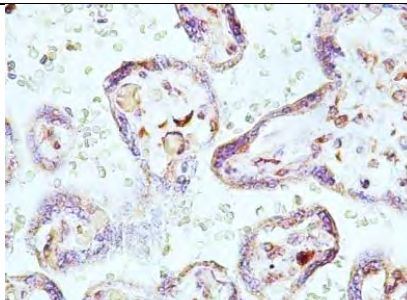
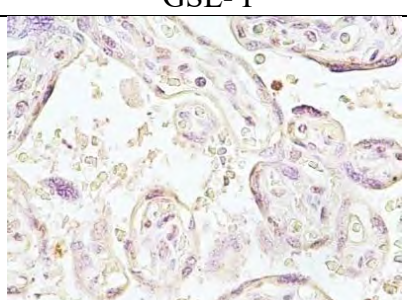
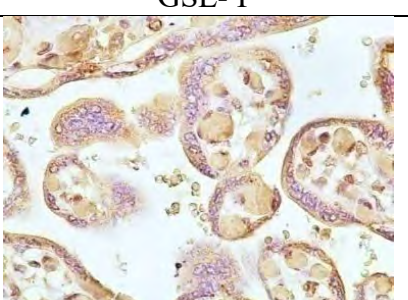
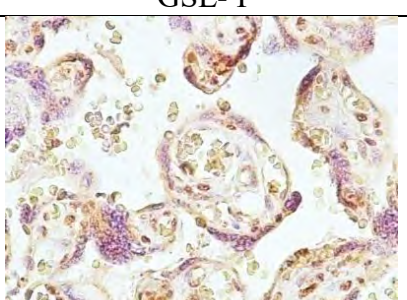
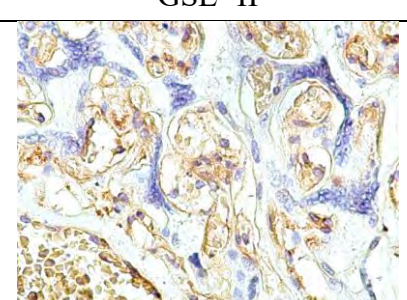
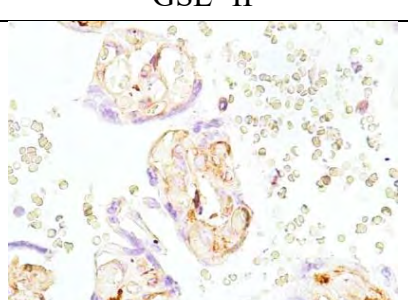
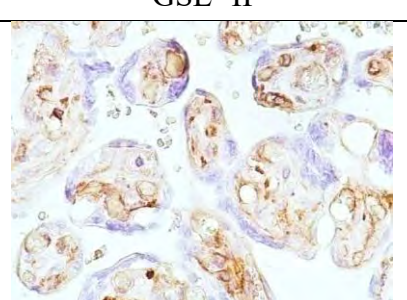
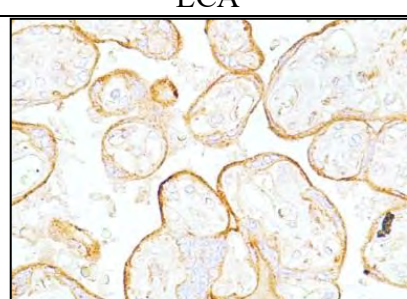
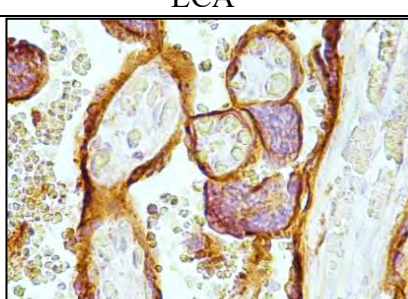
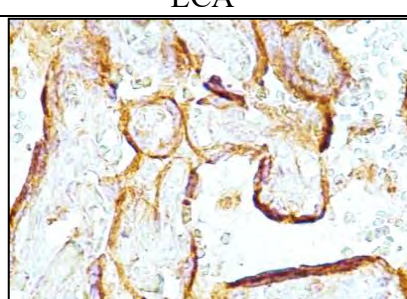
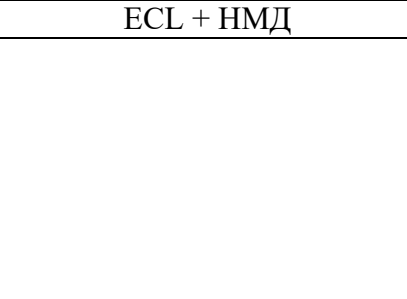
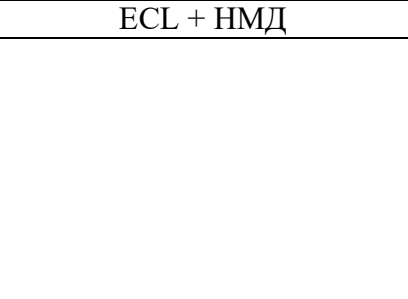
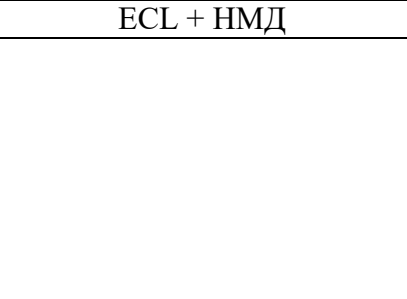
* -сравнение со значением оптической плотности до обработки ткани нейраминидазой; † - сравнение с физиологической беременностью; ‡ -сравнение с ранней ЗРП

Таблица 10. Содержание гликоконъюгатов, окрашиваемых лектинами в гликокаликсе эндотелия терминальных ворсин плаценты при нормальной беременности и задержке роста плода.

Лектин	Физиологическая беременность (n=11)	Ранняя ЗРП (n=10)	Поздняя ЗРП (n=10)	p ₁ -уровень ФБ/рЗПР	p ₂ -уровень ФБ/пЗПР	p ₃ -уровень рЗРП/пЗПР
Concanavalin A (Con A)	0,200 (0,180; 0,210)	0,160 (0,140; 0,170) †	0,170 (0,160; 0,180) †,‡	<0,001	<0,001	0,001
<i>Ulex europaeus</i> agglutinin-I (UEA-1)	0,320 (0,310; 0,330)	0,330 (0,320; 0,340) †	0,325 (0,305; 0,350)	0,026	0,310	0,411
<i>Maackia amurensis</i> Lectin II (MAL-II)	0,250 (0,230; 0,265)	0,260 (0,240; 0,290) †	0,280 (0,240; 0,310) †	0,005	0,002	0,2092
MAL-II+нейраминидаза	0,200 (0,180; 0,210) *	0,220 (0,190; 0,245) *	0,215 (0,190; 0,240) *,†	0,097	0,039	0,964
<i>Sambucus nigra</i> agglutinin (SNA)	0,310 (0,275; 0,320)	0,275 (0,235; 0,310) †	0,290 (0,245; 0,330)	0,028	0,536	0,228
SNA+нейраминидаза	0,170 (0,140; 0,200)*	0,170 (0,150; 0,190)*	0,210 (0,165; 0,225)*,†,‡	0,769	0,046	0,003
<i>Erythrina cristagalli</i> Agglutinin (ECA)	0,200 (0,190; 0,215)	0,170 (0,155; 0,180) †	0,200 (0,190; 0,270) ‡	<0,001	0,995	<0,001
ECA+нейраминидаза	0,140 (0,130; 0,180)	0,145 (0,135; 0,160)	0,090 (0,075; 0,100) †,‡	0,677	<0,001	<0,001
<i>Griffonia simplicifolia</i> Lectin I (GSL-I)	0,115 (0,090-0,150)	0,120 (0,110-0,160)	0,120 (0,100-0,170)	0,379	0,522	0,768
<i>Griffonia simplicifolia</i> Lectin II (GSL-II)	0,090 (0,075-0,110)	0,120 (0,100-0,150) †	0,100 (0,090-0,130) †,‡	<0,001	0,044	0,029
Soybean Agglutinin (SBA)	0,060 (0,050-0,070)	0,060 (0,050-0,070)	0,070 (0,050-0,090)	0,923	0,105	0,059
SBA+нейраминидаза	0,075 (0,070-0,090)*	0,090 (0,080-0,110)*, †	0,100 (0,080-0,110)*, †	0,017	<0,001	0,120
<i>Vicia villosa</i> Lectin (VVL)	0,240 (0,230-0,260)	0,270 (0,250-0,290) †	0,240 (0,230-0,250) ‡	<0,001	0,587	<0,001
<i>Datura Stramonium</i> Lectin (DSL)	0,150 (0,120-0,160)	0,120 (0,110-0,170)	0,150 (0,130-0,170) ‡	0,058	0,253	0,014

* -сравнение со значением оптической плотности до обработки ткани нейраминидазой; † - сравнение с физиологической беременностью; ‡ -сравнение с ранней ЗРП “ (Зиганшина М.М. и др., 2022a). А также в частичном соавторстве с (Мантрова Д.А., 2020)

НОРМА	РАННЯЯ ЗРП	ПОЗДНЯЯ ЗРП
		
CON A	CON A	CON A
		
SBA	SBA	SBA
		
SBA +HMД	SBA +HMД	SBA +HMД
		
UEA-I	UEA-I	UEA-I
		
VVL	VVL	VVL

НОРМА	РАННЯЯ ЗРП	ПОЗДНЯЯ ЗРП
		
DSL	DSL	DSL
		
GSL- I	GSL- I	GSL- I
		
GSL- II	GSL- II	GSL- II
		
ECA	ECA	ECA
		
ECL + НМД	ECL + НМД	ECL + НМД
		

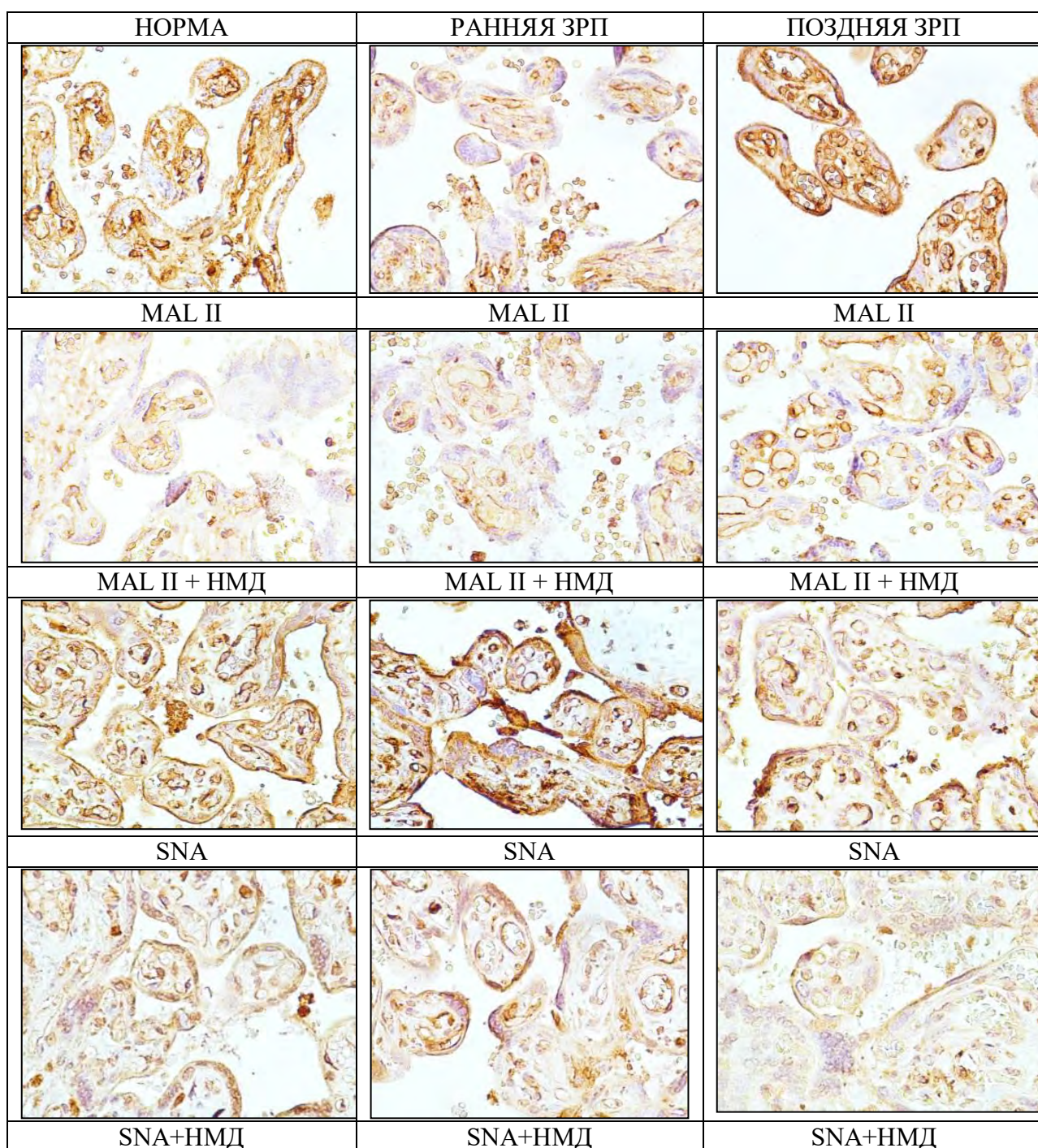


Рисунок 25. Микрофотографии, демонстрирующие окрашивание гликоконъюгатов лектинами в тканях плаценты при нормальной беременности и осложненной развитием ЗРП ранней и поздней манифестации. Для лектинов ECL, SNA, MAL-II и SBA представлено окрашивание в двух вариантах: окрашивание нативной ткани и после предбрабтки ткани нейраминидазой («НМД»). Увеличение x 400.

3.2.2. Исследование фукозилированных гликанов при ЗРП

Для поиска молекулярных маркеров, ассоциированных с измененным ангиогенезом плаценты и нарушенными межклеточными контактами при ее формировании, были подробно исследованы изменения фукозилированных гликанов с кором типа 1 (Gal β 1-3GlcNAc β -), детектируемых лектином BC2L-C-Nt (бактериальный лектин из условно-патогенной бактерии *Burkholderia cenocepacia*), и типа 2 (Gal β 1-4GlcNAc β -), детектируемых лектином UEA-I и анти-Le^Y моноклональными антителами (анти-Le^Y МАт) в терминальных ворсинах плаценты. В рамках данной задачи было выполнено исследование по уточнению углеводной специфичности использованных лектинов и антител с помощью гликочипа (Семиотик, Россия), содержащего 400 различных гликанов и их фрагментов, напечатанного на стеклянных слайдах H Schott-Nexterion (Германия).

По результатам микрочипового анализа установлено, что анти-Le^Y МАт преимущественно связываются с гликаном Le^Y. Значительно более слабое связывание установлено с антигеном группы крови А (тип 3) (связывание в 2 раза меньше по сравнению с Le^Y), с некоторыми сульфатированными гликанами и гликанами, содержащими терминальные остатки GlcNAc β - (в 4 раза меньше), что, по-видимому, обусловлено наличием в препарате моноклональных антител примеси естественных антител мыши (Рисунок 26 А). “Исследование углеводной специфичности лектинов UEA-I и BC2L-C-Nt, показало, что UEA-I связывается с фукозилированными структурами, которые содержат углеводную последовательность Gal β 1-4GlcNAc (углеводные структуры типа 2), включая антигены Н типа 2 и Le^Y, а также ряд других гликанов, имеющих в основе структуры типа 2 (Рисунок 26 В)”, как установлено в работах нашего коллектива (Зиганшина М.М. и др., 2020; Ziganshina M.M. et al., 2021). Углеводная специфичность лектина BC2L-C-Nt ограничена фукозилированными структурами типа 1 (содержат Gal β 1-3GlcNAc, структуры типа 1). Связывание BC2L-C-Nt с гликанами на основе структур 2 типа, а также вариантами антигена группы крови В была значительно слабее (Рисунок 26 С). Т.о. представленные данные свидетельствуют о специфичности анти-Le^Y МАт к гликану Le^Y, предпочтительному связыванию лектина UEA-I с гликаном Н тип 2 и преимущественному связыванию BC2L-C-Nt с гликаном Le^B и Н тип 1 (Рисунок 26).

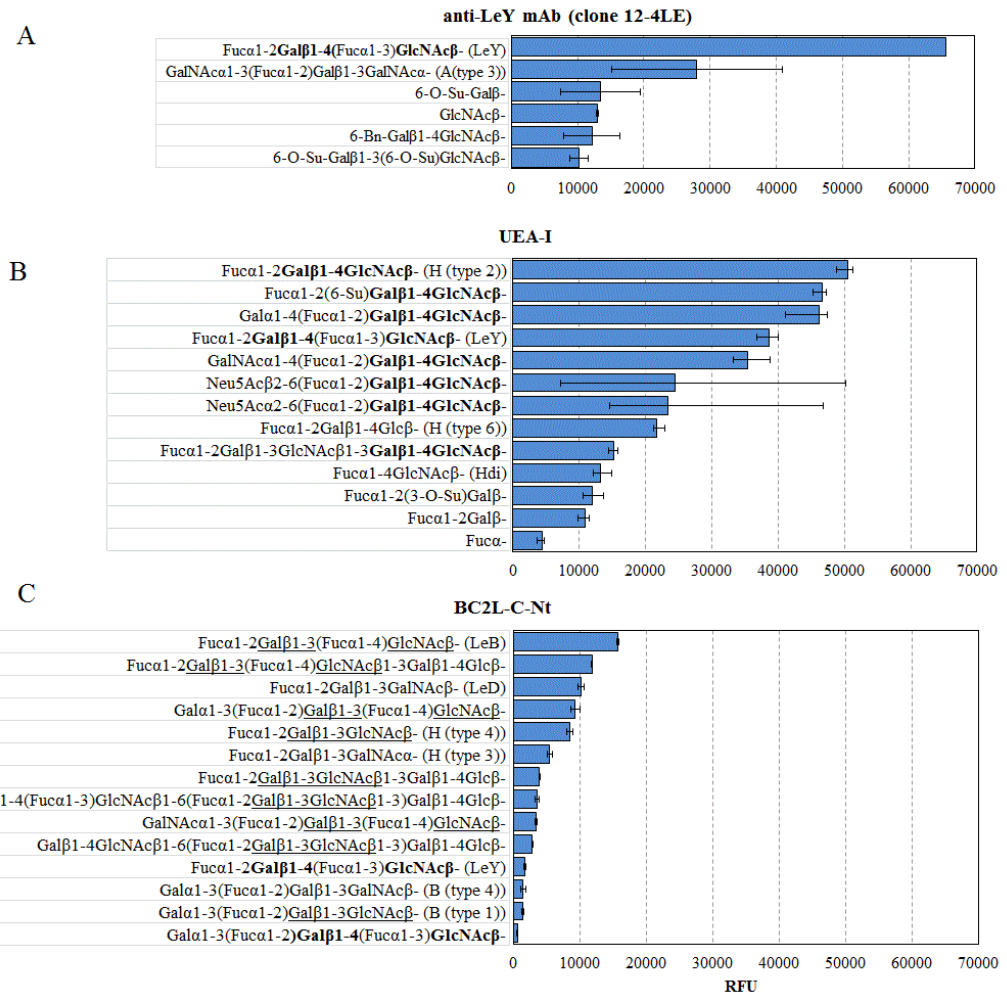


Рисунок 26. Углеводная специфичность анти-Le^Y МАт (А), растительного лектина UEA-I (В) и бактериального лектина BC2L-C-Nt (С), определенная с помощью гликочипа. Кор типа 1 выделен подчеркиванием, кор типа 2 – жирным шрифтом.

Уточненные данные специфичности антител и лектинов позволили выявить особенности экспрессии и фукогликанов в эндотелии терминальных ворсин плаценты. Выявлено, что в составе гликокаликса эндотелия ворсин обнаружены фукогликаны с кором типа 2 (окраска UEA-I и анти-Le^Y МАТ), но отсутствуют с кором типа 1 (нет окраски лектином BC2L-C-Nt). Установлено значимое повышение экспрессии гликана Н тип 2 (окраска UEA-I) и гликана Le^Y в эндотелии ворсин (Рисунок 27). Результаты иммуно-/гистохимического окрашивания представлены на Рисунке 28, соответствующие онтрольные микропрепараты – на Рисунке 29. Изменения экспрессии фукозилированных гликанов в эндотелии терминальных ворсин схожи при обеих формах ЗРП: для обоих гликанов выявлено значимое увеличение экспрессии по сравнению с нормой (Рисунок 27).

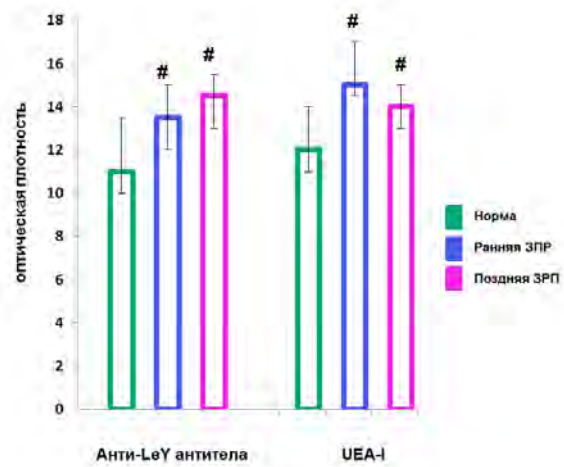


Рисунок 27. Количественная характеристика экспрессии фукозилированных гликанов в эндотелии терминальных ворсин плаценты при ранней и поздней ЗРП. # - сравнение с нормой; данные представлены как медиана и межквартильный размах. U-тест Манна-Уитни.

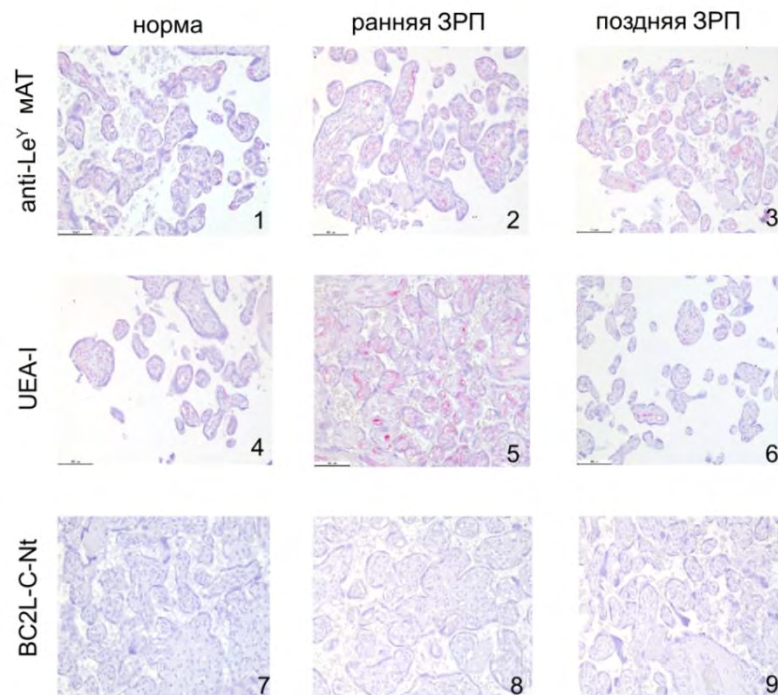


Рисунок 28. Микрофотографии, демонстрирующие окрашивание фукозилированных гликанов в эндотелиальном гликокаликсе терминальных ворсин плаценты

1 - Слабое и равномерное окрашивание анти-Le^Y МАТ эндотелиального гликокаликса нормальной плаценты.

2 - Интенсивное и неравномерное окрашивание эндотелиального гликокаликса анти-Le^Y МАТ в ткани плаценты при ранней ЗРП по сравнению с нормой.

3 - Неравномерное и более интенсивное окрашивание эндотелиального гликокаликса при поздней ЗРП по сравнению с нормой.

4 - Неравномерное окрашивание эндотелиального гликокаликса лектином UEA-I в нормальной плаценте.

5 - Интенсивное, неравномерное и более выраженное окрашивание эндотелиального гликокаликса лектином UEA-I в плаценте с ранней ЗРП по сравнению с нормой.

6 - Неравномерное и более интенсивное окрашивание лектином UEA-I эндотелиального гликокаликса при поздней ЗРП по сравнению с нормой.

7, 8, 9 Отсутствие окрашивания лектином BC2L-C-Nt в эндотелиальном гликокаликсе терминальных ворсин плаценты у пациенток всех исследуемых групп.

Шкала 50 мкм (данные получены в соавторстве и опубликованы в (Ziganshina M.M. et al., 2020a))

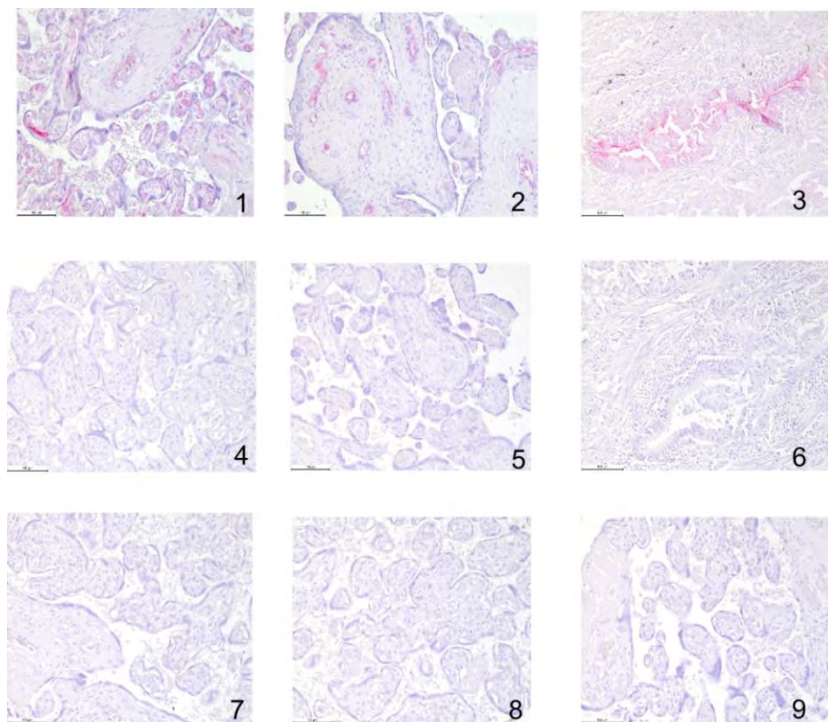


Рисунок 29. Контрольные микропрепараты, демонстрирующие окрашивание ткани плаценты лектинами и МАт. Нормальная ткань плаценты с (1) и без (4) МАт против Le^Y; нормальная ткань плаценты с (2) и без (5) UEA-I; ткань аденокарциномы легкого с (3) и без (6) BL2LC-Nt; нормальная плацентарная ткань без BL2LC-Nt (7); нормальная ткань плаценты, окрашенная UEA-I (8) и МАт к Le^Y в присутствии конкурирующего моносахарида 0,2 М L-фукозы (9). Шкала 50 мкм

Результаты данного раздела опубликованы в (Зиганшина М.М. и др., 2019; Зиганшина М.М.и др., 2022a; Ziganshina M.M. et al., 2020a).

3.2.3. Особенности гликанового профиля плаценты при ПЭ

“Установлено, что при нормальной беременности в гликокаликсе синцитиотрофобласта и эндотелия терминальных ворсин плаценты значимо представлены α 2,3-сиалогликаны (MAL-II), но выявлен низкий уровень экспрессии N-ацетиллактозаминовых фрагментов гликанов (ECL), фукозы (UEA-I), маннозы (Con A), а также терминальных и полимеризованных остатков N-ацетилглюкозамина (WGA). В гликокаликсе синцитиотрофобласта детектируется низкое содержание остатков N-ацетилглюкозамина (GSL-II), а в гликокаликсе эндотелия – низкая экспрессия α 2,6-сиалогликанов (SNA).

Анализ гистохимических микропрепаратов плацент с осложненной беременностью выявил изменения оптической плотности продукта гистохимических реакций в гликокаликсе эндотелия сосудов и синцитиотрофобласте терминальных ворсин плацент по сравнению с нормальной беременностью (Таблица 11, Таблица 12).

При ранней ПЭ экспрессия $\alpha 2,3$ -сиалогликанов (MAL-II) снижена в гликокаликсе синцитиотрофобласта и эндотелия, а экспрессия $\alpha 2,6$ -сиалогликанов (SNA) повышена в эндотелии, но не изменена в синцитиотрофобласте. В гликокаликсе обеих исследуемых структур плаценты при ранней ПЭ, выявлена повышенная по сравнению с нормой экспрессия остатков фукозы (UEA-I), маннозы (Con A), N-ацетиллактозаминовых фрагментов гликанов (ECL), α/β -связанных остатков N-ацетилгалактозамина (VVL), терминальных остатков олиго-N-ацетилглюкозамина (WGA). В гликокаликсе синцитиотрофобласта значимо повышены остатки N-ацетилглюкозамина (GSL-II). Субтерминальные остатки гликанов также изменены при ранней ПЭ: в гликокаликсе обеих исследованных структур плаценты выявлено повышение экспрессии субтерминальных N-ацетиллактозаминовых фрагментов гликанов (ECL). В гликокаликсе эндотелия установлено снижение субтерминальных α - и β -связанных остатков N-ацетилгалактозамина (SBA). Ферментативное удаление остатков сиаловых кислот позволило выявить субтерминальных остатков олиго-N-ацетилглюкозамина (WGA): повышение - в гликокаликсе эндотелия, и снижение в синцитиотрофобласте, что свидетельствует о физическом демаскировании этих фрагментов гликанов (объяснение см. выше).

Изменения при поздней ПЭ включали снижение экспрессии терминальных $\alpha 2,3$ -сиалогликанов (MAL-II) и, напротив, повышение N-ацетиллактозаминовых фрагментов гликанов (ECL), остатков фукозы (UEA-I), маннозы (Con A), терминальных остатков N-ацетилглюкозамина (WGA) в гликокаликсе обеих исследуемых структур плаценты по сравнению с нормой. В гликокаликсе синцитиотрофобласта значимо представлены терминальные остатки N-ацетилглюкозамина (GSL-II), а в эндотелии - $\alpha 2,6$ -сиалогликанов (SNA) по сравнению с экспрессией в аналогичных структурах нормальной плаценты (Рисунок 30, Рисунок 31)” (Зиганшина М.М. и др., 2019; Зиганшина М.М. и др., 2020).

Анализ изменения содержания субтерминальных остатков гликанов, выявляемых после обработки ткани плаценты нейраминидазой показал, что при поздней ПЭ значимо повышены N-ацетиллактозаминовые фрагменты гликанов (ECL) в гликокаликсе обеих структур исследованных плацент. В гликокаликсе эндотелия повышены субтерминальные остатки N-ацетилглюкозамина (WGA).

Сравнение экспрессии гликанов в гликокаликсе синцитиотрофобласта и эндотелия терминальных ворсин плаценты при ранней и поздней манифестации ПЭ показал, что наблюдаются схожие изменения экспрессии большинства исследованных гликанов (Рисунок 30, Рисунок 31, Таблица 11, Таблица 12), вследствие этого выявляются минимальные различия в гликотипе структур плаценты между двумя формами ЗРП.

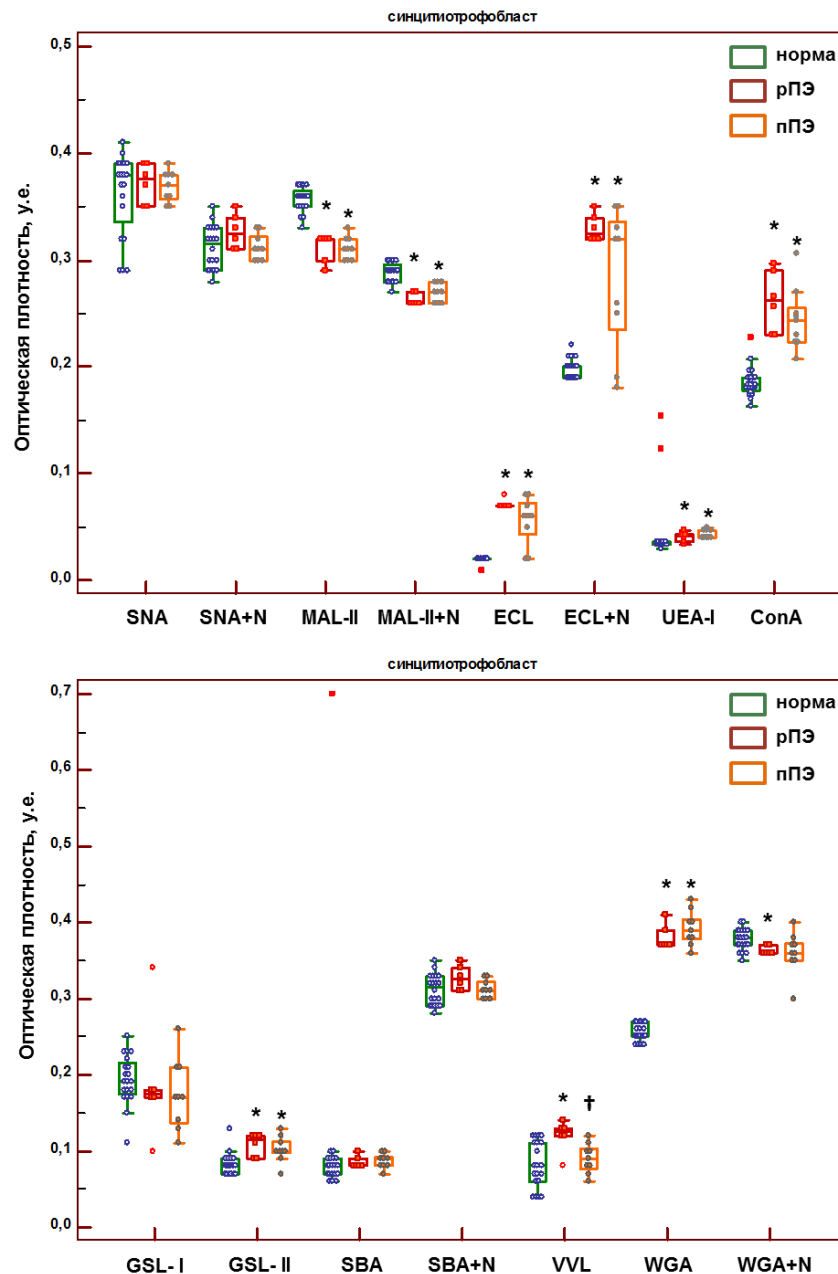


Рисунок 30. Содержание остатков гликанов, окрашиваемых лектинами в синцитиотрофобласте терминальных ворсин плаценты, * - сравнение с нормальной беременностью, †- сравнение рПЭ и пПЭ, $p < 0,05$.

“Особенностью ранней ПЭ является повышенная экспрессия α/β -связанных остатков N-ацетилгалактозамина, включая гликаны, терминированные дисахаридом GalNAc α 1,3Gal β 1- и O-гликаны GalNAc α 1-Ser/Thr (Tn антиген), окрашиваемые лектином VVL в составе гликокаликса обеих исследованных структур плаценты и более низкая

экспрессия $\alpha 2,3$ -сиалогликанов в гликокаликсе фетального эндотелия. Экспозиция субтерминальных структур гликанов показала, что при ранней ЗРП по сравнению с поздней, в гликокаликсе эндотелия экспрессия олиго-N-ацетилглюкозамина значительно более низкая (Рисунок 31, Таблица 11). Микрофотографии, демонстрирующие окрашивание гликоконъюгатов лектинами в тканях плаценты при нормальной беременности и осложненной развитием ПЭ ранней представлены на Рисунке 32” (Зиганшина М.М. и др., 2019; Зиганшина М.М. и др., 2022a).

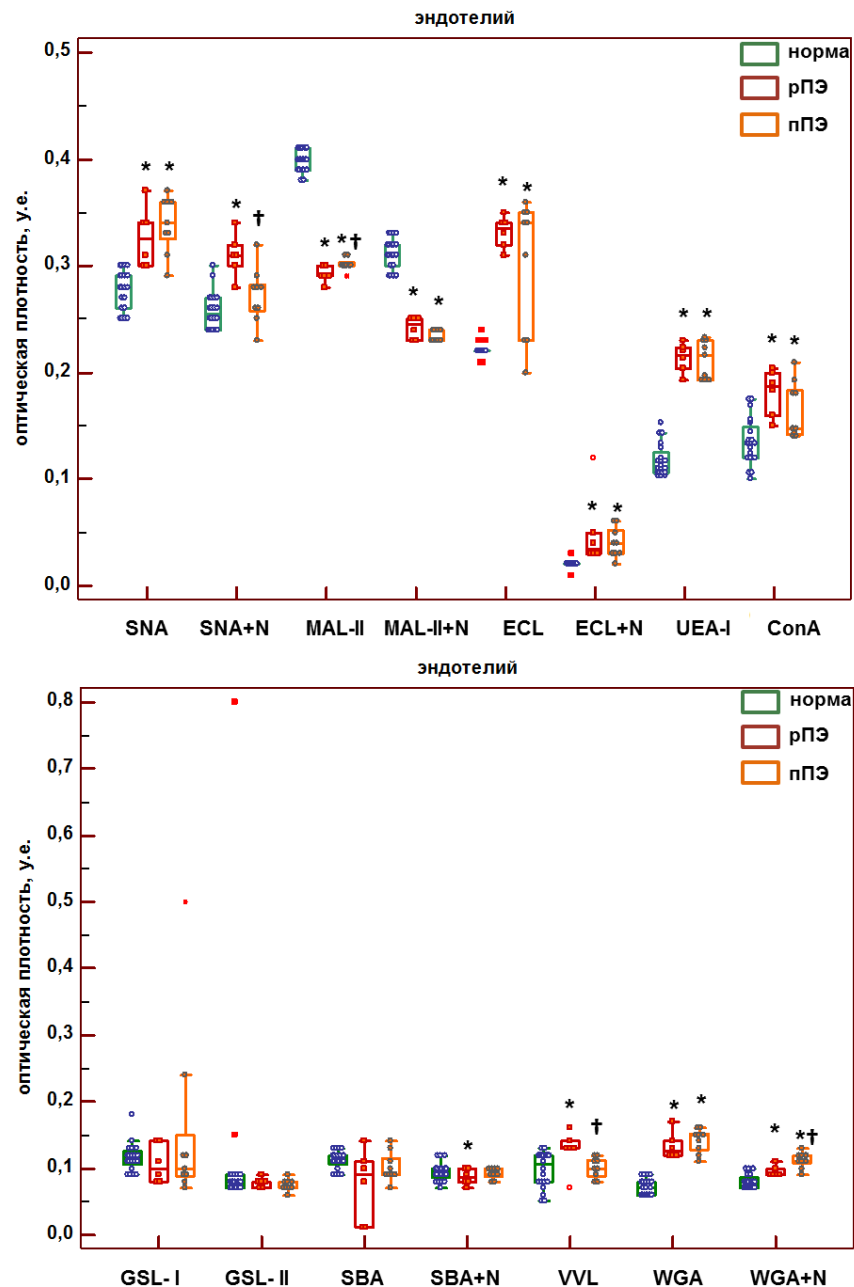


Рисунок 31. Содержание остатков гликанов, окрашиваемых лектинами в эндотелии терминальных ворсин плаценты, * - сравнение с нормальной беременностью, † - сравнение рПЭ и пПЭ, $p < 0,05$.

Таблица 11. Содержание гликоконъюгатов, окрашиваемых лектинами с известной специфичностью в эндотелии терминальных ворсин плаценты при физиологической и осложненной преэклампсией беременностью на ранних и поздних сроках

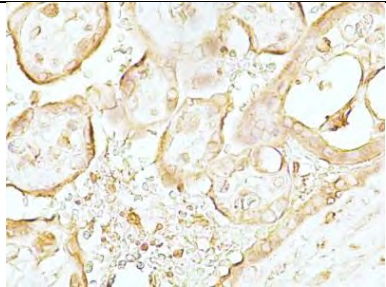
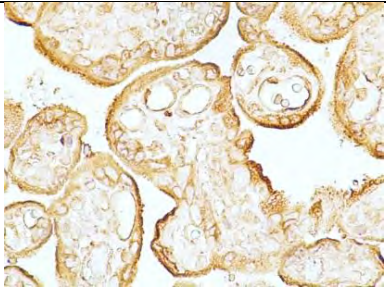
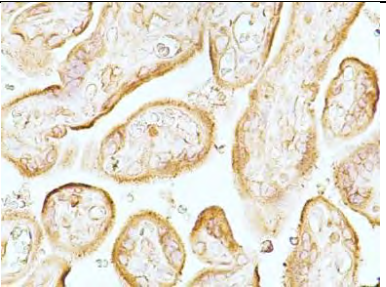
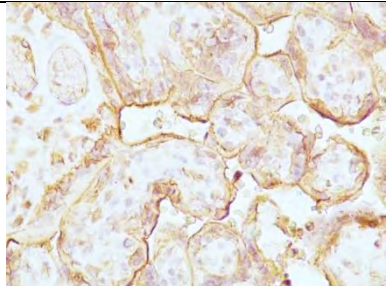
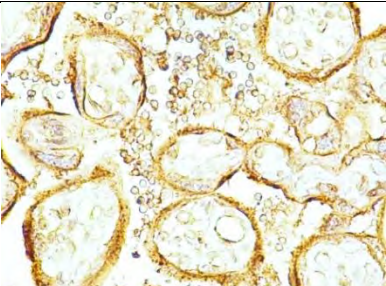
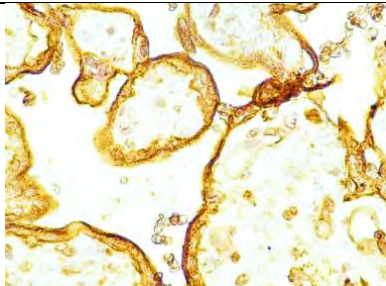
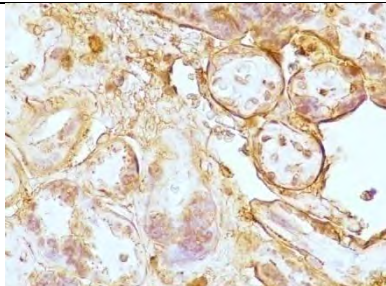
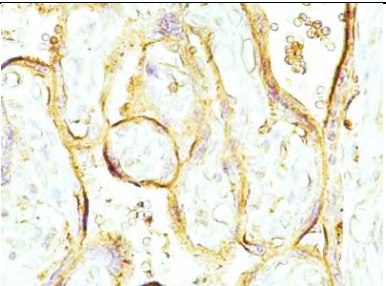
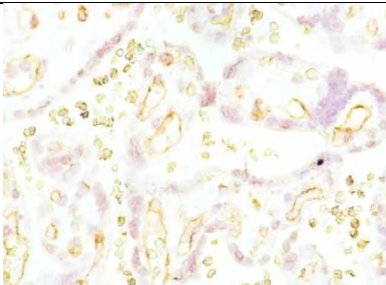
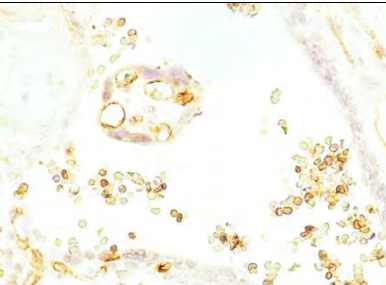
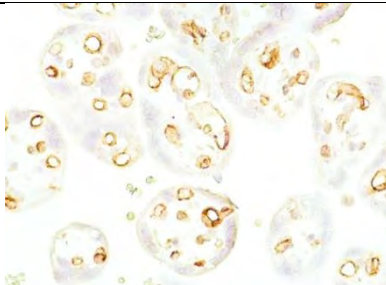
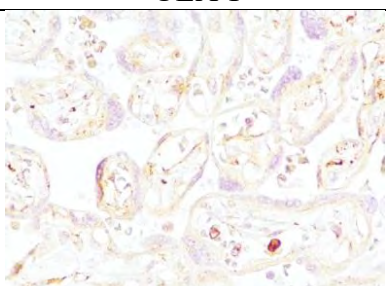
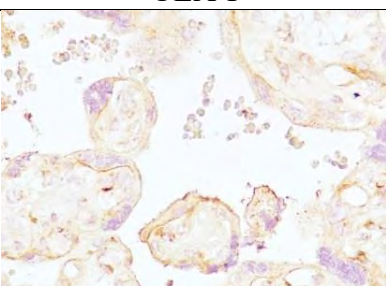
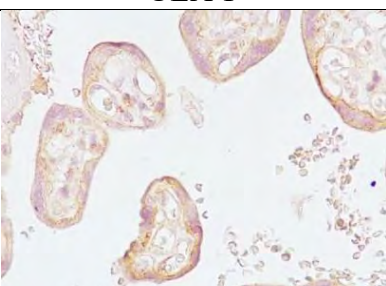
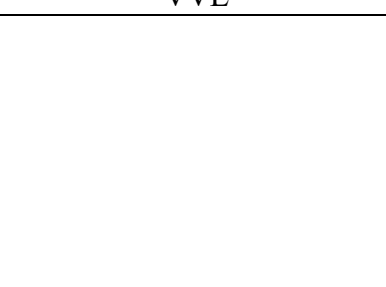
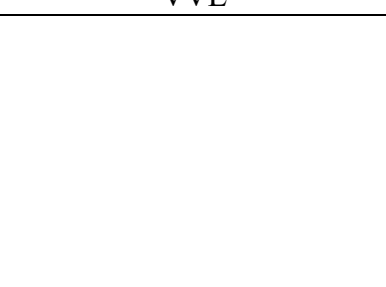
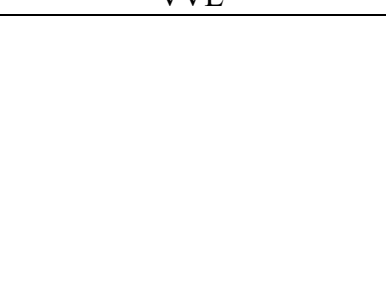
лектин	Физиологическая беременность (n=15)	ранняя ПЭ (n=15)	поздняя ПЭ (n=15)	p ₁ -уровень ФБ/рПЭ	p ₂ -уровень ФБ/ пПЭ	p ₃ -уровень рПЭ/ пПЭ
Concanavalin A (Con A)	0,180 (0,180-0,190)	0,260 (0,230-0,290) †	0,240 (0,222-0,250) †	<0,001	<0,001	0,289
<i>Ulex europaeus</i> agglutinin-I (UEA-I)	0,110 (0,111-0,130)	0,220 (0,200-0,223) †	0,220 (0,190-0,230) †	0<0,001	<0,001	0,953
<i>Maackia amurensis</i> Lectin II (MAL-II)	0,400 (0,390-0,410)	0,290 (0,290-0,300) †	0,300 (0,300-0,30)0 †,‡	<0,001	<0,001	0,045
MAL-II+нейраминидаза	0,310 (0,300-0,320)*	0,250 (0,230-0,250) *,†	0,230 (0,230-0,240) *,†	<0,001	<0,001	0,175
<i>Sambucus nigra</i> agglutinin (SNA)	0,280 (0,260-0,290)	0,330 (0,300-0,340) †	0,340 (0,330-0,360) †	0,0001	<0,001	0,512
SNA+нейраминидаза	0,260 (0,240-0,270)*	0,310 (0,300-0,320) *,†	0,280 (0,260-0,280) *,‡	0,0001	0,131	0,020
<i>Erythrina cristagall</i> Agglutinin (ECA)	0,220 (0,220-0,220)	0,330 (0,320-0,340) †	0,340 (0,330-0,350) †	<0,001	0,001	0,906
ECA+нейраминидаза	0,020 (0,020-0,020)*	0,040 (0,030-0,050) *,†	0,040 (0,030-0,050) *,†	<0,001	<0,001	0,906
<i>Griffonia Simplicifolia</i> Lectin I (GSL-I)	0,120 (0,110-0,130)	0,100 (0,080-0,140)	0,100 (0,090-0,120)	0,429	0,451	0,860
<i>Griffonia Simplicifolia</i> Lectin II (GSL-II)	0,080 (0,070-0,090)	0,080 (0,070- 0,080)	0,070 (0,070-0,080)	0,484	0,090	0,444
Soybean Agglutinin (SBA)	0,110 (0,110-0,120)	0,090 (0,010-0,130)	0,090 (0,090-0,110)	0,307	0,141	0,637
SBA+нейраминидаза	0,100 (0,090-0,100)	0,080 (0,080-0,090) *,†	0,090 (0,090-0,100)	0,047	0,526	0,126
VVL	0,100 (0,080-0,120)	0,130 (0,130-0,140) †	0,100 (0,090-0,110) ‡	0,012	0,874	0,039
<i>Wheat Germ</i> Agglutinin (WGA)	0,070 (0,060-0,080)	0,130 (0,120-0,140) †	0,150 (0,130-0,150) †	<0,001	<0,001	0,402
WGA+нейраминидаза	0,080 (0,070-0,080)	0,090 (0,090-0,100) *,†	0,110 (0,110-0,120) *,†,‡	0,007	<0,001	0,018

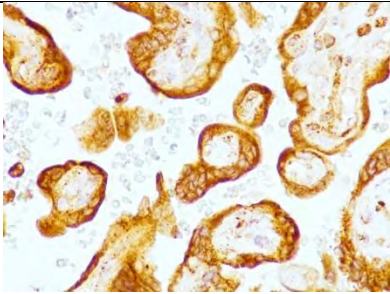
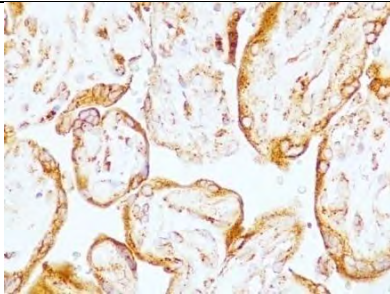
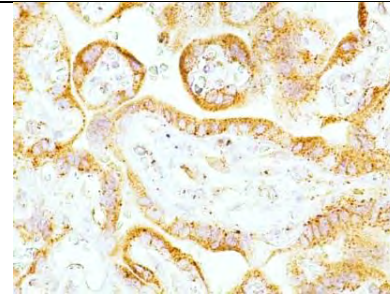
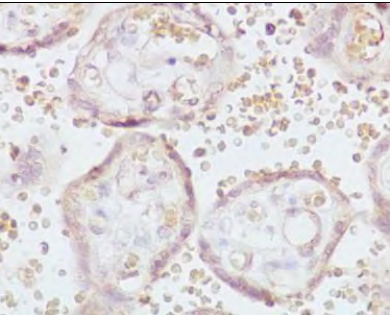
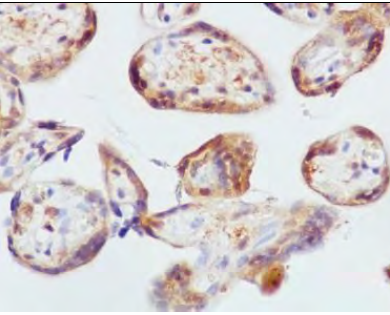
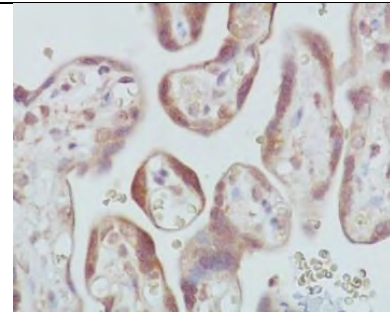
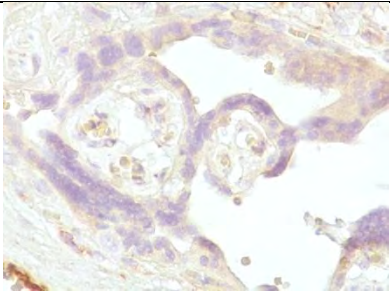
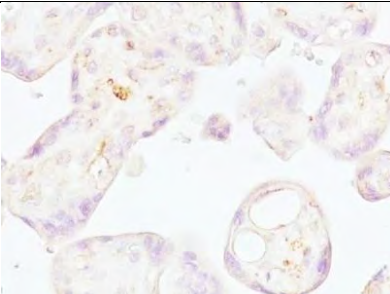
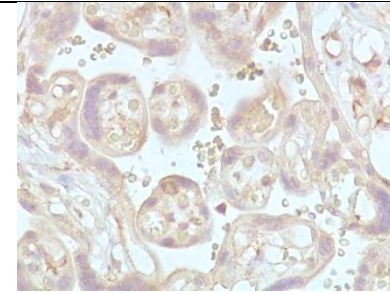
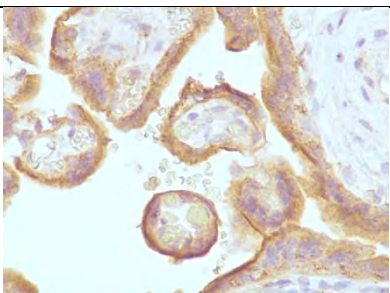
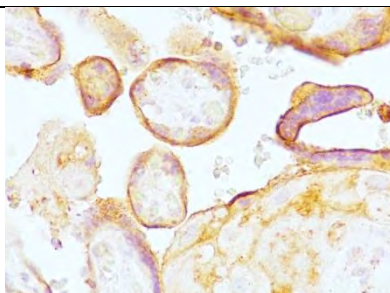
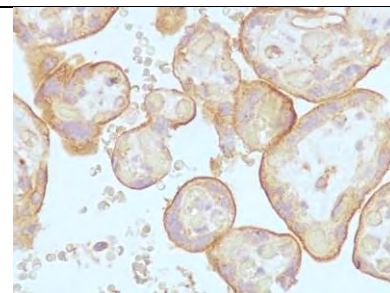
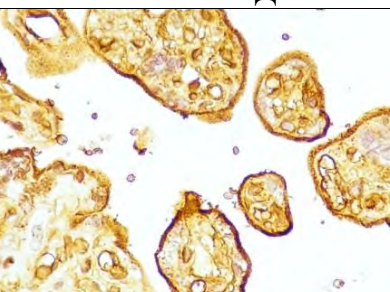
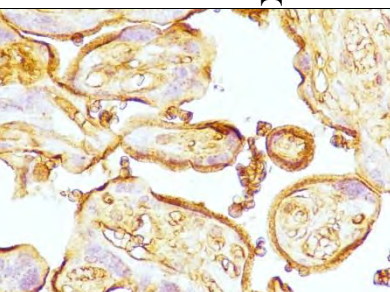
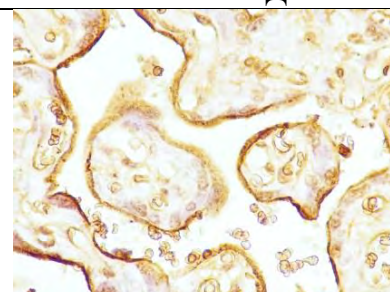
* -сравнение со значением оптической плотности до обработки ткани нейраминидазой; † - сравнение с физиологической беременностью; ‡ -сравнение с ранней ПЭ

Таблица 12. Содержание гликоконъюгатов, окрашиваемых лектинами с известной специфичностью в синцитиотрофобласте терминальных ворсин плаценты при физиологической и осложненной преэклампсией беременностью на ранних и поздних сроках

лектин	Физиологическая беременность (n=15)	ранняя ПЭ (n=15)	поздняя ПЭ (n=15)	p ₁ -уровень ФБ/рПЭ	p ₂ -уровень ФБ/ пПЭ	p ₃ -уровень рПЭ/ пПЭ
Concanavalin A (Con A)	0,130 (0,120-0,153)	0,190 (0,160-0,200) †	0,147 (0,143-0,180) †	0,002	0,006	0,141
<i>Ulex europaeus</i> agglutinin-I (UEA-I)	0,030 (0,030-0,040)	0,040 (0,040-0,044) †	0,040 (0,040-0,050) †	0,037	<0,001	0,356
<i>Maackia amurensis</i> Lectin II (MAL-II)	0,360 (0,350-0,370)	0,320 (0,300-0,320) †	0,310 (0,300-0,320) †	<0,001	<0,001	0,814
MAL-II+нейраминидаза	0,290 (0,280-0,300)*	0,260 (0,260-0,270) *,†	0,270 (0,260-0,280) *,†	<0,001	<0,001	0,175
<i>Sambucus nigra</i> agglutinin (SNA)	0,380 (0,350-0,390)	0,380 (0,350-0,390)	0,370 (0,360-0,380)	0,929	0,731	0,763
SNA+нейраминидаза	0,310 (0,290-0,330)*	0,330 (0,310-0,340)*	0,310 (0,300-0,320)*	0,104	0,679	0,090
<i>Erythrina cristagalli</i> Agglutinin (ECA)	0,020 (0,020-0,023)	0,070 (0,070-0,073) †	0,060 (0,050-0,07) †	<0,001	0,004	0,157
ECA+нейраминидаза	0,200 (0,190-0,200)*	0,330 (0,320-0,340) *,†	0,320 (0,250-0,330) *,†	<0,001	0,011	0,216
<i>Griffonia Simplicifolia</i> Lectin I (GSL-I)	0,190 (0,180-0,220)	0,180 (0,170-0,180)	0,170 (0,140-0,210)	0,235	0,179	0,768
<i>Griffonia Simplicifolia</i> Lectin II (GSL-II)	0,080 (0,070-0,090)	0,120 (0,090-0,120) †	0,100 (0,100-0,110) †	0,003	0,008	0,556
Soybean Agglutinin (SBA)	0,080 (0,070-0,090)	0,080 (0,080-0,090)	0,090 (0,080-0,090)	0,307	0,154	0,724
SBA+нейраминидаза	0,270 (0,260-0,280)*	0,290 (0,250-0,310)*	0,280 (0,260-0,290)*	0,382	0,455	0,860
VVL	0,080 (0,060-0,110)	0,130 (0,120-0,130) †	0,090 (0,080-0,100) ‡	0,004	0,442	0,022
<i>Wheat Germ</i> Agglutinin (WGA)	0,250 (0,250-0,270)	0,370 (0,370-0,390) †	0,390 (0,380-0,400) †	<0,001	<0,001	0,279
WGA+нейраминидаза	0,380 (0,370-0,390)*	0,360 (0,360-0,370) *,†	0,360 (0,350-0,370)*	0,021	0,053	0,951

* -сравнение со значением оптической плотности до обработки ткани нейраминидазой; † - сравнение с физиологической беременностью; ‡ -сравнение с ранней ПЭ

НОРМА	РАННЯЯ ПЭ	ПОЗДНЯЯ ПЭ
		
CON A	CON A	CON A
		
WGA	WGA	WGA
		
WGA+HMD	WGA+HMD	WGA+HMD
		
UEA-I	UEA-I	UEA-I
		
VVL	VVL	VVL
		

НОРМА	РАННЯЯ ПЭ	ПОЗДНЯЯ ПЭ
		
GSL- I	GSL- I	GSL- I
		
GSL- II	GSL- II	GSL- II
		
SBA	SBA	SBA
		
SBA + НМД	SBA + НМД	SBA + НМД
		
MAL II	MAL II	MAL II

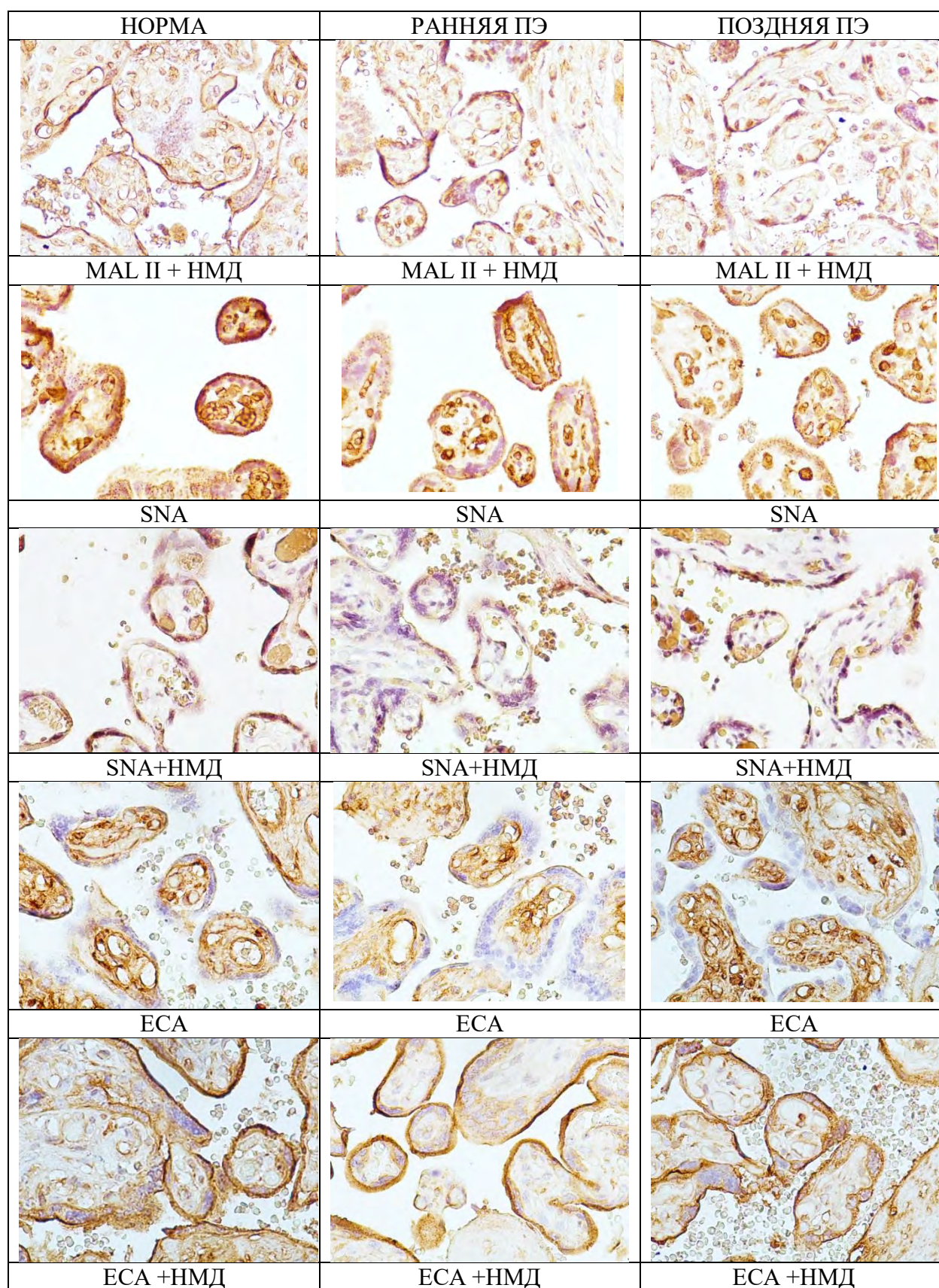
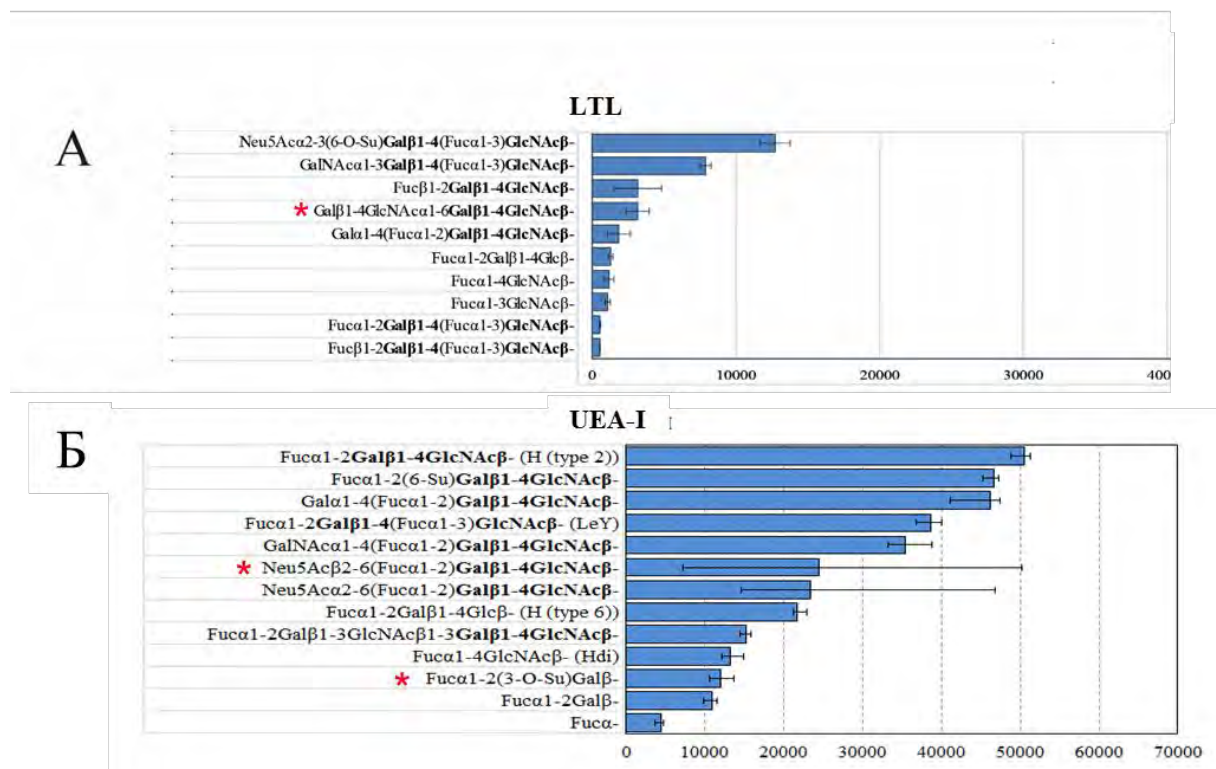


Рисунок 32. Микрофотографии, демонстрирующие окрашивание гликоконъюгатов лектинами в тканях плаценты при нормальной беременности и осложненной развитием ПЭ ранней и поздней манифестации. Для лектинов ECL, SNA, MAL-II, SBA и WGA

представлено окрашивание в двух вариантах: окрашивание нативной ткани и после предбработки ткани нейраминидазой («НМД»). Увеличение x 400

3.2.4. Исследование фукозилированных гликанов при ПЭ

Характеристика углеводной специфичности лектинов, детектирующих фукозилированные гликаны представлена в разделе 3.2. Для более детальной характеристики углеводных структур, детектируемых этими лектинами в плаценте, было проведено детальное изучение их специфичности с помощью гликочипа (Рисунок 33).



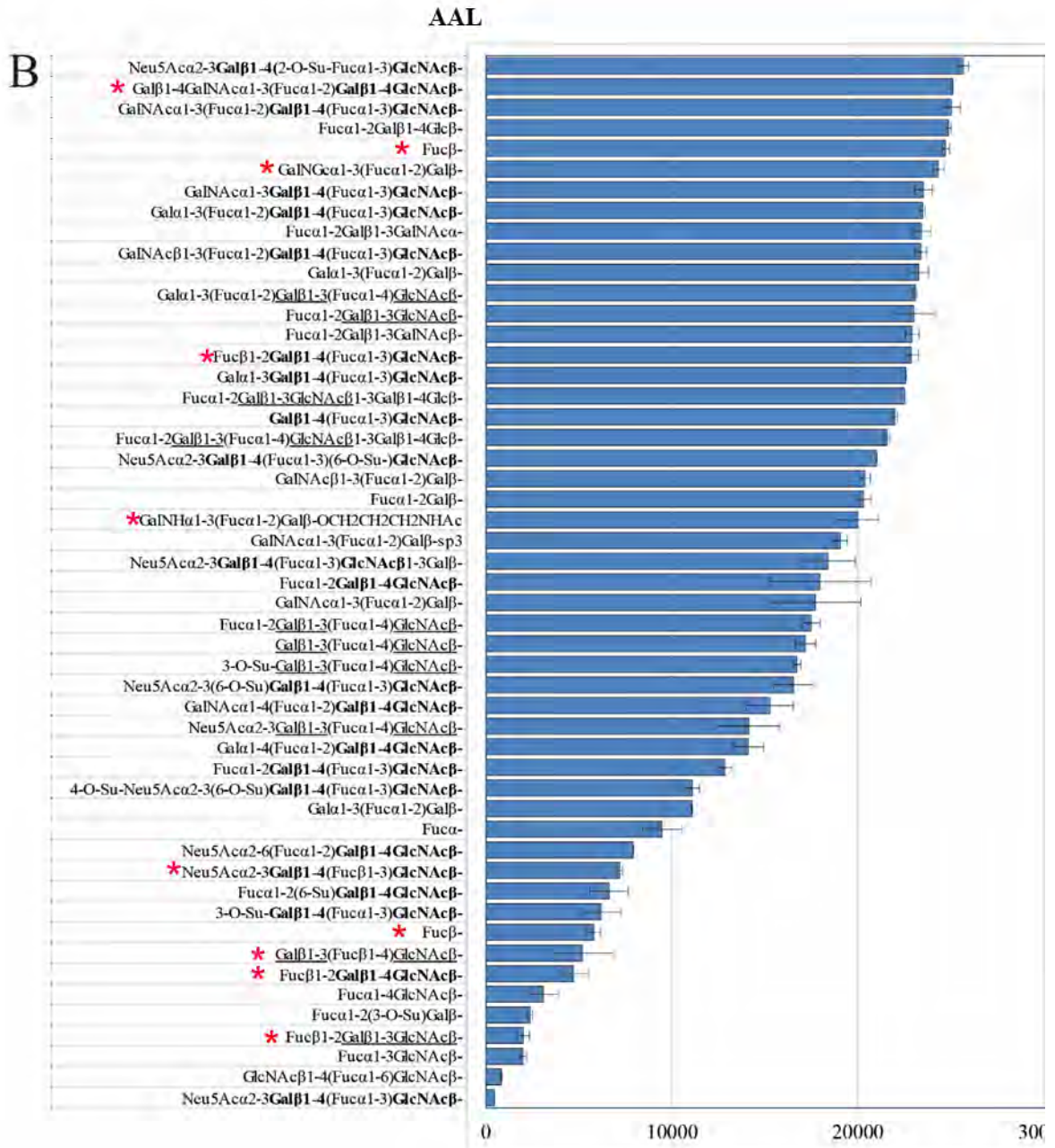


Рисунок 33. Углеводная специфичность растительных лектинов LTL (А), UEA-I (Б) и AAL (В), определенная на гликочипе. Кор типа 1 выделен подчеркиванием, кор типа 2 – жирным шрифтом. * - отмечены гликаны, которые не встречаются в природе (результат химического синтеза, связывание антител с ними будет обсуждено отдельно далее).

Как свидетельствуют данные, представленные на Рисунке 33, лектин LTL взаимодействует с фукозилированными олигосахаридами, имеющими N-ацетиллактозаминовый кор Galβ1-4GlcNAc (углеводные структуры типа 2), в том числе гликаном Le^Y, а также с гликаном Н тип 6 (Рисунок 33 А). Углеводная специфичность лектина UEA-I представлена на Рисунок 33 Б. Лектин AAL взаимодействует с более широким, чем LTL, спектром фукозилированных олигосахаридов: как с N-

ацетиллактозаминовым кором, так и с изолактозаминовым ($\text{Gal}\beta 1\text{-3GlcNAc}$, структуры типа 1), а также с терминальными фрагментами антигенов групп крови H, A и B (Рисунок 33 В).

“В гликокаликсе эндотелия нормальных плацент выявлен специфический паттерн экспрессии, характеризующийся преобладанием фукогликанов, окрашиваемых лектином LTL (Рисунок 34 А и Рисунок 35, фрагменты 1,2,3). В отличие от нормы, при рПЭ (Рисунок 34 Б) и пПЭ (Рисунок 34 В) установлен схожий паттерн экспрессии, который характеризуется значимым превалированием UEA-I-окрашенных фукогликанов, при этом наименее представлены фукогликаны окрашенные лектином AAL, причем их экспрессия значимо не различалась между группами исследования.

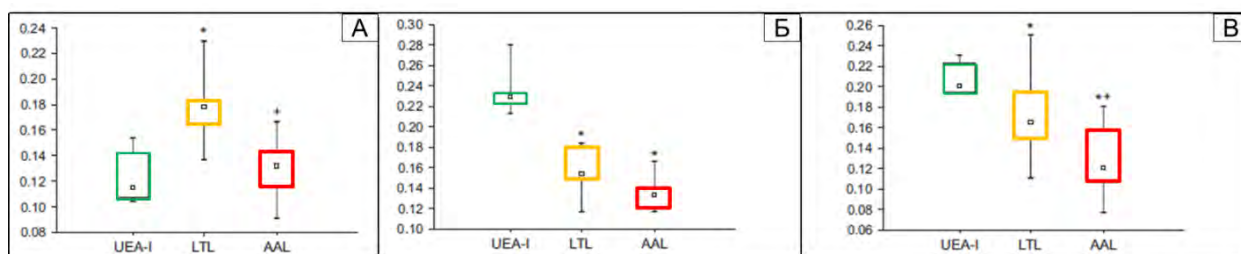


Рисунок 34. Паттерны экспрессии фукозилированных гликанов в эндотелии сосудов терминальных ворсин плаценты в норме (А), рПЭ (Б), пПЭ (В). Данные представлены в виде медианы с межквартильным размахом (20%-75%); на оси ординат - значения оптической плотности, соответствующие содержанию гликоконъюгатов, окрашиваемых соответствующими лектинами. *- значимые ($p < 0,05$) различия между содержанием гликоконъюгатов, окрашиваемых лектином UEA-I и гликоконъюгатами, окрашиваемыми лектином LTL и лектином AAL; †- значимые различия в содержании гликоконъюгатов, окрашиваемых лектином LTL и лектином AAL.

Представленные данные иллюстрируют разные паттерны экспрессии фукогликанов в фетальном эндотелии терминальных ворсин нормальной плаценты и плаценты пациенток с беременностью, осложненной ранней и поздней ПЭ. Анализ гликанов, связывающихся с лектинами на гликочипе свидетельствует, что преобладающими фукогликанами в профилях специфичности лектинов являются производные N-ацетиллактозамина и нефукозилированный неприродный тетрасахарид $\text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\alpha 1\text{-6Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta$ -, который имеет в структуре кор типа 2. Это единственный гликан, который присутствует только в профиле LTL-связывающих гликанов, но лектины UEA-I и AAL демонстрируют отсутствие связывания с ним.

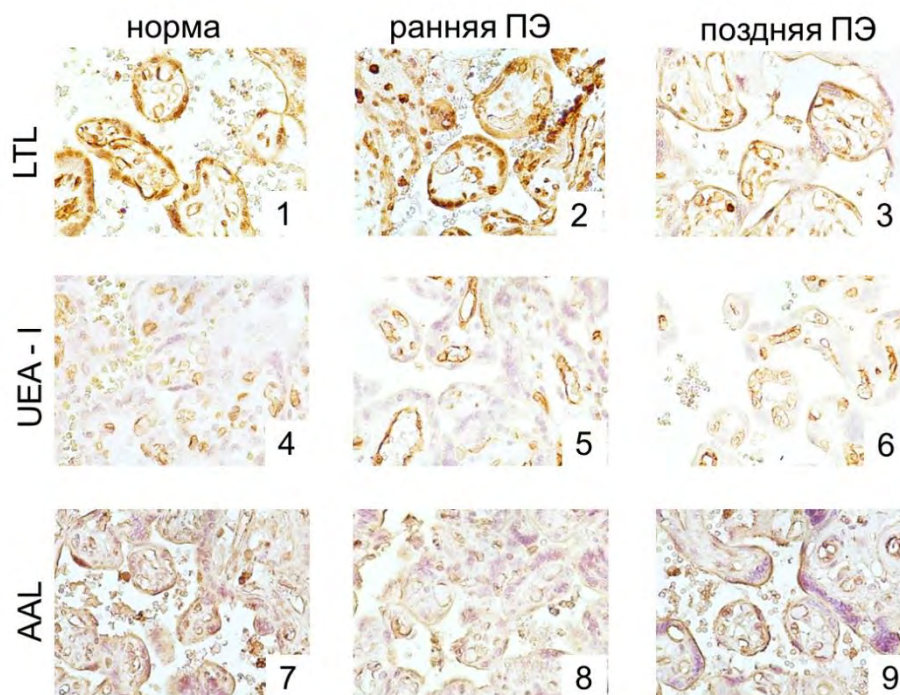


Рисунок 35. Микрофотографии, демонстрирующие окрашивание гликоконъюгатов в ворсинах плаценты лектинами LTL, UEA-I и AAL. Лектиновая гистохимия, контрастное окрашивание гематоксилином, $\times 400$ (Зиганшина М.М. и др., 2022a).

При ПЭ ранней и поздней манифестации в паттерне экспрессии преобладают гликаны, окрашиваемые лектином UEA-I - фукогликаны с кором типа 2, в частности гликан Н тип 2 и его замещенные производные (Рисунок 35, фрагменты 4,5,6). В профиле специфичности этот лектин имеет два “уникальных” (отсутствующий в других профилях) гликана – “сульфатированный фукогликан Н дисахарид $\text{Fuc}\alpha 1-2(3\text{-O-Su})\text{Gal}\beta$ - (также неприродный гликан) и дисахарид $\text{Fuc}\alpha 1-3\text{GlcNAc}\beta$ -. Лектин AAL имеет широкий профиль специфичности и много “уникальных” гликанов, однако интенсивность окрашивания этим лектином гликоконъюгатов самая низкая” (Обухова П.С., 2011), что свидетельствует о низкой представленности “уникальных” гликанов и, по-видимому, наличии окрашивания за счет гликанов, аналогичных присутствующим в профилях UEA-I и LTL (Рисунок 35, фрагменты 7,8,9).

Результаты данного раздела опубликованы в (Зиганшина М.М. и др., 2019; Зиганшина М.М. и др., 2022a; Sukhikh G.T. et al., 2016; Ziganshina M.M. et al., 2021; Ziganshina M.M. et al., 2023).

3.3. Экспрессия мРНК генов иммунорегуляторных белков в ткани плаценты

Для характеристики иммунорегуляторных факторов, участвующих в формировании феномена иммунологической толерантности к аллоантигенам плода на поздних сроках

беременности, было проведено исследование экспрессии генов в тканях нормальной и патологической плацент. Значимые различия в экспрессии в тканях плаценты мРНК исследуемых генов выявляются только для *PIBF* (Таблица 13). Установлено снижение экспрессии мРНК гена *PIBF* в тканях плаценты при беременности осложненной развитием ПЭ и ЗРП на поздних сроках беременности ($p=0,001$).

Несмотря на наличие тенденций к снижению в тканях плаценты экспрессии при патологии беременности гена *IL-10*, и разнонаправленному изменению (по сравнению с нормальной тканью) генов *TGFβ* и *IL-6* (последний является геном ключевого цитокина, регулирующего, как предполагается, синтез протективных антител при беременности), значимых различий в их экспрессии выявлено не было. Также, обращает на себя внимание факт, что при ЗРП в ткани плаценты выявляется тенденция к более высокой экспрессии большинства генов всех исследуемых молекул по сравнению с нормой. Результаты представлены в Таблице 13 и на Рисунке 36.

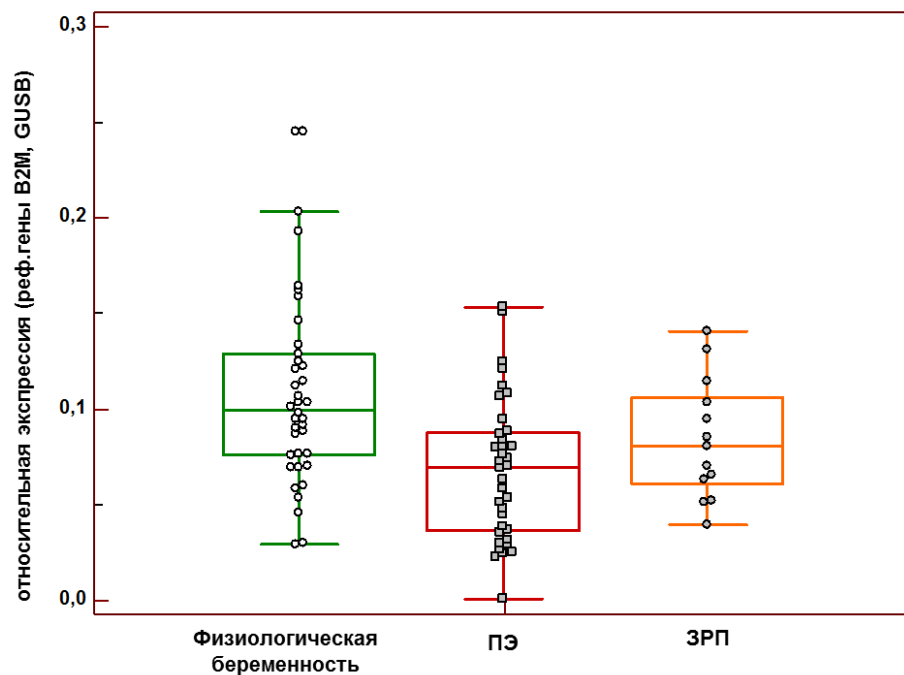


Рисунок 36. Относительная экспрессия мРНК гена *PIBF* в ткани плацент пациенток с физиологической беременностью и беременностью, осложненной ПЭ и ЗРП. Различия между группами значимы (тест Краскала-Уоллеса при; $p=0,025$).

Таблица 13. Уровень экспрессии мРНК генов факторов, регулирующих периферическую толерантность в плаценте у пациенток с нормальной беременностью и осложненной преэклампсией и задержкой роста плода.

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 как медианы с интерквартильным размахом.

p₁ – сравнение ПЭ с физиологической беременностью, тест Манна-Уитни

p₂ – сравнение ЗРП с физиологической беременностью, тест Манна-Уитни

p₃ – тест Краскала- Уоллеса (p=0,025), демонстрирующий различия между группами.

3.4. Выделение плацента-ассоциированных АгАТ

3.4.1. Оптимизация выделения плацента-ассоциированных АгАТ из ткани плаценты

“Поскольку для изучения антител, ассоциированных с тканью плаценты, их необходимо элюировать в максимально нативном виде, был проведен подбор условий выделения плацента-ассоциированных АгАт (плАгАТ) и первичная характеристика их углеводной специфичности.

Плацента и сыворотка крови были получены от условно здоровой пациентки в возрасте 27 лет (группа крови 0, Rh⁺) с доношенной одноплодной беременностью, наступившей в естественном цикле. В течение 1 ч после родов плацента была доставлена в лабораторию, где проводилась отмывка ткани от крови путем перфузии через пупочную вену 300 мл буфера А: (изотонический фосфатный буфер ("Sigma-Aldrich"), 0,01% NaN₃ ("Helicon"), охлажденный до 4°C). Материнскую часть перфузированной плаценты разрезали на одинаковые фрагменты ткани размером 5x5 см массой около 15 г, удаляли кровеносные сосуды и сгустки крови общей массой около 5 г. Каждый фрагмент промывали буфером А (4-х кратная смена по 400 мл) до концентрации белка 0,15 мг/мл при контроле оптической плотности буфера при длине волны 280 нм ("NanoDrop One", "Thermo Fisher Scientific"). Дальнейшую обработку проводили в соответствии с протоколами № 1-4, используя по 10 г фрагментов ткани для каждого протокола. Выделение антител в соответствии с каждым протоколом осуществляли в 3-х повторах. Продолжительность элюции составляла 5 мин на каждой стадии для предотвращения деградации антител.

Протокол № 1: ткань замораживали в жидком азоте, перетирали в порошок в ступке и измельчали на гомогенизаторе "45" ("Virtis"), после чего промывали буфером А (3-кратная смена по 50 мл) до концентрации белка 0,3 мкг/мл. Гомогенат элюировали последовательно 25 мл буфера Б (0,2 М глицин-HCl + 0,01% NaN₃ pH 2,8, охлажденный до 4°C) и затем 25 мл буфера В (0,2 М трис/0,5 М NaCl + 0,1% NaN₃ pH 10,6, охлажденный до 4°C); элюаты объединяли и доводили pH до 7,4.

Протоколы № 2 и № 3: ткань обрабатывали 50 мл буфера Г (4 М роданид калия (KSCN)/изотонический фосфатный буфер+0,01% NaN₃, охлажденный до 4°C) и буфера Д (1 М KSCN/изотонический фосфатный буфер+0,01% NaN₃, охлажденный до 4°C) соответственно; затем проводили диализ с помощью целлюлозной мембраны 12-14 кД ("Sigma-Aldrich") против 900 мл изотонического фосфатного буфера при 4°C с 3-кратной сменой буфера каждые 6 ч.

Протокол № 4: ткань обрабатывали последовательно 25 мл буфера Б и затем 25 мл буфера В; элюаты объединяли и доводили pH до 7,4. Общую концентрацию белка и

концентрацию IgG в элюате определяли турбодиметрически, высчитывали среднее значение при повторях.

Для элюции антител использовали хаотропный агент — роданид калия (протоколы № 2 и № 3), а также изменение величины pH (кислая/щелочная элюция, протоколы № 1 и № 4). Хотя концентрация белка в элюате была выше при элюции 4 М KSCN, наибольшая доля (%) антител (выход антител) в белковой фракции наблюдалась в условиях кислой/щелочной элюции (Таблица 14). Такой способ элюции не требует дополнительного диализа, что снижает потери и общую продолжительность выделения антител. Самое низкое содержание белка и элюированных антител наблюдалось в протоколе № 1 (Таблица 14). Предполагается, что при гомогенизации и разрушении структуры ткани антитела могут образовывать комплексы с внутриклеточными антигенами, что приводит к потерям при выделении.

Таким образом, согласно полученным результатам, лучшим способом элюции антигликановых IgG является применение кислого (0,2 М глицин-HCl+0,01% NaN₃ pH 2,8) и щелочного (0,2 М трис/0,5 М NaCl+0,01% NaN₃ pH 10,6) буфера. Все выделенные антитела относятся к классу G, в то время как IgM не обнаруживаются турбодиметрическим методом.

Таблица 14. Количественное сравнение различных протоколов выделения антител

Протокол	Концентрация белка в элюате, мг/мл	Концентрация IgG в элюате, мг/мл	Доля IgG от общего белка в элюате, %
№ 1	0,7	0,4	57
№ 2	2,6	1,9	73
№ 3	1,6	1,2	75
№ 4	1,8	1,5	83

В соответствии с проведенными выделениями антител по протоколам № 1-4, кроме количественной оценки выхода антител осуществлялась оценка профиля выделенных пЛАгАТ с использованием гликочипов (ООО "Семиотик"), а также проводилось сопоставление профилей специфичности антител из элюатов и сыворотки крови (Таблица 15).

Таблица 15. Сравнение углеводной специфичности плацента-ассоциированных и антител периферической крови

Структура гликана	RFU плацента-ассоциированных IgG	RFU сывороточных IgG
Neu5A α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β	+++	+++
Gal β 1-3GlcNAc α 1-3Gal β 1-3GlcNAc β	+++	+
Gal β 1-3GlcNAc α 1-3GalNAc α	+++	+
GalNAc β 1-4(6-O-Bn)GlcNAc β	+++	++
GalNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β	++	+++
GlcNAc β 1-6(GlcNAc β 1-4)GalNAc α	++	++
GlcNAc β 1-4GalNAc α	++	—
Gal β 1-3GlcNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β	++	+
Gal β 1-3GlcN(Fm) β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β	++	++
Gal β 1-4GlcNAc β	++	++
GlcNAc β 1-4Mur-L-Ala-D-i-Gln-Lys	+	++
GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β	+	+++
6-Bn-Gal β 1-4GlcNAc β	+	++
Gal β 1-4Glc β -Ile	+	++
3-O-SuGal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β	+	++
GalNAc β 1-4GalNAc α	+	—
Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β	+	+++
Gal β 1-3GlcNAc α 1-6Gal β 1-4GlcNAc β	+	+
Fuc α 1-4GlcNAc β	+	—

Примечание. Интервал значений медианы, выражаемой в относительных единицах флюоресценции, соответствует указанной полуколичественной шкале оценки содержания антител в сыворотке крови и элюате плаценты:

—RFU<10 000, +10 000≤RFU<20 000, ++20 000≤RFU<30 000, +++RFU≥30 000. *Была использована полуколичественная шкала, поскольку сравнивалось содержание антител в разных объектах: в крови (биологическая жидкость) и в элюате плаценты (не является биологической жидкостью организма). Величины отсортированы от наиболее представленных в элюатах, до наименее представленных.

Профиль выделенных плаАгАТ оказался неожиданно широким (Таблица 15). При этом профили антител, выделенных с помощью различных методов элюции негомогенизированного материала, практически совпадали, что свидетельствует о

правильности выбора условий элюции. В соответствии с представленными результатами был осуществлен выбор условий элюции пЛАгАТ, описанный в разделе “Материалы и методы” п. 2.3.3. (Выделение плацента-ассоциированных антител из ткани плаценты).

Как свидетельствуют представленные данные (Таблица 15), профиль пЛАгАТ, демонстрирующий максимальное связывание с антигенами гликоципа и антител периферической крови, пересекаются частично. Следовательно, часть элюированных антител является именно плацента-ассоциированными, т.е. имеют преимущественную тропность к ткани плаценты, что предполагает их важную роль в местных иммунных реакциях” (Игнатьева Н.В. и др., 2019).

Т.о., результатом проведенного фрагмента исследований был подбор условий для элюции антител: оценен и выбран способ пробоподготовки ткани на этапе, предшествующем элюции; осуществлен выбор элюирующих буферных растворов (оценено влияние хаотропных агентов, рН, температуры элюирующих растворов на эффективность элюции антител). Оценивался профиль выделенных в разных условиях антител и их относительное количество. Последовательная элюция кислым и щелочным буферными растворами был выбран как основной, и использовался далее для элюции антител с ткани плаценты (в каждом выделении отбиралось 10 г фрагментов ткани из парацентральной зоны) с последующим анализом пЛАгАТ. Все представленные ниже результаты микрочипового анализа были получены при тестировании элюатов плацента-ассоциированных антител, выделенных вышеописанным способом стандартно.

Результаты данного раздела опубликованы в (Игнатьева Н.В. и др., 2019).

3.4.2. Исследование стабильности выделенных плацента-ассоциированных АгАТ при хранении в различных условиях.

Следующим этапом оптимизации метода явилось изучение стабильности антител в течение 5 месяцев хранения в различных условиях. Этап хранения был обусловлен необходимостью формирования коллекции элюатов для пулирования и подготовки к выделению антител определенной специфичности. Поскольку выделение антител осуществляется из ткани, которая содержит множество эндогенных ферментов, в частности протеаз, которые способны нарушить структуру антител в выделяемом образце и привести к получению искаженных результатов по содержанию антител и их специфичности, нами использовался ингибитор протеаз (SIGMAFAST™ Protease Inhibitor Tablets, «Sigma», США), содержащий их смесь. Используемый ингибитор имеет широкую специфичность в отношении ингибирования металлопротеиназ, сериновых протеаз, цистеин- и аспаргат-

протеаз. Ингибитор протеаз добавлялся на этапе первой отмывки ткани от крови, а также на последнем этапе – при закладке выделенных элюатов на хранение при +4°C и при -80°C.

Антитела выделялись из ткани плаценты одной пациентки в трех независимых экспериментах. Вычислялось среднее значение величины связывания антител с лигандом гликоципа по трем экспериментам. Из 400 лигандов гликоципа были выбраны топовые (демонстрировали максимальную интенсивность связывания антител, Таблица 16).

Временные интервалы, в течение которых проводилось тестирование образцов на сохранность антител: а) сразу после выделения антител (исходная точка); б) через 1 месяц после выделения (1 месяц); в) через 3 месяца после выделения (3 месяца); г) через 5 месяцев после выделения антител из ткани плаценты (5 месяцев).

Таблица 16. Лиганды, которые имеют максимальную величину активности связывания с пЛАгАТ, выделенными из плаценты здоровой пациентки.

№ п/п	Номер гликана	Структура гликана
1	19	ManNAc β -sp
2	24	GlcNAc α -sp
3	81	Gal α 1-4GlcNAc β -sp
4	82	Gal α 1-4GlcNAc β -sp
5	101	GalNAc α 1-3GalNAc β -sp
6	102	GalNAc α 1-3Gal β -sp
7	126	6-Bn-Gal α 1-4(6-Bn)GlcNAc β -sp
8	142	GlcNAc α 1-3GalNAc β -sp
9	274	GalNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp
10	277	GalNGc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β -sp
11	278	GalNAc α 1-3GalNAc β 1-3Gal β -sp
12	507	GalNAc α 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β -sp
13	827	Glc β 1-3GalNAc β -sp
14	828	GlcNAc β 1-2Gal β -sp

sp*- спейсер, представляющий собой аминоэтильный, аминопропильный или глициламинный остаток

Результаты, отражающие общую стабильность и стабильность отдельных антител из элюатов, оцененные по динамическому изменению величины активности связывания пЛАгАТ с лигандами, иммобилизованными на чипе, представлены на Рисунке 37.

Представленные результаты свидетельствуют, что добавление ингибитора при выделении пЛАгАТ не влияет на их профиль и активность связывания с лигандами в первой точке исследования (0 дней). Однако, при хранении элюатов, добавление

ингибитора способствует сохранению активности связывания антител в течение 1-3 месяцев (вторая и третья точки исследования, соответственно).

При хранении пЛАгАТ в течение 5 месяцев (четвертая точка исследования) и более, независимо от условий, активность связывания антител драматически снижается. Также, необходимо отметить, что ряд антител сохраняет относительно стабильную активность связывания при хранении в течение 3 месяцев (анти Fs-2 (GalNAc α 1-3GalNAc β -), анти Fs-3 (GalNAc α 1-3GalNAc β 1-3Gal β -), анти- ANa3'LN (GalNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -) и анти- NGcAtri (GalN(Gc) α 1-3(Fuc α 1-2)Gal α -) антитела).

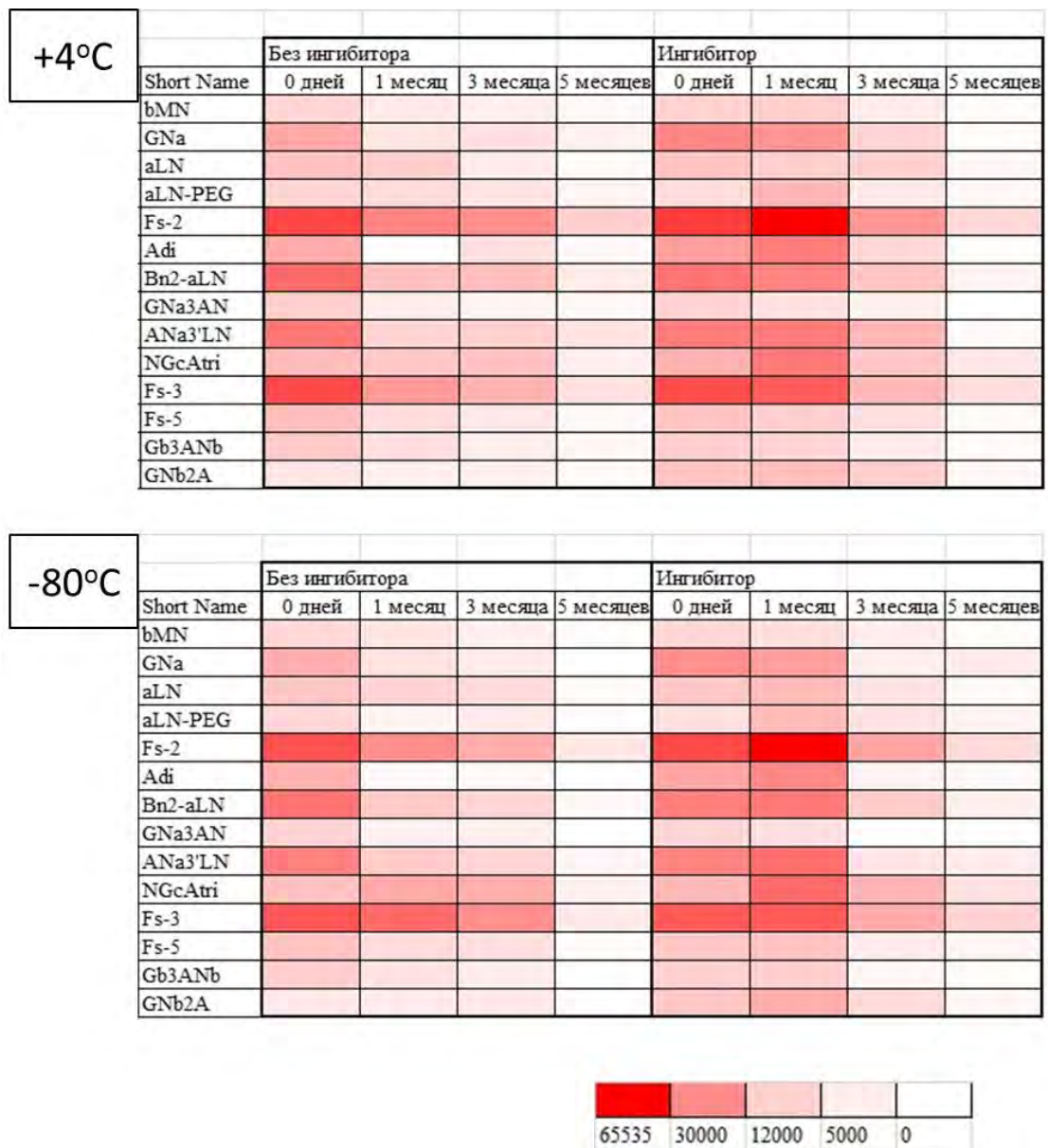


Рисунок 37. Динамика активности связывания пЛАгАТ класса G с гликанами при хранении в условиях без ингибитора и с добавлением ингибитора протеаз при +4°C и -80°C. Измерялось связывание антител с лигандами гликоципа, которое отражает количество антител и их аффинность; выражено в условных единицах флуоресценции (УЕФ).

Установленные методические особенности имеют ключевое значение для последующих этапов работы, поскольку позволяют осуществить бережную элюцию с максимальным выходом антител и планировать последующее тестирование их активности и дальнейшую очистку для изучения биологической активности в оптимальные сроки, без искажения реального профиля специфичности выделенных пЛАгАТ.

3.5. Характеристика плацента-ассоциированных АгАТ

3.5.1. Анализ частоты встречаемости АгАТ некоторых специфичностей в элюатах плаценты и периферической крови матери

У 29 пациенток (15 с физиологической беременностью, 14 - с беременностью, осложненной ПЭ), родоразрешенных операцией кесарево сечение на сроках 36-40 недель проводилось выделение (элюция) антител из ткани плаценты по вышеописанной методике. В соответствии с обоснованным интервалом времени, были проанализированы элюаты на содержание пЛАгАТ с помощью гликанового эррея. Проводилась детекция антител классов М и G; уровень сигнала антител класса М оказался ниже фонового уровня (465 УЕФ), вследствие этого данные по пЛАгАТ(IgM) не анализировались. Ранее, на этапе выбора протокола исследования, отсутствие IgM было подтверждено турбодиметрическим методом, что подтвердило результаты, полученные при анализе данных эррея. Далее все результаты описаны исключительно для пЛАгАТ(IgG).

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 (Таблица 17); б) для наиболее часто встречающихся пЛАгАТ в элюатах определяли их значимость в межгрупповом сравнении - в группах здоровые беременные и беременные с ПЭ (Таблица 18).

Анализ пЛАгАТ на чипе показал, что количество специфичностей антител, детектируемых в крови, значительно выше, чем в элюатах плаценты (Рисунок 38). 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, причем самый узкий был в элюате плаценты при ПЭ (Рисунок 38).

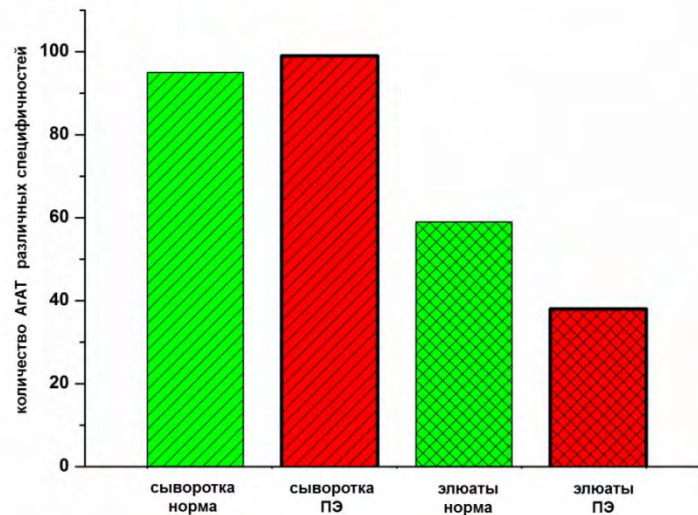


Рисунок 38. Количество специфичностей значимых АгАТ (выше порогового значения, за который принимался сигнал 5 значений фонового связывания – т.е. сигнал от сайта, где отсутствовали гликаны – величина порогового значения составила 465 УЕФ), обнаруженных в сыворотке крови и элюатах плаценты здоровых беременных и беременных с ПЭ.

Часто встречающимися считали антитела, которые имели сигнал выше порогового уровня у 75% индивидуумов в группе.

Уровень пЛАгАТ у здоровых беременных был выше, чем у больных ПЭ (Таблица 18). Однако после проведения U-теста оказалось, что значимыми являются только некоторые из них, что представлено в Таблице 19 и Рисунке 39. “Ими оказались коровый фрагмент О-цепей – антиген Тn; терминальный дисахарид гликолипида Форсмана, являющегося антигеном системы групп крови FS; антиген системы групп крови Lewis - трисахарид Le^A, а также хитопентаоза – структурный компонент полисахарида хитина” (Зиганшина М.М. и др., 2018).

Таблица 17. Частота встречаемости антигликановых IgG в элюатах плаценты и сыворотке крови здоровых беременных и беременных с преэклампсией

			Здоровые	Здоровые	ПЭ	ПЭ
№	Структура гликана	Тривиальное название	Наличие антител в элюатах (n=15)	Наличие антител в периферич. крови (n= 12)	Наличие антител в элюатах (n=14)	Наличие антител в периферич. крови (n= 13)
4	GalNAcα-OSer	Tn	11	1	2	2
19	ManNAc β -sp [†]		11	12	9	12
51	Neu5Acβ-Bn[‡]		15	4	13	2
80	Gal α 1-3GlcNAc β -sp		13	11	9	13
101	GalNAc α 1-3GalNAc β -sp	Fs	11	12	4	12
128	Gal β 1-4Glc β -sp-Trp	Lac	13	11	10	13
142	GlcNAc α 1-3GalNAc β -sp		15	12	13	13
168	GlcNAc β 1-4(3-O-CH(CH ₃)CO-L-Ala-D-i-Gln-Lys)GlcNAcOH	GMDP	15	12	9	12
233	Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAcβ-sp	Le^A	14	0	10	3
246	GlcNAc β 1-2Gal β 1-3GalNAc α -sp		12	12	12	13
256	GlcNAc β 1-4(GlcNAc β 1-6)GalNAc α -sp		12	12	11	12
268	GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-6)GlcNAc β -sp		12	5	11	9
276	GlcNAc β 1-4Gal β 1-4GlcNAc β -sp		12	11	10	13
279	Gal β 1-3GlcNAc α 1-3GalNAc α -sp		12	12	12	13

329	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β -sp-Trp	3'SL	11	8	9	8
374	Galα1-3(Galα1-4)Galβ1-4GlcNAcβ-sp		14	4	12	6
378	Gal β 1-3GlcNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp		12	12	12	13
383	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β -sp	LNnT	11	11	6	9
396	(GlcNAc β 1)3-3,4,6GalNAc α -sp		12	9	8	8
410	Gal β 1-3GlcNAc α 1-3Gal β 1-3GlcNAc β -sp		13	12	11	13
481	Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β -sp	Galili (penta)	13	11	9	12
493	GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-sp	chitopentaose	12	4	4	7
806	Gal α 1-6Glc α -sp		11	12	7	13
808	Gal α 1-6Glc β -sp	melibiose	14	12	12	13
813	Galβ1-3GalNGcα-sp	TF(Gc)	11	0	8	3
815	Gal α 1-4GalNAc α -sp		12	12	9	13
817	GalNAc β 1-4GalNAc α -sp		12	11	10	13
820	GlcNAc β 1-4GalNAc α -sp		14	12	11	12
827	Glc β 1-3GalNAc β -sp		14	12	12	12
828	GlcNAc β 1-2Gal β -sp		11	12	10	11

† sp – аминопропиловый, аминоэтиловый или глициновый спейсер; ‡ Bn – бензил. Наличие антител в сыворотке периферической крови определено как количество лиц, у которых интенсивность сигнала выше порогового уровня. Жирным шрифтом выделены АГАТ(IgG), присутствующие в элюате и практически отсутствующие в крови (менее 1/3 случаев).

Таблица 18. Активность связывания (в виде значений УЕФ) антигликановых плацента-ассоциированных и сывороточных IgG с лигандами гликоципа у здоровых беременных и беременных с преэклампсией.

Структура гликана	Тривиальное название	Элюаты плаценты здоровых беременных (Макс. значение медианы RFU 7739)		Сыворотка крови здоровых беременных (Макс. значение медианы RFU 48803)		Элюаты плаценты беременных с ПЭ (Макс. значение медианы RFU 5487)		Сыворотка крови беременных с ПЭ (Макс. значение медианы RFU 21473)		p (Манн-Уитни), Межгрупповые сравнения антител в элюатах
		Median	MAD	Median	MAD	Median	MAD	Median	MAD	
GalNAc α -OSer	Tn	760	295	127	36	158	78	172	107	0,006
ManNAc β -sp*		2169	1818	5601	4232	1568	1480	7073	6437	0,158
Neu5Ac β -Bn**		4419	2762	139	71	5152	33845	223	148	0,983
Gal α 1-3GlcNAc β -sp		4987	4415	17716	14181	814	691	6169	3543	0,057
GalNAc α 1-3GalNAc β -sp	Fs	961	868	6610	5906	182	142	4263	2237	0,004
Gal β 1-4Glc β -sp-Trp	Lac	940	403	10370	6733	1314	1217	7241	4356	0,983
GlcNAc α 1-3GalNAc β -sp		4222	1772	9555	6122	2221	850	6057	4702	0,046
GlcNAc β 1-4(3-O-CH(CH ₃)CO-L-Ala-D-i-Gln-Lys)GlcNAcOH	GMDP	4666	3301	23082	14423	2431	2212	19861	11658	0,217

Структура гликана	Тривиальное название	Элюаты плаценты здоровых беременных (Макс. значение медианы RFU 7739)		Сыворотка крови здоровых беременных (Макс. значение медианы RFU 48803)		Элюаты плаценты беременных с ПЭ (Макс. значение медианы RFU 5487)		Сыворотка крови беременных с ПЭ (Макс. значение медианы RFU 21473)		р (Манн-Уитни), Межгрупповые сравнения антител в элюатах
Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β -sp	Le ^A	2643	1685	71	17	899	448	88	51	0,004
GlcNAc β 1-2Gal β 1-3GalNAc α -sp		6509	6220	27186	24274	5487	5052	35537	21473	0,949
GlcNAc β 1-4(GlcNAc β 1-6)GalNAc α -sp		2345	2163	13221	7577	1428	835	8229	3446	0,331
GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-6)GlcNAc β -sp		2430	1755	110	36	855	342	1260	918	0,123
GlcNAc β 1-4Gal β 1-4GlcNAc β -sp		1426	894	5654	4514	946	762	9091	6327	0,621
Gal β 1-3GlcNAc α 1-3GalNAc α -sp		5220	4649	24920	15323	2527	2032	24753	16139	0,780

Структура гликана	Тривиальное название	Элюаты плаценты здоровых беременных (Макс. значение медианы RFU 7739)		Сыворотка крови здоровых беременных (Макс. значение медианы RFU 48803)		Элюаты плаценты беременных с ПЭ (Макс. значение медианы RFU 5487)		Сыворотка крови беременных с ПЭ (Макс. значение медианы RFU 21473)		р (Манн-Уитни), Межгрупповые сравнения антител в элюатах
Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β -sp-Trp		1286	1059	3186	2971	883	845	700	622	0,533
Gal α 1-3(Gal α 1-4)Gal β 1-4GlcNAc β -sp		787	177	192	106	773	212	450	346	0,401
Gal β 1-3GlcNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp		7739	5589	26357	19349	3169	2072	22422	14559	0,533
Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β -sp	LNnT	1268	960	6372	4829	338	315	5166	4988	0,401
(GlcNAc β 1)3-3,4,6GalNAc α -sp		1191	1004	2211	1872	610	48	1392	1223	0,172
Gal β 1-3GlcNAc α 1-3Gal β 1-3GlcNAc β -sp		4469	3707	11283	7250	3601	3117	20927	12562	0,652
Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β -sp	Galili (penta)	2253	1230	8755	4935	1975	1602	5171	4075	0,505
GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β -sp	chitopentaose	743	474	233	125	342	165,5	496	432	0,005

Структура гликана	Тривиальное название	Элюаты плаценты здоровых беременных (Макс. значение медианы RFU 7739)		Сыворотка крови здоровых беременных (Макс. значение медианы RFU 48803)		Элюаты плаценты беременных с ПЭ (Макс. значение медианы RFU 5487)		Сыворотка крови беременных с ПЭ (Макс. значение медианы RFU 21473)		р (Манн-Уитни), Межгрупповые сравнения антител в элюатах
Gal α 1-6Glc α -sp		2301	2140	11117	8725	907	863	14241	12572	0,477
Gal α 1-6Glc β -sp	melibiose	6790	5393	16668	7440	3319	31645	12074	6357	0,621
Gal β 1-3GalNGc α -sp		625	308	90	23	727	570,5	101	67	0,847
Gal α 1-4GalNAc α -sp		3230	3141	14682	11551	744	580,5	8152	5382	0,046
GalNAc β 1-4GalNAc α -sp		2349	1842	15248	10704	1177	950	8086	3269	0,505
GlcNAc β 1-4GalNAc α -sp		2711	2244	16266	8565	1947	1859	11968	5356	0,252
Glc β 1-3GalNAc β -sp		1882	799	4225	2792	2000	1649	10103	4025	0,813
GlcNAc β 1-2Gal β -sp		1290	1211	9810	8527	1321	1197,5	7519	7230	0,881

Значение p менее 0,01 считалось значимым. Данные представлены в виде медианного значения и MAD; MAD – среднее абсолютное отклонение

* - sp – аминопропиловый, аминоэтиловый или глициновый спейсер

** - Bn - бензил

Таблица 19. Сравнение содержания плацента-ассоциированных антигликановых антител у пациенток с физиологической беременностью и ПЭ

Структура гликана	Тривиальное название	Норма	ПЭ	p
GalNAc α -OSer	Tn	760 (295)	158 (81)	0,006
GalNAc α 1-3GalNAc β -	Fs	961 (868)	182 (159)	0,004
Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β -	Le ^A	2643 (1685)	899 (485)	0,004
GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β -	хитопентоза	743 (474)	342 (159)	0,005

Данные представлены в виде значения медианы RFU (MAD); MAD, абсолютное отклонение медианы.

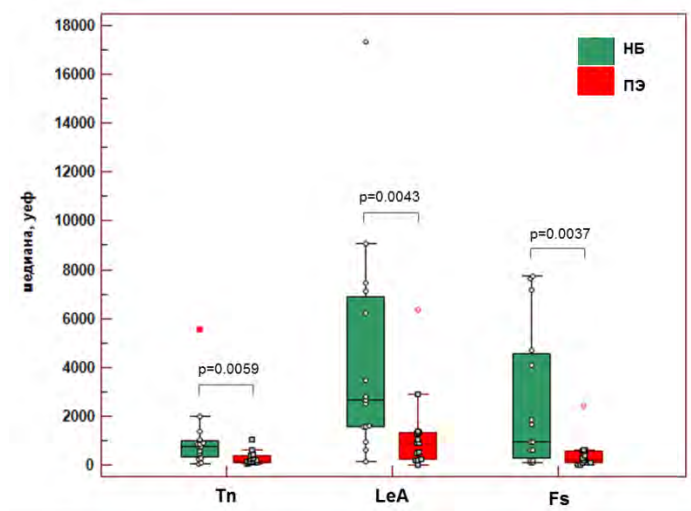


Рисунок 39. Содержание плацента-ассоциированных АГАТ(IgG), элюированных из ткани пациенток с нормальной беременностью и ПЭ.

Результаты данного раздела опубликованы в (Ziganshina M.M. et al., 2022a).

3.5.2. Аффинное выделение из иммуноглобулинового препарата антител против антигенов Галили, Tn, Neu5Ac β -Bn

На основании анализа профиля специфичности пЛАГАТ(IgG) (Таблица 17) и их относительного количественного содержания (Таблица 18) была оценена возможность выделения антител (анти-Галили (трисахарид Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -), анти-Tn (GalNAc α), анти-Neu5Ac β -Bn, анти- Δ GlcA β 1-3Gal, анти-GlcNAc β 1-4-(HOOC(CH₃)CH)-3-O-GlcNAc α - и анти-Fuc α 1-2Gal β 1-4Glc β - антител) из иммуноглобулинового препарата IgG в количествах, необходимых для проведения функциональных тестов и окрашивания ткани плаценты.

С помощью ИФА были оценены титры антител исследуемых специфичностей в исходном IgG-препарате, который был использован для аффинного выделения антител (аптечный препарат “Иммуноглобулин человека нормальный” производства фирмы АО “НПО Микроген”, Россия, содержащий в качестве действующего вещества белки плазмы человека, из которых иммуноглобулин G составляет не менее 97% - 100 мг в одной дозе). Препарат представляет собой концентрированный раствор очищенной фракции иммуноглобулинов, выделенной методом фракционирования этиловым спиртом из пула плазмы крови не менее чем 1000 здоровых доноров. Самый высокий титр выявлен для анти-Галили антител. Предварительная оценка: содержание анти-Галили антител в препарате составило 0,05-0,08% от всех IgG. Титр анти-Neu5Ac β -Bn антител в препарате IgG был в 4-5 раз меньше титра анти-Галили антител. Анти-Tn антитела IgG класса выявлялись в препарате также в очень низком титре (в среднем, в сыворотке крови содержится 0,001 – 0,002% анти-Tn IgG от всех IgG, содержащихся в сыворотке крови). Содержание остальных антител, обозначенных для аффинного выделения, в иммуноглобулиновом препарате IgG, согласно предварительным оценкам, был ещё меньше. Поэтому ожидалось, что самый большой выход в результате аффинной хроматографии IgG-препарата будет для анти-Галили антител. В достаточных количествах для окраски ткани плаценты и проведения функциональных тестов на клетках, были получены анти-Галили антитела, анти-Tn (GalNAc α) антитела и анти-Neu5Ac β - антитела. Для каждого из них проведено изотипирование, окраска ткани плаценты и проведение функциональных тестов на клетках линии EA hy926. Окраска ткани плаценты и функциональные тесты на клетках проведены с использованием аффинно выделенных антител из иммуноглобулинового препарата в связи с невозможностью выделить из ткани плаценты антител соответствующей специфичности в необходимых количествах. Поскольку только анти-Галили(IgG) содержались в плацентарных элюатах в достаточных количествах для аффинного выделения, то изотипирование IgG было проведено только для этих антител.

3.5.3. Содержание и соотношение изотипов IgG в образцах аффинно выделенных A α AT

Определение изотипов IgG проводилось двумя способами:

1) методом сравнения содержания каждого изотипа с общим содержанием IgG в образцах выделенных антител с использованием вторичных моноклональных мышиных антител, меченых биотином, узнающих человеческие IgG₁, IgG₂, IgG₃ или IgG₄ (Sigma-Aldrich, США);

2) с помощью коммерческих изотипических китов, позволяющих количественно определить содержание каждого изотипа в тестируемом образце, содержащем антитела.

1 Способ: Соотношения изотипов IgG выражали в %, принимая общее содержание всех изотипов IgG в образцах антител за 100%. “В качестве контрольного образца №1 с известным содержанием изотипов IgG был использован препарат нормального IgG человека (“Иммуноглобулин человека нормальный”, производство АО “НПО “Микроген”, Россия), с нормальным распределением изотипов IgG: 66% IgG₁, 23% IgG₂, 7% IgG₃ и 4% IgG₄” (Обухова, 2011) (Таблица 20, Рисунок 40, зелёные столбцы). В исследуемых образцах анти-Галили, анти-Tn и анти-Neu5Ac β -Bn антител, аффинно-очищенных из препарата нормального IgG человека (контрольного образца №1), изотип IgG₂ преобладал над IgG₁, IgG₃ и IgG₄ (см. Таблица 20, Рисунок 40, голубые, оранжевые и серые столбцы соответствуют трём типам аффинно-очищенных антител). Относительные соотношения изотипов IgG в контрольном образце №1 отличались от определенных в дополнительном контрольном образце №2 анти-Btri антител, хорошо изученных и широко распространённых группоспецифических антител системы АВ0, аффинно-очищенных из другого иммуноглобулинового препарата, (аптечного “Иммуноглобулинового комплексного препарата для энтерального применения”, сокращённо КИП, (АО “НПО “Микроген”, Россия), который представляет собой лиофилизированный комплекс иммуноглобулинов человека классов IgG, IgM и IgA, выделенных из пула плазмы крови не менее чем от 1000 здоровых доноров. В контрольном образце №2 изотипы IgG₄ и IgG₂ преобладали над остальными изотипами IgG (см. Таблица 20, Рисунок 40, желтые столбцы), в отличие от анти-Галили, анти-Tn и анти-Neu5Ac β -Bn антител.

Таблица 20. Содержание изотипов IgG в аффинно выделенных АгАТ из препарата IgG человека.

Образец, содержащий антитела	Содержание изотипов IgG, %			
	IgG ₁	IgG ₂	IgG ₃	IgG ₄
IgG-препарат (контрольный образец №1)	66	23	7	4
анти-Галили антитела, выделенные из IgG-препарата	10,5	84,0	4,3	1,2
анти-Tn антитела, выделенные из IgG-препарата	30,0	63,0	4,0	2,5
анти-Neu5Ac β -Bn антитела, выделенные из IgG-препарата	33,0	44,0	15,0	7,0
анти-Btri антитела (контрольный образец №2), выделенные из КИП	17,0	31,0	12,0	40,0

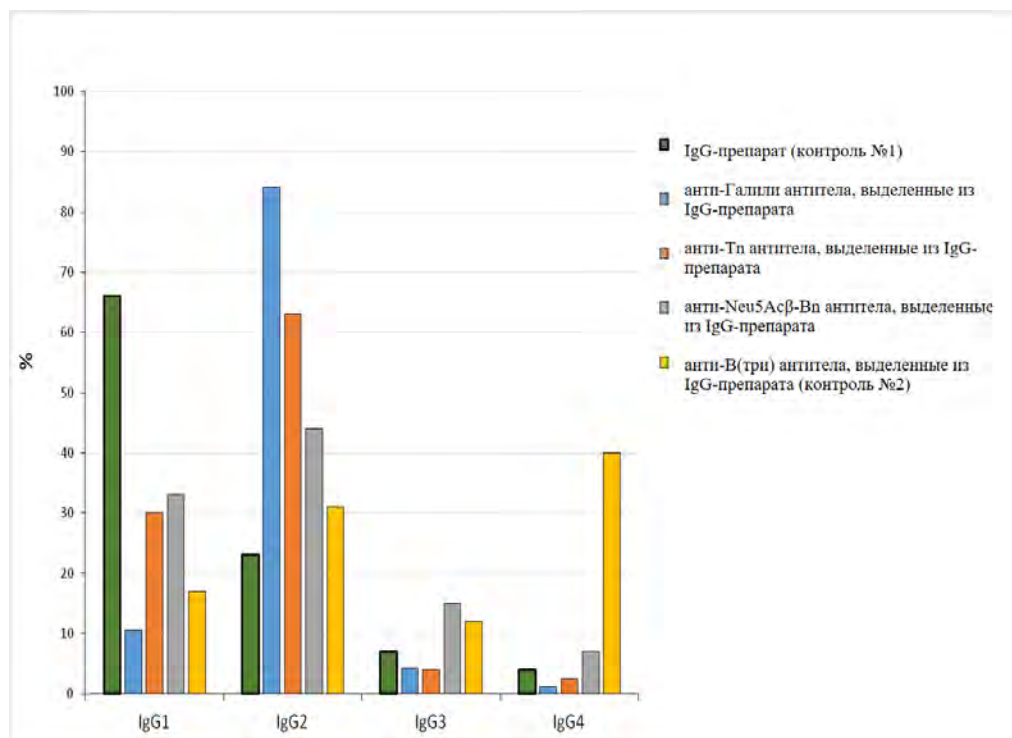


Рисунок 40. Содержание (выраженное в %) изоформ IgG₁/G₂/G₃/G₄ в исследуемых АгАТ, аффинно-выделенных из препарата IgG человека. В качестве контрольных образцов использованы IgG-препарат (“Иммуноглобулин человека нормальный”, производство АО “НПО “Микроген”, Россия) и аффинно-очищенные анти-Btri антитела с известным соотношением изоформ IgG.

Во фракциях антител, выделенных из элюатов с плаценты, было выявлено соотношение изоформ IgG (см. Таблица 21, Рисунок 41, оранжевые и серые столбцы) близкое к установленным в контрольном образце (см. Таблица 21, Рисунок 41, зелёные столбцы).

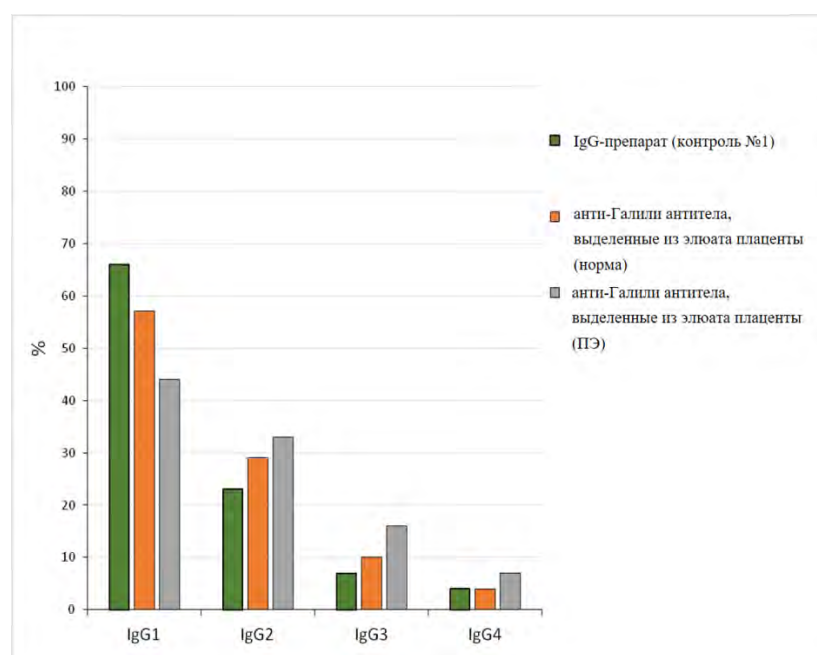


Рисунок 41. Содержание (выраженное в %) изоформ $IgG_1/G_2/G_3/G_4$ в исследуемых анти-гликановых антителах, выделенных из плацентарных элюатов. В качестве контрольного образца использован IgG-препарат (“Иммуноглобулин человека нормальный”, производство АО “НПО “Микроген”, Россия).

Таблица 21. Содержание изоформ IgG в аффинно очищенных АГАТ из элюата плаценты пациенток с физиологической и осложненной ПЭ беременностью.

Образец, содержащий антитела	Содержание подклассов IgG, %			
	IgG ₁	IgG ₂	IgG ₃	IgG ₄
IgG-препарат (контрольный образец №1)	66	23	7	4
анти-Галили антитела, выделенные из элюата с плаценты (норма)	57	29	10	4
анти-Галили антитела, выделенные из элюата с плаценты (патология, преэклампсия)	44	33	16	7

Обращает на себя внимание факт, что при беременности в ткани плаценты содержится меньше анти-Галили антител изоформы IgG_1 и, напротив, больше изоформ IgG_2 , IgG_3 и IgG_4 (только при ПЭ), чем в иммуноглобулиновом препарате, который демонстрирует усредненные значения содержания изоформ IgG анти-Галили антител в популяции.

2 Способ. Количественное определение четырех изоформ IgG также было выполнено с помощью тест-наборов для ИФА (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific,

Австрия). В наборах присутствовали стандарты IgG₁, IgG₂, IgG₃ или IgG₄ с известными исходными концентрациями растворов и диапазонами рабочих разведений. С помощью этих стандартов были построены калибровочные кривые (Рисунок 42).

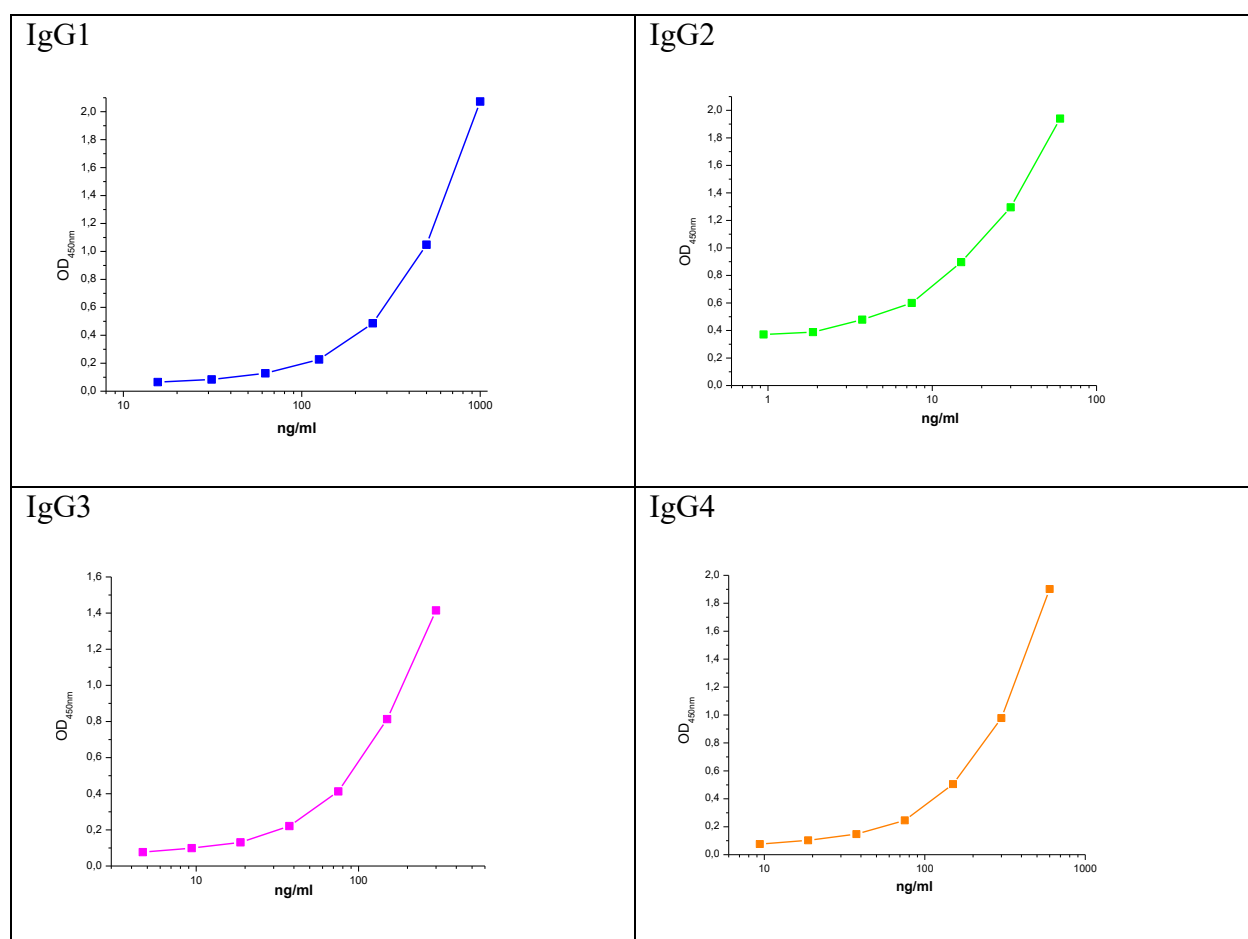


Рисунок 42. Калибровочные кривые, отражающие соответствие оптической плотности продукта реакции количественному содержанию иммуноглобулина в пробе.

Исследуемые образцы аффинно-очищенных антител добавляли в лунки планшетов в двукратных разведениях параллельно со стандартами. “С помощью калибровочных кривых были определены концентрации каждого изотипа IgG во всех четырёх образцах аффинно-очищенных антител (Таблица 22). В столбце для IgG₄ для трех образцов антител указаны значения, меньше 1 и 0,5 мкг/мл” (Обухова П.С., 2011), т.к. в этих случаях антитела были разведены в 20-30 раз, но сигналы в соответствующих лунках были на грани чувствительности метода. При определении IgG₂ образцы антител были разведены до 96000 раз, и даже при таком разведении можно было определить концентрацию иммуноглобулина в средней части калибровочной кривой.

Если за 100% принять содержание всех IgG в каждом образце антител, то можно наглядно увидеть весовое соотношение изотипов IgG₁, IgG₂, IgG₃ и IgG₄, которое

представлено на Рисунке 42. Как демонстрирует рисунок, в образцах аффинно выделенных АгАТ, преобладает изотип IgG₂, в то время как IgG₁ меньше в 6-10 раз, IgG₃ меньше в 20-50 раз, а IgG₄ меньше всего.

Таблица 22. Концентрации изотипов IgG в образцах аффинно выделенных антител, определенные с помощью тест-наборов для ИФА (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Австрия).

Антитела	Изотипы Igs, содержащиеся в образце	Концентрация IgG ₁ , мкг/мл	Концентрация IgG ₂ , мкг/мл	Концентрация IgG ₃ , мкг/мл	Концентрация IgG ₄ , мкг/мл	Суммарная концентрация IgG в образце, мкг/мл	Концентрация всех Igs, определенная ранее методом поглощения при $\lambda = 280 \text{ nm}$, мкг/мл
Анти-Галили	IgG	95	1120	22	1,4	1238	1236
Анти-Tn	IgG	131	1360	44	< 1	1535	1536
Анти-Neu5Ac β -Bn	IgG	63	397	20	< 1	480	924

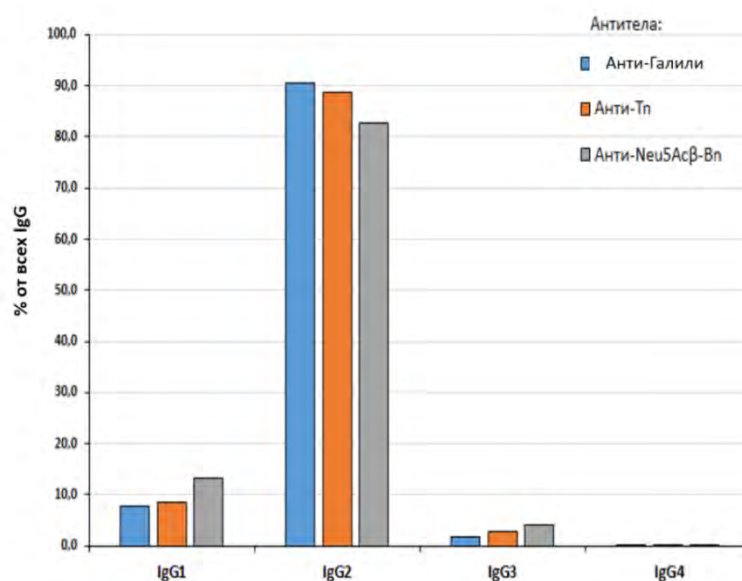


Рисунок 42. Соотношение изотипов IgG в образцах аффинно выделенных антител.

Полученные результаты по определению изотипов IgG в образцах аффинно выделенных АгАТ с помощью двух подходов не противоречат друг другу.

3.5.4. Углеводная специфичность аффинно выделенных АгАТ

Было проведено определение углеводной специфичности выделенных антител микрочиповым анализом.

Была исследована специфичность следующих образцов:

I. аптечного препарата “Иммуноглобулин человека нормальный” производства фирмы “Микроген НПО”, Россия;

II. аффинно выделенных анти-Галили антител из аптечного препарата “Иммуноглобулин человека нормальный” производства фирмы “Микроген НПО”, Россия;

III. аффинно выделенных анти-Tn антител из аптечного препарата “Иммуноглобулин человека нормальный” производства фирмы “Микроген НПО”, Россия;

IV. аффинно выделенных анти-Neu5Ac β -Vn антител из аптечного препарата “Иммуноглобулин человека нормальный” производства фирмы “Микроген НПО”, Россия;

V. аффинно выделенных анти-Галили антител из элюата плаценты пациентки с нормальной беременностью группы крови 0(I)+;

VI. аффинно выделенных анти-Галили антител из элюата плаценты пациентки с нормальной беременностью группы крови A(II)+;

VII. аффинно выделенных анти-Галили антител из элюата плаценты пациентки с беременностью, осложненной преэклампсией группы крови 0(I)+;

VIII. аффинно выделенных анти-Галили антител из элюата плаценты пациентки с беременностью, осложненной преэклампсией группы крови A(II)+;

IX. аффинно выделенных анти-Tn антител из элюата плаценты пациентки с нормальной беременностью и группой крови A(II)+

I. Профиль специфичности аптечного препарата “Иммуноглобулин человека нормальный” производства фирмы “Микроген НПО”, Россия

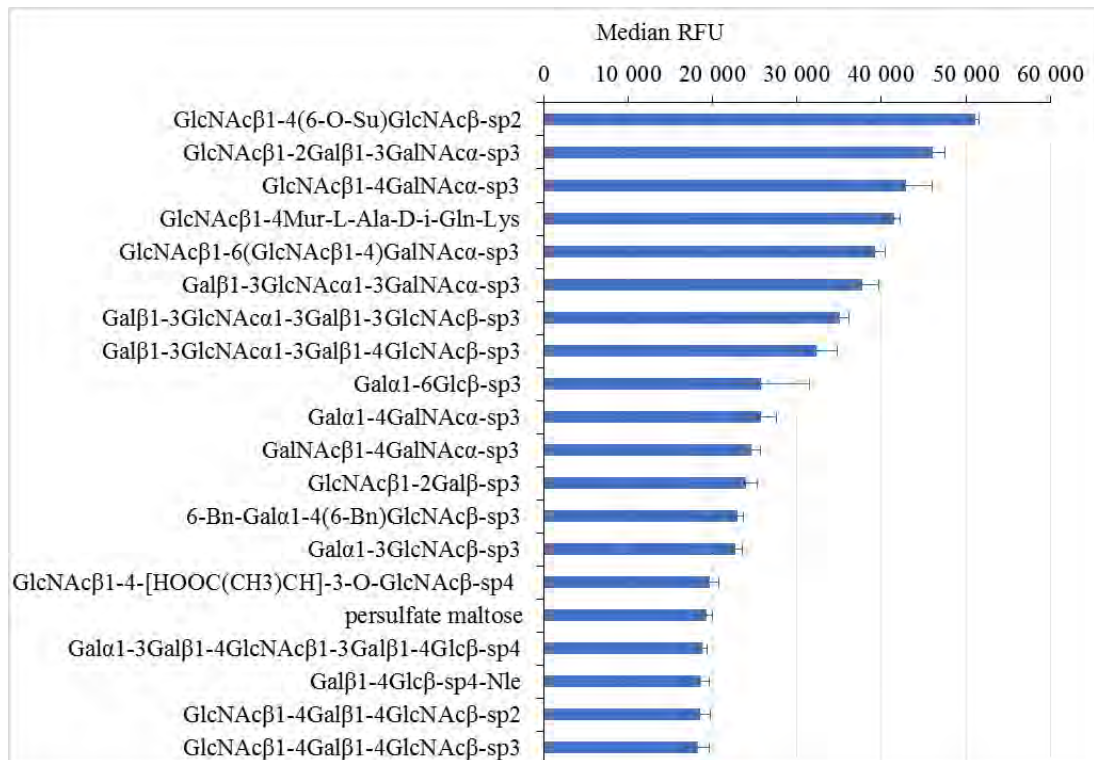


Рисунок 43. Топ-20 специфичностей аптечного препарата “Иммуноглобулин человека нормальный” производства фирмы “Микроген НПО”, Россия, выявленных с помощью гликочипа.

sp2,3,4 –аминоэтил, аминопропил, глицил спейсеры, Nle – норлейцин, Lys – лизин

Спектр связывания аптечного IgG довольно широкий и охватывает около четверти всех лигандов чипа. На Рисунке 43 приведены топ-20 лигандов, это преимущественно GlcNAcβ-терминированные структуры, гликаны, терминированные изолактозамином-α и α-галактозой. Широкий спектр связывания АГАТ хорошо согласуется с данными, полученными ранее для препаратов внутривенного иммуноглобулина различных производителей (Gunten S. von et al., 2009).

II. Специфичность аффинно выделенных анти-Галили антител из аптечного препарата “Иммуноглобулин человека нормальный” производства фирмы “Микроген НПО”, Россия

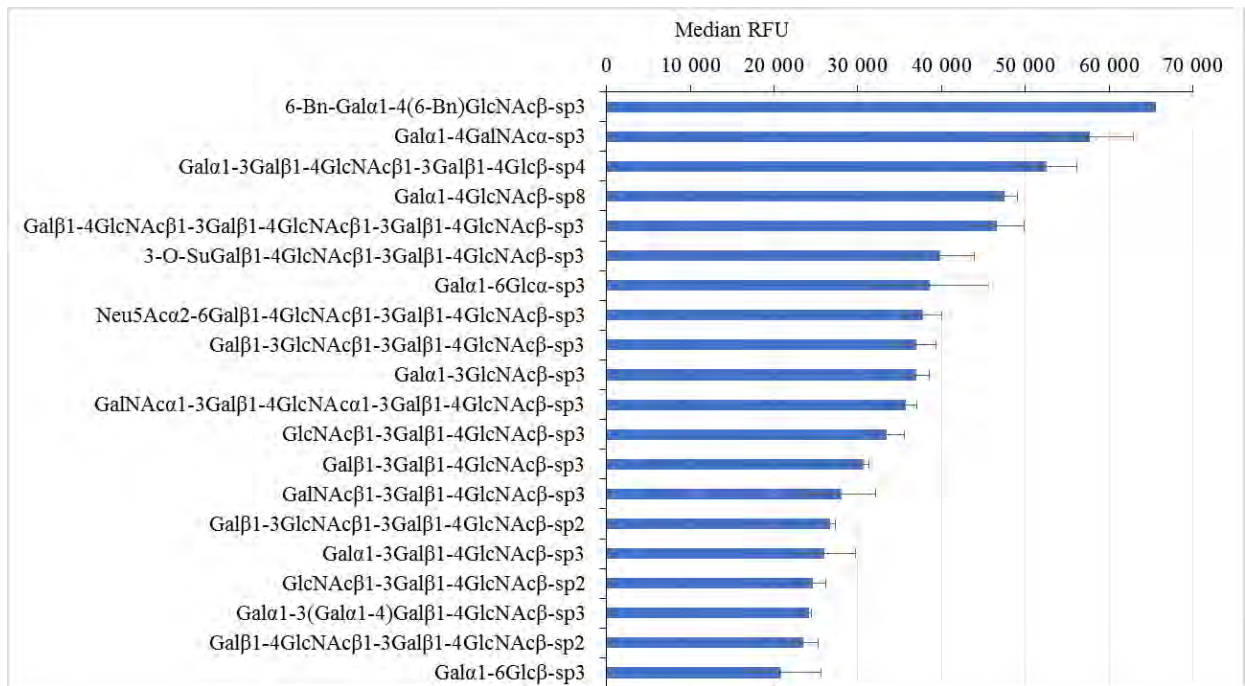


Рисунок 44. Топ-20 специфичностей аффинно выделенных анти-Галили антител из аптечного препарата “Иммуноглобулин человека нормальный” производства фирмы “Микроген НПО”, Россия, выявленных с помощью гликочипа.

sp2,3,4,8 –аминоэтил, аминопропил, глицил и аминок-полиэтилен гликолевый спейсеры

Специфичность антител, выделенных из аптечного препарата на колонке с сорбентом, несущим трисахарид Галили ($\text{Gal}\alpha 1\text{-3Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta$), оказалась довольно широкой (на Рисунке 44 приведены топ-20 гликанов, связывающихся с пулом аффинно выделенных антител). В спектре связывания представлены преимущественно антигены Галили (три-, тетра- и пентасахариды), αGal -терминированные (не Галили) гликаны, а также олигосахариды, не имеющие структурного сходства с исследуемым антигеном. Ранее было показано, что благодаря способности естественных антител связываться с пространственными эпитопами, анти-Галили антитела человека способны распознавать неродственные структуры, в частности, полисахариды бактерий (Dobrochaeva K. et al., 2021). Однако чип, используемый в данном исследовании не содержал полисахаридов, но возможность связывания выделенных антител с пространственными эпитопами, по-видимому, объясняет их взаимодействие с широким спектром олигосахаридных лигандов, представленных на Рисунке 44.

III. Специфичность аффинно выделенных анти-Tn антител из аптечного препарата “Иммуноглобулин человека нормальный” производства фирмы “Микроген НПО”, Россия;

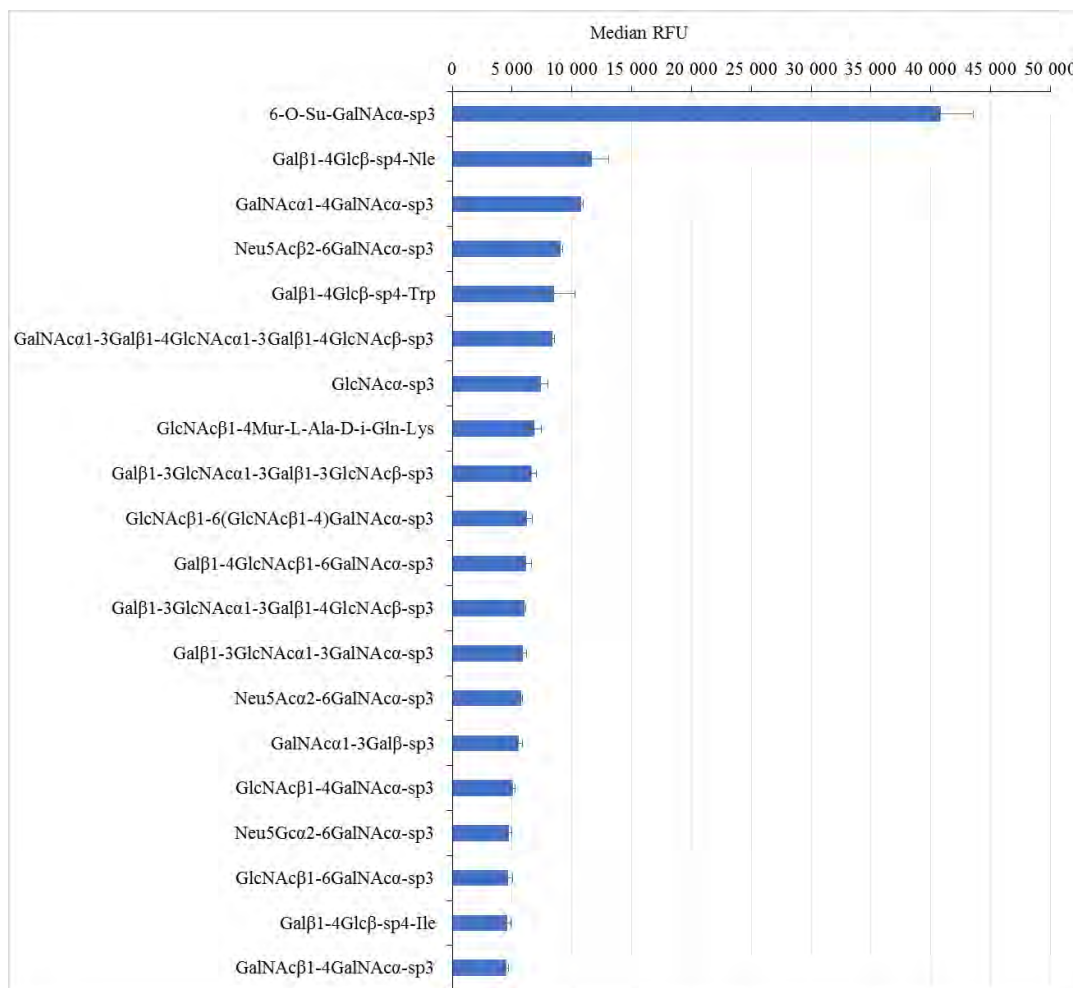


Рисунок 45. Топ-20 специфичностей аффинно выделенных анти-Tn антител из аптечного препарата “Иммуноглобулин человека нормальный” производства фирмы “Микроген НПО”, Россия, выявленных с помощью гликочипа.

sp3–аминопропильный спейсер, Nle – норлейцин, Lys – лизин, Ile – изолейцин, Trp – триптофан.

Аффинно выделенные антитела распознавали 6-O-Su-GalNAcα и ограниченный набор гликанов, терминированных GalNAcα, взаимодействуя преимущественно с гликанами, имеющими этот моносахарид в коре (Рисунок 45), что согласуется с ранее полученными данными по специфичности подобных антител, выделенных из комплексного иммуноглобулинового препарата (Dobrochaeva K. et al., 2020a). Также, как и анти-Галили антитела, изучаемые антитела распознавали гликаны, не имеющие структурного сходства с GalNAcα, например, аминокислотные производные лактозы.

IV. Специфичность аффинно выделенных анти-Neu5Acβ-Bn антител из аптечного препарата “Иммуноглобулин человека нормальный” производства фирмы “Микроген НПО”, Россия;

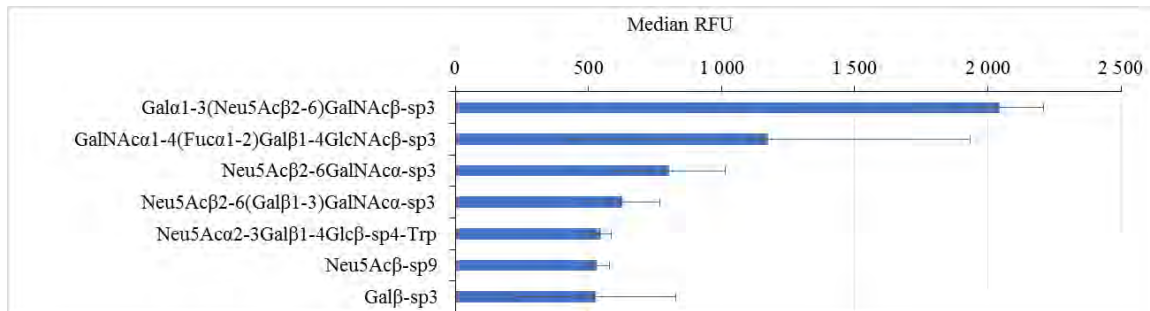


Рисунок 46. Профиль специфичности аффинно выделенных анти-Neu5Acβ-Vn антител из аптечного препарата “Иммуноглобулин человека нормальный” производства фирмы “Микроген НПО”, Россия, определенный с помощью гликохипа. sp3–аминопропильный спейсер, Trp – триптофан.

Выделенные на сорбенте с Neu5Acβ антитела обладали очень узкой специфичностью – преимущественно, гликаны, содержащие в своем составе нейраминовую кислоту в бета-конфигурации (Рисунок 46).

V. Специфичность аффинно выделенных анти-Галили антител из элюата плаценты пациентки с нормальной беременностью группы крови 0(I)+

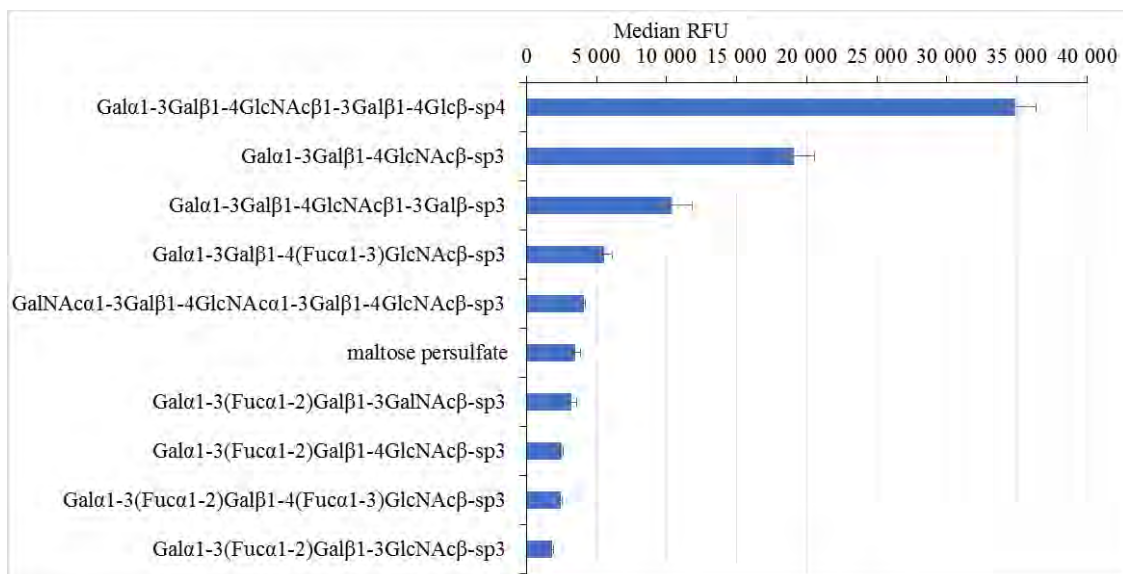


Рисунок 47. Профиль специфичности аффинно выделенных анти-Галили антител из элюата плаценты пациентки с физиологической беременностью, выявленный с помощью гликохипа. sp3,4 – аминопропильный и глицильный спейсеры.

Помимо антител к три-, тетра- и пентасахариду Галили, в элюатах обнаружены антитела к антигенам группы В, что неудивительно для пациенток с группой крови 0, а также другим αGal-терминированным сахарадам (Рисунок 47).

VI. Специфичность аффинно выделенных анти-Галили антител из элюата плаценты пациентки с нормальной беременностью группы крови A(II)+

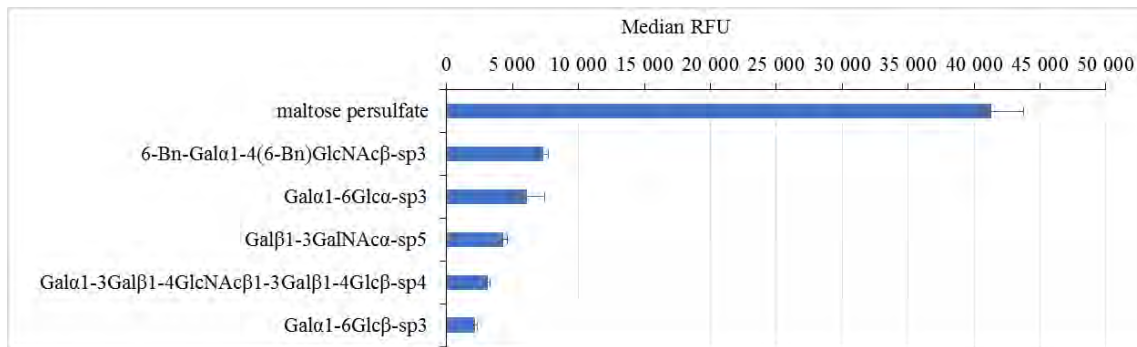


Рисунок 48. Профиль специфичности аффинно выделенных анти-Галили антител из элюата плаценты пациентки с нормальной беременностью группы крови, определенный с помощью гликочипа.

sp3,4,5 – , аминопропил, глицил и аминооктильный спейсеры.

В отличие от здоровой беременной с нулевой группой крови, у пациентки с группой крови A в элюате наблюдали только ограниченное количество антител со специфичностью к α Gal-терминированным структурам, среди которых Галили не было (Рисунок 48). Обращает на себя внимание высокая активность связывания антител с персульфатом мальтозы. Этот лиганд выявляется в топе лигандов и для других случаев, представленных в профилях связывания антител. По-видимому, имеет место неспецифическое взаимодействие иммуноглобулинов с этим сильно заряженным лигандом.

VII. Специфичность аффинно выделенных анти-Галили антител из элюата плаценты пациентки с беременностью, осложненной преэклампсией группы крови 0(I)+

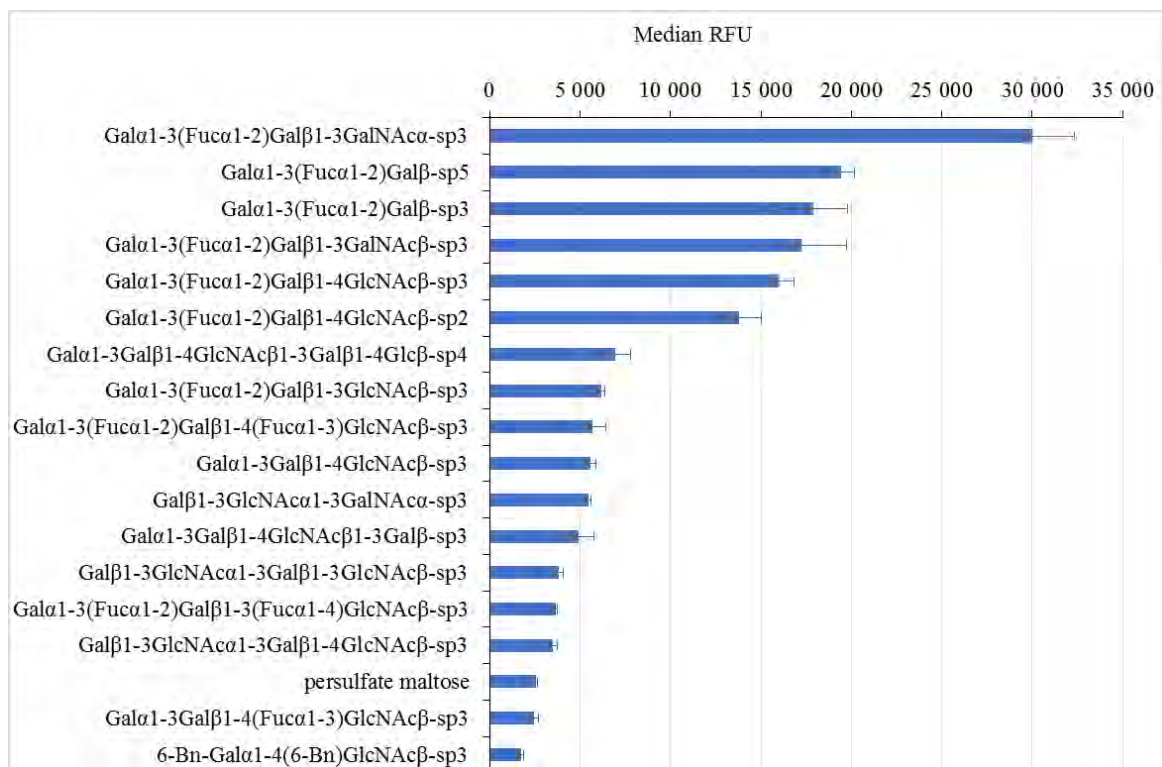


Рисунок 49. Профиль специфичности аффинно выделенных анти-Галили антител из элюата плаценты пациентки с беременностью, осложненной преэклампсией группы крови 0(I)+, выявленный с помощью гликочипа.
sp2,3,4,5 –аминоэтил, аминопропил, глицил и аминоктильный спейсеры.

Выделенные из элюата антитела преимущественно связываются с антигенами группы крови В, Галили и α Gal-терминированными гликанами, а также, в отличие от здоровых пациенток, с Galβ1-3GlcNAcα-терминированными структурами, не содержащими α Gal (Рисунок 49).

VIII. Специфичность аффинно выделенных анти-Галили антител из элюата плаценты пациентки с беременностью, осложненной преэклампсией группы крови A(II)+

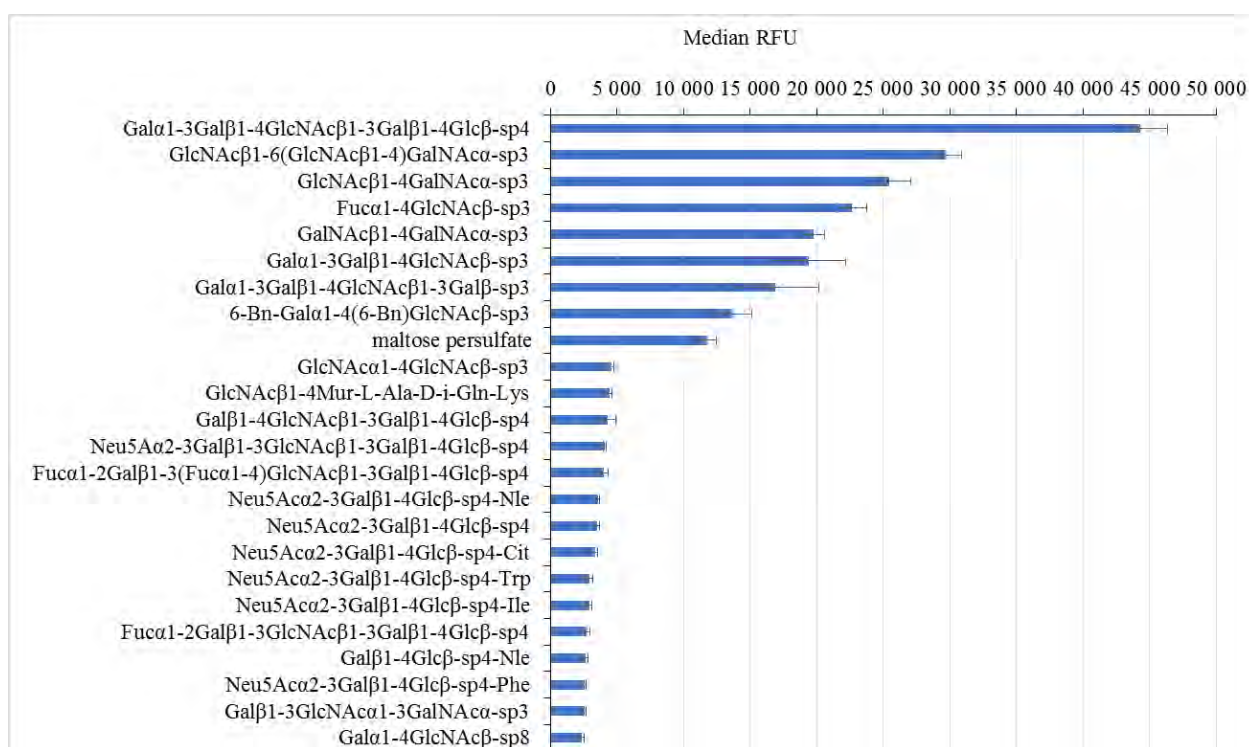


Рисунок 50. Профиль специфичности аффинно выделенных анти-Галили антител из элюата плаценты пациентки с беременностью, осложненной преэклампсией группы крови A(II)+, выявленный с помощью гликочипа.

sp3,4 – аминопропил, глицил и amino-полиэтилен гликолевый спейсеры, Nle – норлейцин, Lys – лизин, Ile – изолейцин, Trp – триптофан, Phe – фенилаланин, Cit – цитруллин.

Профиль выделенных на сорбенте с трисахаридом Галили антител из элюатов с плаценты пациенток с преэклампсией был гораздо шире, чем у пациенток с нормальной беременностью: помимо различных α Gal- и Galβ1-3GlcNAcα-терминированных гликанов (но не антигенов группы крови B, как у пациентки с преэклампсией группы крови 0(I)), обнаруживалось в низком титре взаимодействие с аминокислотными производными 3'-сиалиллактозы и лактозы (Рисунок 50).

IX. Специфичность аффинно выделенных анти-Tn антител из элюата плаценты пациентки с нормальной беременностью группы крови A(II)+

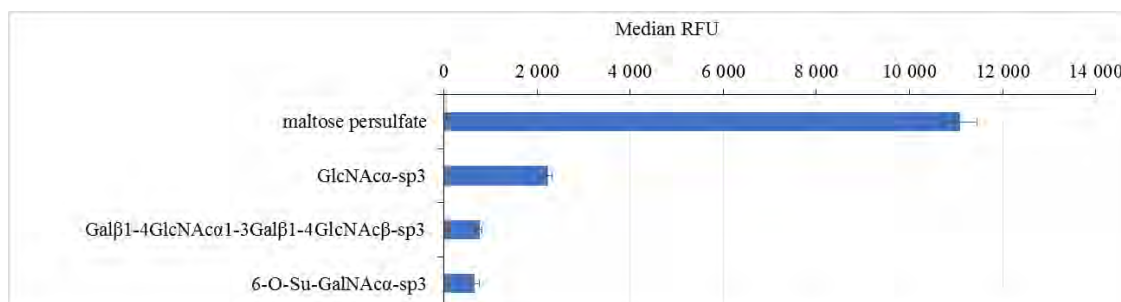


Рисунок 51. Профиль специфичности аффинно выделенных анти-Tn антител из элюата плаценты пациентки с нормальной беременностью, выявленный с помощью гликочипа.

sp3 – аминопропильный спейсер

Профиль специфичности этих антител был очень узким (Рисунок 51) – помимо сильнозаряженного персульфата мальтозы, обнаруживались антитела к GlcNAc α , GlcNAc α -содержащему тетрасахариду и 6-O-Su-GalNAc α , обнаруженным в профилях анти-Tn-антителах человека ранее (Dobrochaeva K. et al., 2020a).

3.6. Характеристика мишеней в тканях плаценты и биологических эффектов плацента-ассоциированных AgAT

3.6.1. Подтверждение мишеней углеводной природы для плацента-ассоциированных AgAT в ткани плаценты

Окраска ткани плаценты проводилась по модифицированному протоколу, описанному в разделе 2.3.1. Результаты окрашивания представлены на Рисунке 52 и Рисунке 53.

При окрашивании ткани легкого мыши, которая была использована в качестве позитивного контроля, были выявлены сайты коричневого окрашивания, которые свидетельствуют о наличии α Gal-эпитопа, в частности, антигена Галили (Рисунок 52 А). Предобработка ткани легкого α -галактозидазой (Рисунок 52 Б) значительно сократила сайты окрашивания, что свидетельствует о специфическом связывании аффинно выделенных анти-Галили антител с α Gal-эпитопом. При окрашивании ткани легкого мыши (Рисунок 52 В) и ткани плаценты человека (Рисунок 52 Г) раствором VECTASTAIN® ABC, который содержит вторичные антитела, наблюдалось незначительно выраженное неспецифическое связывание.

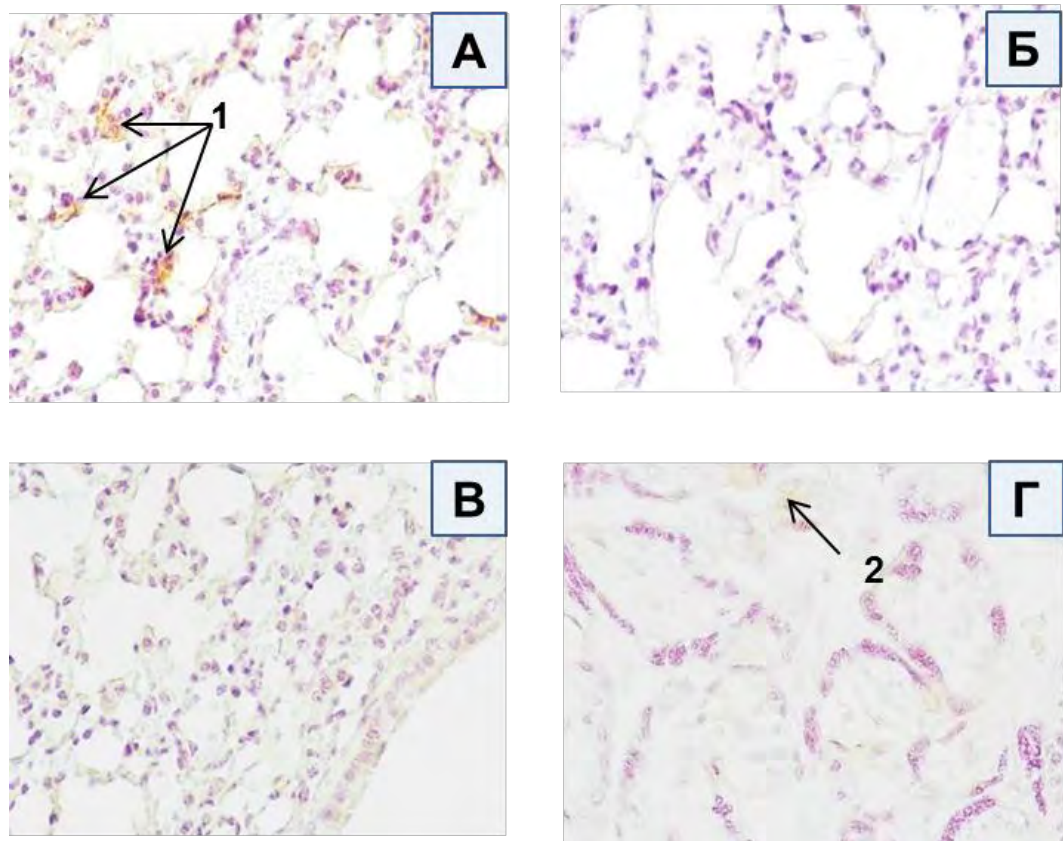


Рисунок 52. Позитивное и негативное контрольное окрашивание тканей. А – окрашивание анти-Галили антителами ткани легкого мыши; Б - окрашивание анти-Галили антителами после предобработки ткани легкого мыши раствором α -галактозидазы; В – окрашивание раствором VECTASTAIN® ABC ткани легкого мыши; Г – окрашивание ткани плаценты раствором VECTASTAIN® ABC. 1 – сайты окрашивания ткани легкого мыши; 2 – сайты окрашивания ткани плаценты человека. Увеличение: $\times 400$.

Проведенный анализ препаратов ткани плаценты позволил установить наличие в плаценте эпитопов для связывания анти-Галили антител. Наиболее выраженное окрашивание получено в синцитиотрофобласте ворсин в образце ткани нормальной зрелой плаценты пациентки с физиологической беременностью (Рисунок 53 А). Обработка ткани нормальной плаценты α -галактозидазой (Рисунок 53 Б) не привела к уменьшению интенсивности окраски, что означает в ткани нормальной плаценты отсутствие Галили-подобных эпитопов, а эпитоп, окрашиваемый анти α Gal-антителами, вероятно, представляет собой одну из пространственных структур, не содержащих остатки α Gal-, которые способны распознавать естественные антитела человека.

Окрашивание анти-Галили антителами ткани зрелой плаценты пациенток с ПЭ показало наличие окрашивания синцитиотрофобласта некоторых ворсин (Рисунок 53 В) и

ядер клеток стромы ворсин (Рисунок 53 Г). Ферментативная предобработка ткани плаценты пациентки с ПЭ (с α -галактозидазой) приводит к выраженному сокращению окрашивания во всех структурах и большинстве ворсин с сохранением слабого окрашивания в единичных ворсинах (Рисунок 53 Д). В плаценте с ЗРП при окрашивании анти-Галили антителами выявляется умеренное окрашивание синцитиотрофобласта единичных ворсин (Рисунок 53 Е). Окрашивание анти-Галили антителами после воздействия α -галактозидазы полностью исчезает при ЗРП.

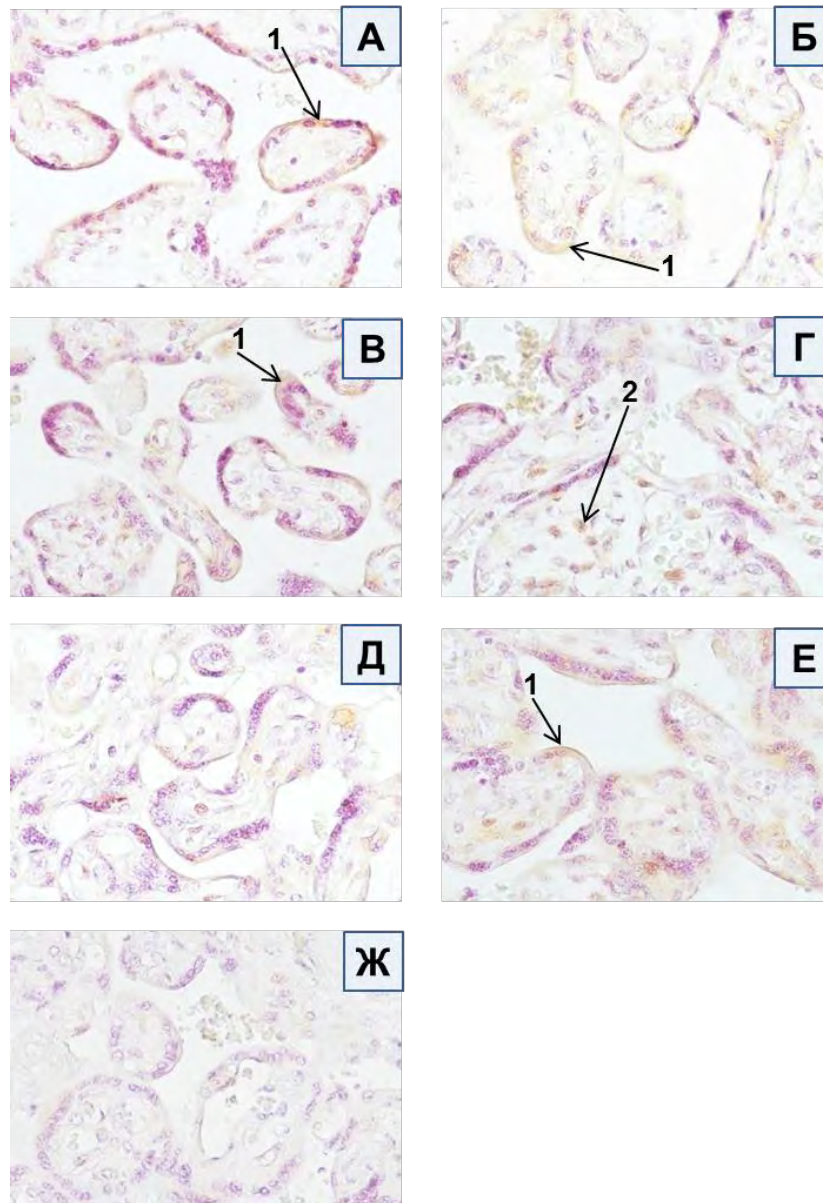


Рисунок 53. Окрашивание ткани плаценты человека анти-Галили антителами. А – ткань нормальной зрелой плаценты, окрашенная анти-Галили антителами; Б - ткань нормальной зрелой плаценты, окрашенная анти-Галили антителами после предобработки ткани α -галактозидазой; В, Г– ткань зрелой плаценты пациентки с преэклампсией, окрашенная анти-Галили антителами; Д - ткань зрелой плаценты пациентки с преэклампсией, окрашенная анти-Галили антителами после предобработки ткани α -

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

Полученные данные свидетельствуют о значительных различиях в составе эпитопов, окрашиваемых анти-Галили антителами в тканях плаценты пациенток с физиологической и осложненной развитием ПЭ и ЗРП беременностью. По-видимому, в нормальной ткани отсутствуют эпитопы, пространственно похожие на α Gal-, напротив, при патологии α Gal-подобные эпитопы представлены в значительном количестве в гликокаликсе синцитиотрофобласта при ПЭ и ЗРП и даже в составе ядерной мембраны стромальных клеток при ПЭ.

Анализ микрофотографий, демонстрирующих результаты окрашивания тканей плаценты пациенток с нормальной беременностью, осложненной ранней и поздней формой ПЭ и ЗРП анти-Tn антителами (25 мкг/мл) и анти-Neu5Ac β -Vn антителами (25 мкг/мл) показало отсутствие окрашенных сайтов (данные не демонстрируются), что может быть указанием как на отсутствие этих гликанов в тканях при использовании аффинно выделенных антител в используемой концентрации, или их низкой экспрессией и недостаточной чувствительностью метода детекции.

3.6.2. Изучение влияния эффекта предобработки аффинно выделенными антителами клеток линии EA.hy926 на экспрессию маркеров активации эндотелия

Проводилось тестирование аффинно выделенных анти-Галили-, анти-Neu5Ac β - и анти-Tn антител в клеточной модели в условиях *in vitro* активации эндотелиальных клеток под действием цитокинов. В клеточной модели, под воздействием TNF α , который является значимым фактором эндотелиальной активации, частично воспроизводятся условия, создающиеся *in vivo* при различных патологиях, в том числе при ПЭ.

Дизайн представленного эксперимента включает предобработку клеток антителами с последующим внесением в ростовую среду цитокина, что позволяет моделировать развитие активации эндотелиальных клеток в условиях наличия предсуществующих антител. Протокол стимуляции клеток и цитометрического анализа изложен в разделе 2.3.4. (Рисунок 14 и Рисунок 15). Анализ гистотограмм показал, что при действии всех исследуемых антител на неактивированные клетки наблюдается незначительное повышение доли клеток, экспрессирующих маркер CD106 (Рисунок 54), при этом средняя

интенсивность флуоресценции (СИФ – показатель, отражающий плотность экспрессии маркера на поверхности клеток) CD106-позитивных клеток также не меняется (Рисунок 54). Внесение TNF α индуцирует повышение доли CD106-позитивных клеток, но на фоне предварительно присутствующих антител, это повышение менее выражено. СИФ CD106-позитивных клеток во всех представленных вариантах не менялась, что свидетельствует об отсутствии значимого эффекта антител на экспрессию активационного маркера CD106.

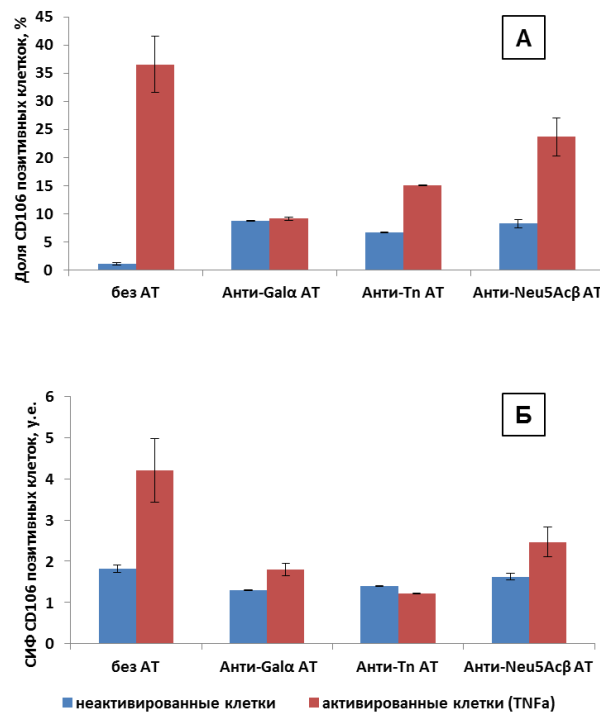


Рисунок 54. Содержание (А) и СИФ (Б) CD106-позитивных клеток в активированной TNF α и неактивированной фракции эндотелиальных клеток линии EA.hy926 в присутствии аффинно выделенных анти-Галили-, анти-Neu5Ac β - и анти-Tn антител.

Маркер CD54 является конститутивным маркером эндотелиальных клеток, экспрессия которого возрастает при активации, что подтвердилось в данных условиях по возрастанию доли и СИФ клеток, экспрессирующих CD54. Предкультивирование клеток с антителами и последующим добавлением TNF α не влияет на долю CD54-позитивных клеток, но СИФ CD54-позитивных клеток в 4,6 раз ниже при предобработке клеток анти-Neu5Ac β -антителами, чем без антител (Рисунок 55).

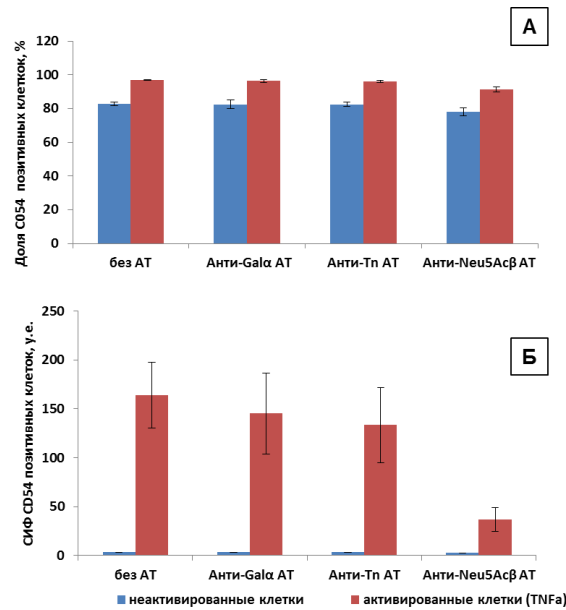


Рисунок 55. Содержание (А) и СИФ (Б) CD54-позитивных клеток в активированной TNF α и неактивированной фракции эндотелиальных клеток линии EA hy.926 в присутствии аффинно выделенных анти-Галили, анти-Neu5Ac β - и анти-Tn антител.

Несмотря на возрастание доли CD62E-позитивных клеток во всех вариантах сочетаний исследуемых факторов (добавление TNF α , антител, добавление TNF α на фоне антител), СИФ CD62E-позитивных клеток менялась незначительно, что свидетельствует об отсутствии значимого эффекта исследуемых антител на экспрессию CD62E (Рисунок 56).

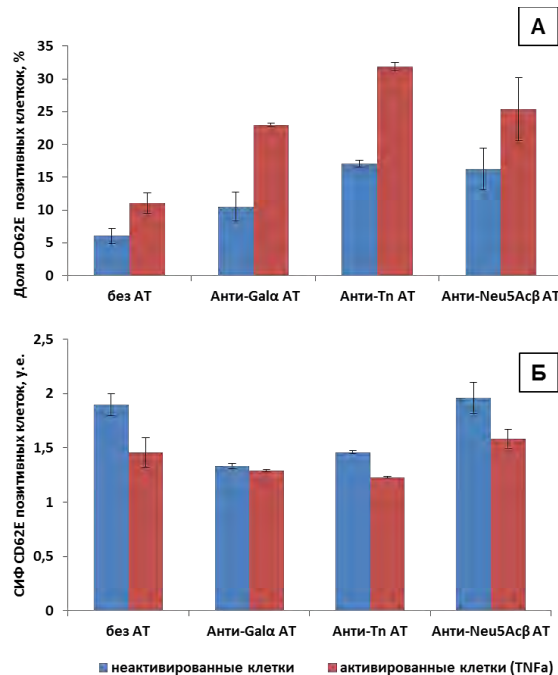


Рисунок 56. Содержание (А) и СИФ (Б) CD62E-позитивных клеток в активированной TNF α и неактивированной фракции эндотелиальных клеток линии EA hy.926 в присутствии аффинно выделенных анти-Галили, анти-Neu5Ac β - и анти-Tn антител.

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод о влиянии анти-Neu5Ac β антител на активационный статус эндотелиальных клеток. Низкая плотность экспрессии CD54 на эндотелиальных клетках в условиях предварительной обработки клеток анти-Neu5Ac β антителами демонстрирует протективный эффект этих антител за счет препятствования активации.

3.6.3. Изучение влияния аффинно выделенных AgAT на экспрессию клетками линии EAhy.926 маркеров активации в различных экспериментальных условиях

Поскольку наиболее чувствительным маркером, выявленным на предыдущем этапе, был CD54, а выраженный эффект на экспрессию активационных маркеров показали анти-Neu5Ac β антитела, было проведено исследование влияния анти-Neu5Ac β антител на активационный статус эндотелия в условиях, предполагающих развитие воспалительного процесса, с внесением антител в качестве агента, который возможно рассматривать в качестве фармакокорректирующего средства, в дальнейшем. “Анти-Галили и анти-Tn антитела, которые не оказали выраженного эффекта на первом этапе исследования, были рассмотрены в новых моделях с целью идентификации их биологических эффектов. Для анти-Галили и анти-Tn антител исследовалась только экспрессия CD54” (Зиганшина М.М. и др., 2020), для анти-Neu5Ac β антител была исследована экспрессия трех активационных маркеров: CD106, CD54, CD62E.

В качестве модельных вариантов, позволяющих оценивать воздействие антител на клетки, рассматривались:

1. Активация клеток предобработкой TNF α с последующим внесением в среду культивирования антител;
2. Активация клеток предобработкой TNF α с последующей полной заменой среды с удалением TNF α и внесением в среду культивирования антител.

Для этого клетки линии EA hy.926 в концентрации 50 000/лунку разносились в 96 луночные планшеты в 100 мкл среды. Через 18 часов при достижении монослоя клеток в лунке производилось внесение добавок по трем вариантам:

1. к клеткам добавляли тестируемые антитела
2. к клеткам добавляли TNF α на 4 часа, и затем, в среду культивирования вносили тестируемые антитела

3. к клеткам добавляли TNF α на 4 часа, затем полностью заменяли среду культивирования, и вносили тестируемые антитела

Также был предусмотрен ряд контрольных образцов клеток, в которых оценивалась экспрессия активационных маркеров: а) необработанные клетки (без добавления “антител и TNF α ”; б) клетки с TNF α ; в) клетки, у которых после инкубации с TNF α в течение 4 часов была заменена среда на ростовую среду без антител. Концентрация антител, используемых в эксперименте: анти-Tn и анти-Neu5Ac β 10 мкг/мл; анти-Галили 20 мкг/мл” (Dobrochaeva et al., 2020b). Инкубация с антителами проводилась в течение 24 часов. Далее клетки заливали р-ром Версена, снимали с лунки и центрифугировали, отмывали р-ром PBS, и окрашивали антителами к CD106, CD54, CD62E, затем фиксировали раствором Optilise и производили накопление на проточном цитометре.

Установлено, что экспозиция TNF α с клетками в обоих вариантах внесения анти-Tn и анти-Галили антител не оказывает выраженного эффекта на долю и СИФ CD54-позитивных клеток (Рисунок 57).

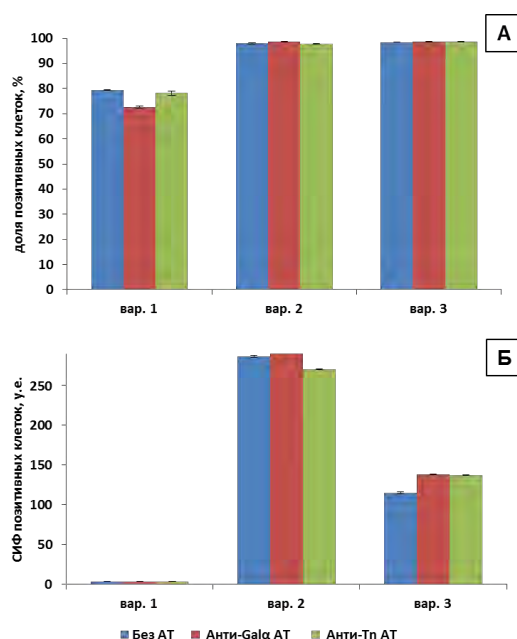


Рисунок 57. Влияние действия анти-Tn и анти-Галили антител на содержание (А) и СИФ (Б) CD54-позитивных клеток. вар. 1 – клетки, без активации TNF α ; вар. 2 - клетки с предобработкой TNF α и последующим внесением антител; вар. 3 - клетки с предобработкой TNF α , последующей полной сменой среды с удалением TNF α , и внесением антител.

Эффект влияния анти-Neu5Ac β антител на экспрессию активационных маркеров CD106, CD54, CD62E исследовался в вышеописанных условиях (Рисунок 58). Установлено, что на неактивированных клетках выявляется конститутивно высокий уровень экспрессии

CD54, но низкий CD106 и CD62E. Добавление анти-Neu5Ac β антител к неактивированным клеткам несколько снижает долю CD54-позитивных клеток и незначительно увеличивает долю CD62E-позитивных клеток, но при этом СИФ неактивированных клеток, в том числе при добавлении анти-Neu5Ac β антител остается в пределах фоновых значений (Рисунок 58 А и Б). При добавлении к клеткам TNF α (вар. 3) возрастает доля и СИФ CD54-позитивных клеток, а также доля CD106-позитивных клеток, что свидетельствует об изменении статуса клеток на активированный (Рисунок 58, вар. 3). Последовательное внесение анти-Neu5Ac β антител на фоне действия TNF α (вар. 4) ведет к значительному снижению СИФ CD54-позитивных клеток и доли CD106-позитивных клеток, что свидетельствует о снижении экспрессии активационных маркеров при действии антител. Экспозиция клеток с TNF α (4 часа) с последующим удалением цитокина, путем полной замены среды, ведет к снижению и СИФ CD54-позитивных и долю CD106-позитивных клеток по сравнению с вар. 3, где TNF α инкубировался с клетками в течение всего времени эксперимента. Однако внесение в свежую ростовую среду без TNF α анти-Neu5Ac β антител (вар. 6) вызывает повышение доли CD106-позитивных и CD62E-позитивных клеток и снижение СИФ CD54-позитивных клеток по сравнению с вар. 5, где антитела отсутствовали. Следует отметить, что экспрессия активационных маркеров в клетках вар. 4 и вар. 6 практически не отличалась (за исключением экспрессии маркера CD62E). Полученные результаты свидетельствуют о подтвержденном эффекте анти-Neu5Ac β антител на снижение экспрессии маркеров активации эндотелия.

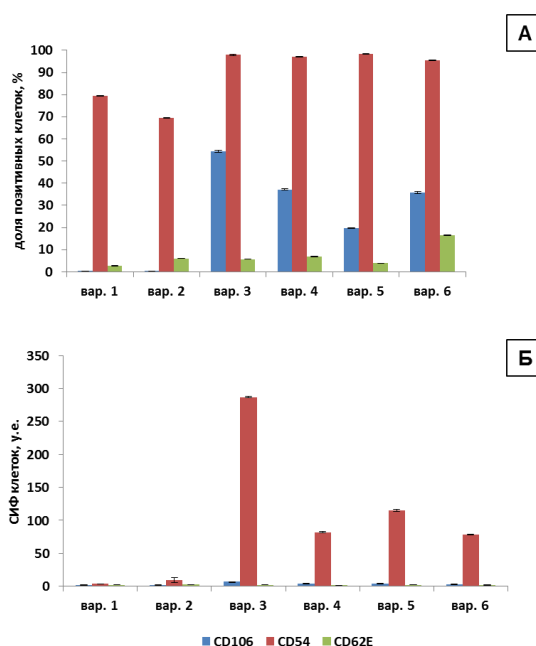


Рисунок 58. Влияние анти-Neu5Ac β антител на экспрессию активационных маркеров клеток линии EA.hy 926. Содержание (А) и СИФ (Б), экспрессирующих маркеры

CD106, CD54 и CD62E после инкубации с антителами при различных вариантах внесения антител и TNF α .

вар. 1 – клетки линии EA.hy 926, инкубированные в ростовой среде без добавок; **вар. 2** – клетки линии EA.hy 926, инкубированные с анти-Neu5Ac β антителами; **вар. 3** – клетки линии EA.hy 926, инкубированные с TNF α ; **вар. 4** – клетки линии EA.hy 926, предобработанные TNF α (4 часа) и инкубированные с анти-Neu5Ac β антителами; **вар. 5** – клетки линии EA.hy 926, инкубированные с TNF α (4 часа) с дальнейшей заменой среды на ростовую среду без добавок; **вар. 6** – клетки линии EA.hy 926, инкубированные с TNF α (4 часа) с дальнейшей заменой среды на ростовую среду с добавлением анти-Neu5Ac β антител. Концентрация анти-Neu5Ac β антител 10 мкг/мл.

3.6.4. Изучение влияния аффинно выделенных анти-Neu5Ac β антител на гибель клеток линии EA.hy.926

При инкубации анти-Neu5Ac β антител с клетками был замечен эффект избыточной клеточной гибели. Вследствие этого было проведено исследование влияния различных концентраций анти-Neu5Ac β антител на экспрессию активационных маркеров и количество мертвых клеток, которые детектируются после инкубации с антителами. Дизайн эксперимента, проведенного для этой цели, был аналогичен описанному в п. 3.6.2. Анти-Neu5Ac β антитела вносились в среду для культивирования клеток в концентрациях 10; 5; 2,5 и 0,5 мкг/мл.

Количество мертвых клеток было проанализировано на проточном цитометре по параметрам: малоугловому (FS) и 90-градусному светорассеянию (SS). Уменьшение размера (FS) и повышение гранулярности (SS) характерно для статуса повышенной гибели клеток, что и наблюдалось на гистограммах. При анализе живых клеток агрегаты и мертвые клетки были исключены из анализа. Поскольку линия клеток EA.hy 926 является адгезивной культурой, при ее диссоциации раствором Версена образуется значительное число агрегатов, которые исключаются при анализе живых клеток, что значительно влияет на оценку их жизнеспособности в вариантах инкубации клеток без антител и без цитокина. При тесте на жизнеспособность с трипановым синим 97% клеток не пропускали краситель в цитоплазму, что свидетельствует о высокой исходной жизнеспособности клеток, которые используются в эксперименте.

Выявлен дозозависимый эффект анти-Neu5Ac β антител на жизнеспособность клеток линии EA.hy 926. Из всех исследованных концентраций антител (10; 5; 2,5 и 0,5 мкг/мл) концентрация 10 мкг/мл обладала наиболее выраженным эффектом, вызывающим гибель клеток. В концентрации 2,5 мкг/мл и ниже, установлено отсутствие влияния антител на гибель клеток. Причем эффект, по-видимому, опосредуется именно исследуемыми антителами, поскольку TNF α не оказывает влияния на клеточную гибель (Рисунок 59).

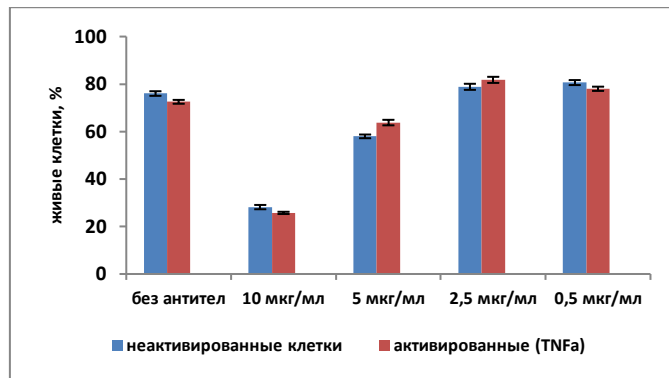


Рисунок 59. Содержание живых клеток, детектируемых после инкубации различных концентраций анти-Neu5Acβ-антител с клетками линии EA.hy 926

3.6.5. Исследование дозозависимого эффекта анти-Neu5Acβ антител на активационный статус клеток линии EA.hy 926

Установлено снижение доли CD106-позитивных клеток при предварительной инкубации анти-Neu5Acβ антител в концентрациях 5,0 и 2,5 мкг/мл (Рисунок 60 А). При этом СИФ CD106-позитивных клеток менялась незначительно (Рисунок 60 Б).

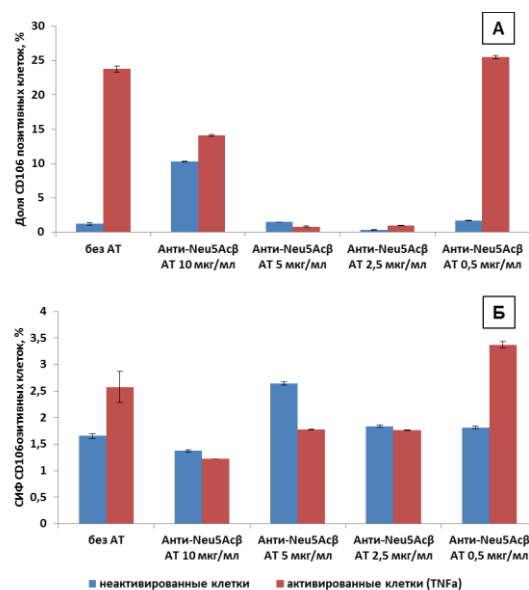


Рисунок 60. Содержание (А) и СИФ (Б) CD106-позитивных клеток при культивировании клеток линии EA.hy 926 в присутствии различных концентраций анти-Neu5Acβ антител.

Значительный эффект на СИФ CD54-позитивных клеток, отражающую экспрессию маркера CD54, был установлен в диапазоне концентраций тестируемых антител от 10,0 до 2,5 мкг/мл. В концентрации 0,5 мкг/мл экспрессия маркера CD54 не отличается от

выявляемой в контрольных лунках с добавлением TNF α без антител, что свидетельствует об отсутствии эффекта антител (Рисунок 61).

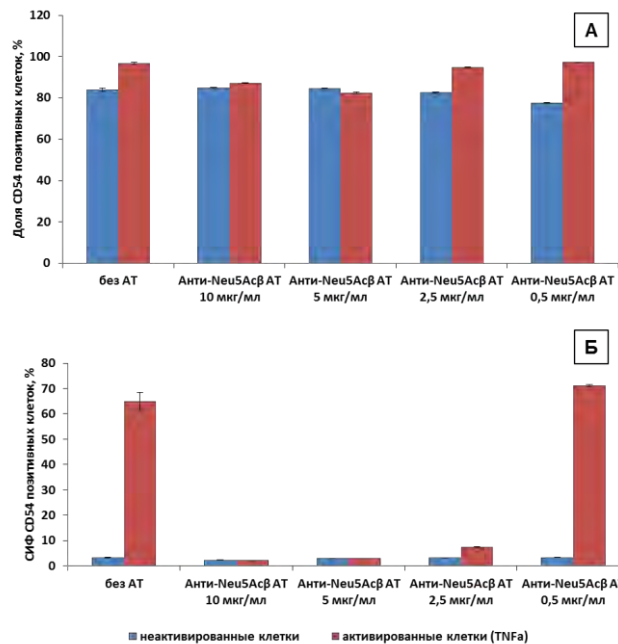


Рисунок 61. Содержание (А) и СИФ (Б) CD54-позитивных клеток при культивировании клеток линии EA.hy 926 в присутствии различных концентраций анти-Neu5Ac β антител.

Исследование воздействия различных концентраций анти-Neu5Ac β антител на экспрессию CD62E показало, что “значительное возрастание доли CD62E-позитивных клеток выявляется в концентрации 10,0 мкг/мл как при добавлении TNF α , так и без него, что свидетельствует о выраженном эффекте антител (Рисунок 62 А). СИФ CD62E-позитивных клеток значительно повышен при” (Обухова П.С., 2011) концентрациях анти-Neu5Ac β антител 10,0 и 5,0 мкг/мл только условиях внесения в среду культивирования TNF α (Рисунок 62 Б).

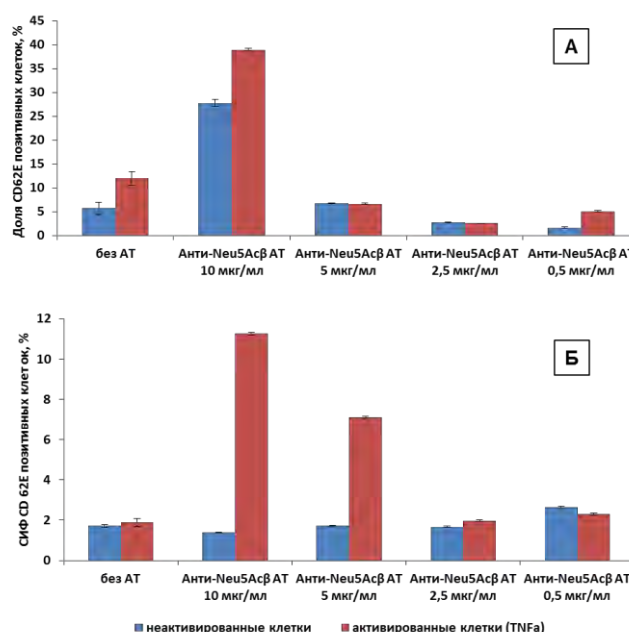


Рисунок 62. Содержание (А) и СИФ (Б) CD62E-позитивных клеток при культивировании клеток линии EA.hy 926 в присутствии различных концентраций анти-Neu5Acβ антител.

Результаты представлены в (Обухова П.С. и др, 2022).

3.7. 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 следующем этапе было проведено исследование субпопуляционного состава иммунокомпетентных клеток. Для характеристики особенностей иммунного реагирования матерей и их новорожденных, а также поиска маркеров нарушений толерантности, проводилась всесторонняя оценка основных субпопуляций регуляторных и эффекторных клеток, значимых для аллогенного распознавания. Рассматривались минорные субпопуляции различных направлений дифференцировки В-клеток (включая субпопуляции антителопродуцирующих клеток, клеток памяти и регуляторных клеток), а также субпопуляции Т- и NK-клеток, включая регуляторные клетки. Фенотипирование проводили в периферической (здоровые беременные и беременные с ПЭ) и пуповинной крови (здоровые новорожденные и новорожденные с перинатальной патологией) на поздних сроках беременности, поскольку пуповинная кровь доступна для исследований только в доношенном сроке физиологической беременности.

3.7.1. Оценка мажорных и минорных субпопуляций В-лимфоцитов в периферической и пуповинной крови

Как следует из полученных данных, пациентки с ПЭ не отличаются от пациенток с нормальной беременностью по содержанию мажорных субпопуляций В1-, В2-лимфоцитов, В-клеток с фенотипом регуляторных, а также ряду малых субпопуляций В-клеток. Значимо повышенное содержание транзиторных В-клеток фенотипа $CD19^+CD38^{++}CD27^-$ (в 5,5 раз) наивных зрелых В-клеток ($CD19^+CD38^+CD27^-$) в 1,8 раз и В-клеток предшественников герминативного центра (Вm2' пре-GC с фенотипом $CD19^+CD38^{++}IgD^+$) в 2,4 раза выявлялось в периферической крови пациенток с ПЭ по сравнению с пациентками с физиологической беременностью. У пациенток с ПЭ наблюдалось значимое снижение в 3,1 раза содержания покоящихся В-клеток памяти с фенотипом $CD19^+CD38^-CD27^+$ и поздних В-клеток памяти (Вm5) с фенотипом $CD19^+CD38^-IgD^-$ в 28 раз. Пограничный уровень значимости выявлен для ряда субпопуляций. В частности, снижение содержания более, чем в 3 раза у беременных с ПЭ демонстрировали В-клетки памяти переключенные; в 2,2 раза Вm1 девственно наивные клетки памяти; в 2 раза субпопуляция В-клеток негативных по CD38 и CD27 ($CD19^+CD38^-CD27^-$), Таблица 23.

Таблица 23. Относительное количество субпопуляций В-лимфоцитов периферической крови пациенток с физиологической и осложненной развитием ПЭ беременностью, Me(Q1-Q3),%*

Субпопуляции	Фенотип	Здоровые беременные (n=10)	Беременные с ПЭ (n=10)	p-уровень
В1	$CD19^+CD5^+$	4,16 (3,38-7,12)	5,66 (3,23-7,80)	0,594
В2	$CD19^+CD5^-$	95,83 (92,89-96,61)	94,34 (92,20-96,77)	0,549
В-рег	$CD19^+CD24^+CD27^+$	14,13 (8,56-17,12)	15,81 (11,64-29,28)	0,477
В-рег	$CD19^+CD24^+CD38^{hi}$	0,75 (0,45-0,98)	1,20 (0,30-3,64)	0,286
В-рег	$CD19^+CD24^+CD38^{dim}$	8,95 (6,18-9,29)	2,90 (0,10-7,76)	0,110
В-клетки наивные	$CD19^+CD27-IgD^+$	56,74 (45,83-66,49)	65,62 (53,56-74,02)	0,286
В-клетки памяти непереключенные	$CD19^+CD27^+IgD^+$	22,91 (13,43-27,28)	22,68 (19,51-32,48)	0,477

Субпопуляции	Фенотип	Здоровые беременные (n=10)	Беременные с ПЭ (n=10)	р- уровень
<i>В-клетки памяти переключенные</i>	<i>CD19⁺CD27⁺IgD⁻</i>	<i>15,05 (9,42- 23,43)</i>	<i>4,67 (3,68- 10,76)</i>	<i>0,091</i>
Двойные негативные	CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgD ⁻	2,95 (2,17-6,58)	1,86 (1,14-5,03)	0,214
Транзиторные	CD19⁺CD38⁺⁺CD27⁻	0,87 (0,45-1,34)	4,80 (4,15-5,98)	0,010
Наивные зрелые	CD19⁺CD38⁺CD27⁻	29,33 (9,52- 50,95)	54,23 (45,96- 63,82)	0,033
<i>Двойные негативные</i>	<i>CD19⁺CD38⁻CD27⁻</i>	<i>12,43 (7,58- 27,48)</i>	<i>6,37 (3,38- 10,36)</i>	<i>0,051</i>
Активированные зрелые	CD19 ⁺ CD38 ⁺ CD27 ⁺	20,26 (6,26- 35,04)	25,10 (21,84- 37,55)	0,374
Покоящиеся В- клетки памяти	CD19⁺CD38⁻CD27⁺	11,10 (6,45- 31,60)	3,62 (2,76-4,52)	0,008
<i>Вm1 девственно наивные</i>	<i>CD19⁺CD38⁻IgD⁺</i>	<i>14,65 (9,44- 55,56)</i>	<i>6,60 (5,49- 15,23)</i>	<i>0,091</i>
Вm2 активированные наивные	CD19 ⁺ CD38 ⁺ IgD ⁺	64,93 (8,52- 75,34)	74,81 (63,80- 78,56)	0,214
Вm2' пре-GC	CD19⁺CD38⁺⁺IgD⁺	2,11 (0,47-3,55)	4,97 (2,73-8,64)	0,021
Вm3 + Вm4 центробласты+ центроциты	CD19 ⁺ CD38 ⁺⁺ IgD ⁻ + CD19 ⁺ CD38 ⁺⁺ IgD ⁺	0,04 (0,00-0,17)	0,03 (0,00-0,09)	0,577
еВm5 ранние В- клетки памяти	CD19 ⁺ CD38 ⁺ IgD ⁻	7,37 (6,14-10,61)	5,55 (3,47- 18,64)	0,790
Вm5 поздние В- клетки памяти	CD19⁺CD38⁻IgD⁻	36,38 (2,35- 23,96)	1,30 (0,85-2,23)	0,021

*От общего числа В-клеток

Таблица 24. Относительное количество субпопуляций В-лимфоцитов пуповинной крови здоровых новорожденных и новорожденных с перинатальной патологией, рожденных от

матерей с физиологической и осложненной развитием ПЭ беременностью, Ме (Q1-Q3), %*

Субпопуляции	Фенотип	Здоровые новорожденные (n=10)	Новорожденные от матерей с ПЭ (n=10)	р-уровень
B1	CD19 ⁺ CD5 ⁺	64,66 (24,67-83,39)	49,00 (36,12-60,73)	0,328
B2	CD19 ⁺ CD5 ⁻	35,35 (16,66-73,70)	51,00 (39,27-63,88)	0,328
B-reg	CD19 ⁺ CD24 ⁺ CD27 ⁺	1,58 (0,54-10,98)	2,49 (1,47-5,35)	0,790
B-reg	CD19 ⁺ CD24 ⁺ CD38 ^{hi}	11,93 (3,34-16,71)	19,32 (4,16-34,00)	0,248
B-reg	CD19 ⁺ CD24 ⁺ CD38 ^{dim}	0,80 (0,49-2,69)	0,92 (0,15-1,59)	0,657
В-клетки наивные	CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgD ⁺	84,64 (76,29-91,47)	86,15 (77,41-93,85)	0,657
В-клетки памяти непереключенные	CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgD ⁺	2,83 (2,59-9,45)	3,16 (1,76-5,82)	0,657
В-клетки памяти переключенные	CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgD ⁻	0,69 (0,18-3,87)	0,60 (0,08-0,98)	0,790
Двойные негативные	CD19 ⁺ CD27 ⁻ IgD ⁻	6,54 (2,02-20,66)	5,42 (1,35-11,47)	0,722
Транзиторные	CD19 ⁺ CD38 ⁺⁺ CD27 ⁻	33,13 (9,75-40,04)	31,52 (27,34-39,41)	0,929
Наивные зрелые	CD19⁺CD38⁺CD27⁻	37,40 (30,22-44,07)	51,22 (44,34-56,79)	0,062
Двойные негативные	CD19 ⁺ CD38 ⁻ CD27 ⁻	12,11 (5,03-33,16)	6,78 (4,25-14,58)	0,477
Активированные зрелые	CD19 ⁺ CD38 ⁺ CD27 ⁺	1,53 (1,36-1,98)	2,42 (1,52-4,84)	0,267
Покоящиеся В-клетки памяти	CD19 ⁺ CD38 ⁻ CD27 ⁺	1,62 (0,37-3,91)	0,55 (0,37-1,53)	0,722
Bm1 девственно наивные	CD19 ⁺ CD38 ⁻ IgD ⁺	15,82 (9,39-35,86)	6,99 (2,82-12,18)	0,214

Субпопуляции	Фенотип	Здоровые новорожденные (n=10)	Новорожденные от матерей с ПЭ (n=10)	р-уровень
Bm2 активированные наивные	CD19 ⁺ CD38 ⁺ IgD ⁺	46,77 (39,38-60,41)	49,62 (33,63-55,30)	0,594
Bm2' пре-GC	CD19 ⁺ CD38 ⁺⁺ IgD ⁺	18,92 (11,46-29,83)	27,60 (22,79-46,28)	0,155
Bm3 + Bm4 центробласты+ центроциты	CD19 ⁺ CD38 ⁺⁺ IgD ⁻ + CD19 ⁺ CD38 ⁺⁺ IgD ⁺	1,94 (0,82-5,89)	2,29 (0,92-4,25)	0,859
eBm5 ранние В-клетки памяти	CD19 ⁺ CD38 ⁺ IgD ⁻	2,85 (1,74-6,46)	3,81 (0,59-8,32)	0,773
Bm5 поздние В-клетки памяти	CD19 ⁺ CD38 ⁻ IgD ⁻	2,22 (0,24-5,56)	1,12 (0,69-2,24)	0,923

*От общего числа В-клеток

В пуповинной крови новорожденных погранично значимые различия выявлены только по наивным зрелым В-клеткам с фенотипом CD19⁺CD38⁺CD27⁻: их содержание в 1,4 раз выше у младенцев, рожденных от матерей с ПЭ. Остальные субпопуляции демонстрировали тренды к изменению, не достигая заданного уровня значимости (Таблица 24).

Результаты определения субпопуляционного состава В-лимфоцитов в периферической и пуповинной крови представлены в Таблице 23 и Таблице 24, соответственно.

3.7.2. Оценка мажорных и минорных субпопуляций Т-лимфоцитов в периферической и пуповинной крови

Как свидетельствуют данные, представленные в Таблице 25 и Таблице 26, выявлено повышение активированных Т-хелперов в крови пациенток с ПЭ (пограничный уровень значимости). Содержание остальных субпопуляций Т-клеток в периферической крови пациенток с физиологической и осложненной развитием ПЭ беременностью, включая Т-регуляторные клетки фенотипа CD3⁺CD4⁺CD25^{bright}CD127^{low to neg}, Т-рег цитотоксические

клетки фенотипа $CD3^+CD8^+CD28^-$ и Т-цитотоксические эффекторные клетки фенотипа $CD3^+CD8^+CD28^+$ было сопоставимо.

Таблица 25. Относительное количество популяций и субпопуляций Т-лимфоцитов периферической крови пациенток с физиологической и осложненной развитием ПЭ беременностью, Ме(Q1-Q3),%*

Субпопуляции	Фенотип	Здоровые беременные (n=10)	Беременные с ПЭ (n=10)	р-уровень
Т-хелперы	$CD3^+CD4^+$	45,09 (40,71-48,92)	44,10 (42,79-45,84)	0,722
<i>Т-хелперы активированные</i>	<i>$CD4^+CD25^+CD127^+$</i>	<i>1,92 (0,75-2,40)</i>	<i>2,48 (2,31-3,56)</i>	<i>0,076</i>
Т-рег	$CD3^+CD4^+CD25^{bright}CD127^{low\ to\ neg}$	2,84 (2,26-3,85)	3,35 (2,61-3,85)	0,399
Т-цитотокс.	$CD3^+CD8^+$	31,83 (26,63-36,96)	34,92 (26,55-37,31)	0,657
Т-цитотокс (эффекторные)	$CD3^+CD8^+CD28^+$	9,96 (8,33-14,80)	12,25 (7,85-15,62)	0,657
Т(рег)-цитотокс	$CD3^+CD8^+CD28^-$	11,46(10,59-17,34)	13,23 (9,30-16,60)	0,859

*От общего лимфоцитов

Таблица 26. Относительное количество популяций и субпопуляций Т-лимфоцитов периферической крови пациенток с физиологической и осложненной развитием ПЭ беременностью, Ме(Q1-Q3),%*

Субпопуляции	Фенотип	Здоровые беременные (n=10)	Беременные с ПЭ (n=10)	р-уровень
<i>Т-хелперы активированные</i>	<i>$CD4^+CD25^+CD127^+$</i>	<i>3,94 (1,23-5,54)</i>	<i>5,47 (5,13-7,86)</i>	<i>0,091</i>

Субпопуляции	Фенотип	Здоровые беременные (n=10)	Беременные с ПЭ (n=10)	p-уровень
T-рег	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ^{bright} CD127 ^{low} to neg	6,59 (4,05-7,39)	6,65 (5,83-8,09)	0,477
T(рег)-цитотокс	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD28 ⁻	11,46 (10,59-17,34)	13,23 (9,30-16,60)	0,859
T-цитотокс (эффекторные)	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD28 ⁺	23,46 (19,53-28,23)	23,61 (20,27-28,10)	1,000

*От Т-лимфоцитов

В пуповинной крови новорожденных от матерей с ПЭ выявлено повышенное содержание активированных Т-хелперов с фенотипом CD4⁺CD25⁺CD127⁺ (в 1,6 раз) и Т(рег)-клеток. Данные представлены в Таблице 27 и Таблице 28.

Таблица 27. Относительное количество популяций и субпопуляций Т-лимфоцитов пуповинной крови здоровых новорожденных и новорожденных с перинатальной патологией от матерей с физиологической и осложненной развитием ПЭ беременностью, Me(Q1-Q3), %*

Субпопуляции	Фенотип	Здоровые новорожденные (n=10)	Новорожденные от матерей с ПЭ (n=10)	p-уровень
Т-хелперы	CD3 ⁺ CD4 ⁺	50,24 (46,95-55,20)	50,09 (44,27-56,35)	0,790
Т-хелперы активированные	CD4⁺CD25⁺CD127⁺	1,09 (0,83-1,52)	1,70 (1,35-2,26)	0,021
T-рег	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ^{bright} CD127 ^{low} to neg	3,82 (3,28-4,95)	4,32 (3,88-4,73)	0,477
T-цитотокс.	CD3 ⁺ CD8 ⁺	21,00 (17,03-26,44)	25,36 (22,29-30,28)	0,131
T-цитотокс (эффекторные)	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD28 ⁺	21,04 (15,73-26,49)	23,62 (21,55-27,88)	0,374

Субпопуляции	Фенотип	Здоровые новорожденные (n=10)	Новорожденные от матерей с ПЭ (n=10)	р-уровень
Т-(рег)цитотокс.	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD28 ⁻	1,28 (1,02-1,93)	1,01 (0,79-1,12)	0,100

*От общего лимфоцитов

Таблица 28. Относительное количество популяций и субпопуляций Т-лимфоцитов пуповинной крови здоровых новорожденных и новорожденных с перинатальной патологией от матерей с физиологической и осложненной развитием ПЭ беременностью, Me(Q1-Q3),%*

Субпопуляции	Фенотип	Здоровые новорожденные (n=10)	Новорожденные от матерей с ПЭ (n=10)	р-уровень
<i>Т-хелперы активированные</i>	<i>CD4⁺CD25⁺CD127⁺</i>	<i>2,07 (1,70-3,03)</i>	<i>2,79 (2,56-4,19)</i>	<i>0,069</i>
<i>Т-reg</i>	<i>CD3⁺CD4⁺CD25^{bright}CD127^{low to neg}</i>	<i>7,13 (6,13-7,97)</i>	<i>8,16 (7,57-9,60)</i>	<i>0,051</i>
Т-(рег)цитотокс.	CD3+CD8+CD28 ⁻	1,56 (1,32-2,29)	1,06 (0,89-2,84)	0,374
Т-цитотокс (эффекторные)	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD28 ⁺	30,17 (21,71-34,46)	32,59(30,94-37,55)	0,424

*От Т-лимфоцитов

3.7.3. Оценка мажорных и минорных субпопуляций НК-лимфоцитов в периферической и пуповинной крови

Как свидетельствуют данные, представленные в Таблице 29 и Таблице 30, содержание НК-клеток, НК-клеток с регуляторной активностью фенотипа CD56^{bright}CD127⁺, а также NKT-клеток было сопоставимо между группами исследования как в периферической, так и в пуповинной крови.

Таблица 29. Относительное количество популяций и субпопуляций НК-лимфоцитов периферической крови пациенток с физиологической и осложненной развитием ПЭ беременностью, Me (Q1-Q3),%*

Субпопуляции	Фенотип	Здоровые беременные (n=10)	Беременные с ПЭ (n=10)	p-уровень
НК-клетки	CD3 ⁺ CD56 ⁺	10,03 (7,81-12,86)	10,47 (6,45-12,26)	1,000
NKT-клетки	CD3 ⁺ CD56 ⁺	5,17 (1,81-7,68)	6,85 (3,61-9,13)	0,248
Рег, НК-клетки	CD56 ^{bright} CD127 ⁺	0,54 (0,41-0,74)	0,32 (0,26-0,52)	0,168
Рег, НК-клетки (отНК-клеток)	CD56 ^{bright} CD127 ⁺	4,71 (1,79-8,87)	2,86 (1,72-8,75)	0,722

Таблица 30. Относительное количество популяций и субпопуляций НК-лимфоцитов пуповинной крови здоровых новорожденных и новорожденных с перинатальной патологией от матерей с физиологической и осложненной развитием ПЭ беременностью, Me(Q1-Q3),%*

Субпопуляции	Фенотип	Здоровые новорожденные (n=10)	Новорожденные от матерей с ПЭ (n=10)	p-уровень
НК-клетки	CD3 ⁺ CD56 ⁺	5,61 (3,72-8,76)	5,12(4,16-11,85)	0,790
NKT-клетки	CD3 ⁺ CD56 ⁺	0,44 (0,29-0,50)	0,22 (0,15-1,11)	0,859
Рег, НК-клетки	CD56 ^{bright} CD127 ⁺	0,62 (0,02-0,74)	0,33(0,18-0,46)	0,689
Рег, НК-клетки (отНК-клеток)	CD56 ^{bright} CD127 ⁺	8,35 (5,30-11,21)	7,23(3,00-9,20)	0,374

3.8. Содержание прогестерона и IL-6 в периферической и пуповинной крови

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. Акцент был сделан на исследовании АгАТ и гуморальных факторов, регулирующих продукцию протективных “блокирующих” антител (прогестерона и IL-6), поскольку на первом этапе был установлен дисбаланс экспрессии гликанов плаценты и выявлены различия в содержании антител, ассоциированных с ее тканью.

Установлено, что содержание IL-6 в периферической крови матери значимо выше при осложненной беременности: при ПЭ в 3 раза и при ЗРП в 1,3 раз по сравнению с

содержанием в крови пациенток с нормальной беременностью. В пуповинной крови выявляется тенденция к высокому содержанию IL-6 при ПЭ (≈ 2 раза) и ЗРП в 1,2 раза (Таблица 31, Рисунок 63). Содержание прогестерона, напротив, значимо снижено: при ПЭ в 1,3 раза, у пациенток с ЗРП в 1,2 раза (Таблица 31, Рисунок 64).

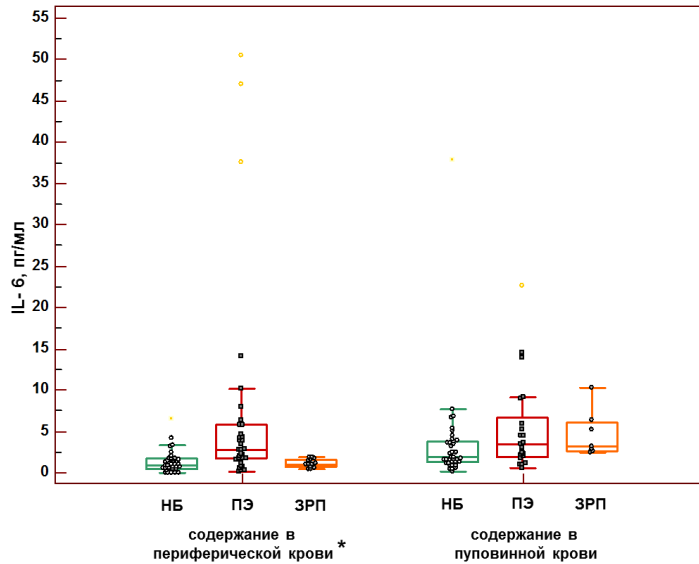


Рисунок 63. Содержание IL-6 в периферической и пуповинной крови пациенток с осложненной развитием ПЭ и ЗРП беременностью и их новорожденных. Различия между группами значимы (тест Краскалла-Уоллеса при; $p=0,025$).

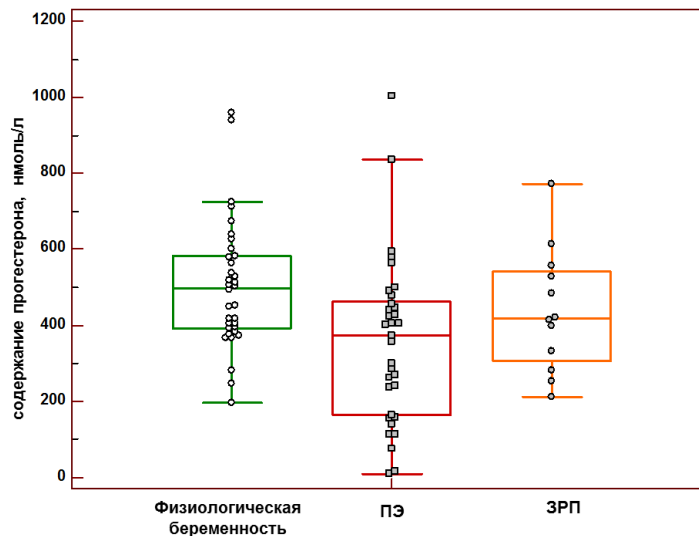


Рисунок 64. Содержание прогестерона в периферической крови пациенток с ПЭ и ЗРП. Различия между группами значимы (тест Краскалла-Уоллеса при; $p=0,025$).

Таблица 31. 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	Физиологическая беременность (n=34)	ПЭ (n=36)	ЗРП (n=12)	p ₁	p ₂	p ₃
П-6 в периферической крови, 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
П-6 в пуповинной крови, 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 в периферической крови матери, 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 физиологической беременностью, тест Манна-Уитни

p₂ – сравнение ЗРП с физиологической беременностью, тест Манна-Уитни

p₃ – тест Краскала- Уоллеса (p=0,025), демонстрирующий различия между группами.

Результаты представлены в (Muminova K. et al., 2023).

3.9. Характеристика профилей АгАТ у пациенток с физиологической беременностью и беременностью, осложненной ПЭ и ЗРП

В разделе приведено описание спектров АгАТ при нормальной беременности и беременности, осложненной ЗРП и ПЭ, а также другими осложнениями из группы гипертензивных расстройств во время беременности (ГАГ и беременностью на фоне ХАГ). Для указанных вариантов сравнения приведены бокс-плоты, иллюстрирующие связывание антител с лигандами (гликанами), названия которых приведены в соответствующих таблицах. Приведены данные только по значимым антителам, (уровень значимости с учетом поправки на множественность данных $p < 0,00017$). Рассчитывался индекс активности связывания АгАТ с антигенами гликанового эррея, (index of binding activity, IBA), который отражает аффинность антител и их количество. В рисунках зеленые ящики с усами отражают распределение IBA у беременных с нормальной, красные – с осложненной беременностью. По оси X бокс-плотов указаны идентификационные номера (ID) лигандов, названия которых приведены в соответствующих таблицах. В таблицах и на рисунках, приведенных ниже, представлены идентификационные номера и короткие названия гликанов (номера, название и состав гликанов, с которыми связываются антитела, представлены в Приложении).

3.9.1. Межгрупповые различия по АгАТ у пациенток с физиологической и осложненной беременностью на сроках, соответствующих ранней манифестации ПЭ и ЗРП

На сроках, соответствующих ранней манифестации ЗРП и ПЭ, значимые различия по АгАТ выявлены только при их сравнении у пациенток с нормальной беременностью и осложненной ЗРП.

- изменения АгАТ у беременных с ЗРП (ранние сроки: до 32 недель)

Рисунок 65 демонстрирует ИВА антител IgM класса к О-полисахариду бактерии *Sh. boydii* тип 12 (значимые различия).

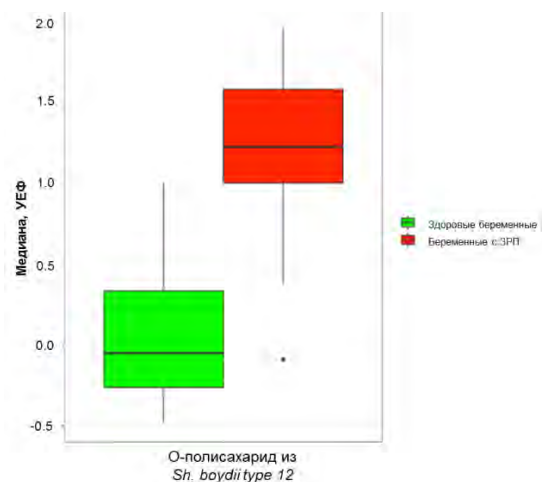


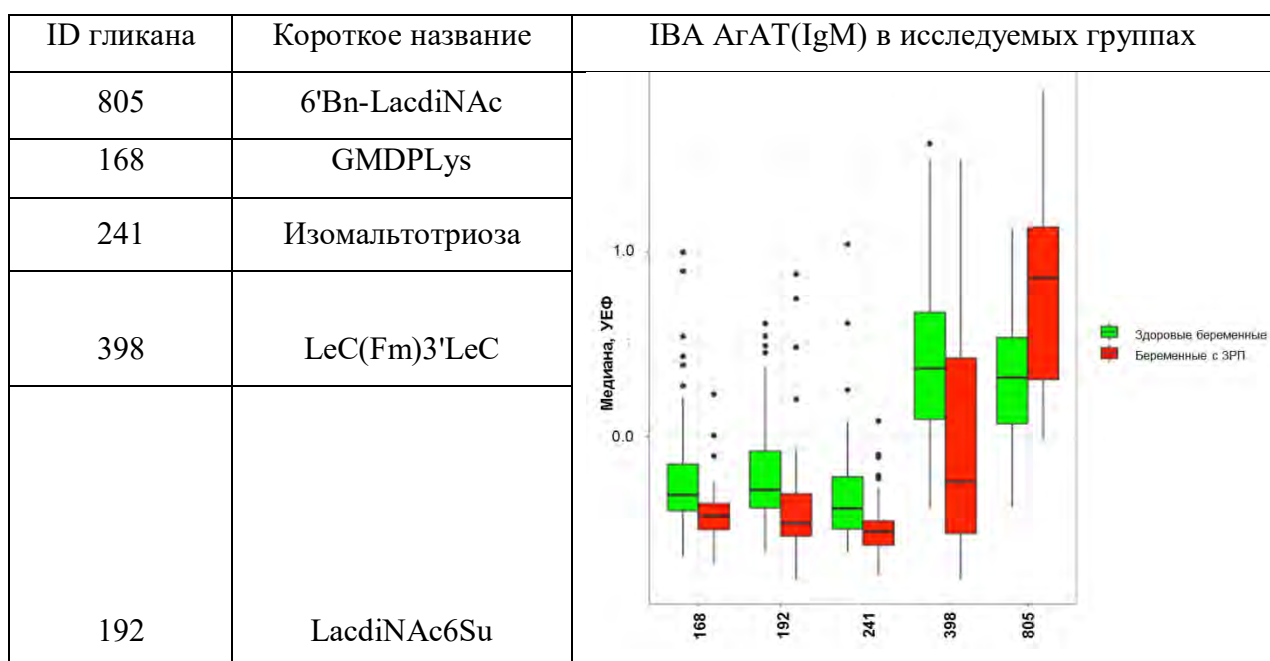
Рисунок 65. Индекс активности связывания анти-гликановых антител (IgM) с О-полисахаридом из *Sh. boydii* штамм 12 у пациенток с нормальной беременностью и ЗРП

3.9.2. Межгрупповые различия по АгАТ у пациенток с физиологической и осложненной беременностью на сроках, соответствующих поздней манифестации ПЭ и ЗРП

- изменения АгАТ у беременных с ЗРП (поздние сроки: после 32 недель)

В Таблице 32 приведен спектр АгАТ IgM отражающий различия сравниваемых групп по ИВА .

Таблица 32. Активность связывания анти-гликановых антител (IgM) при нормальной и осложненной ЗРП беременности на сроке после 32 недель

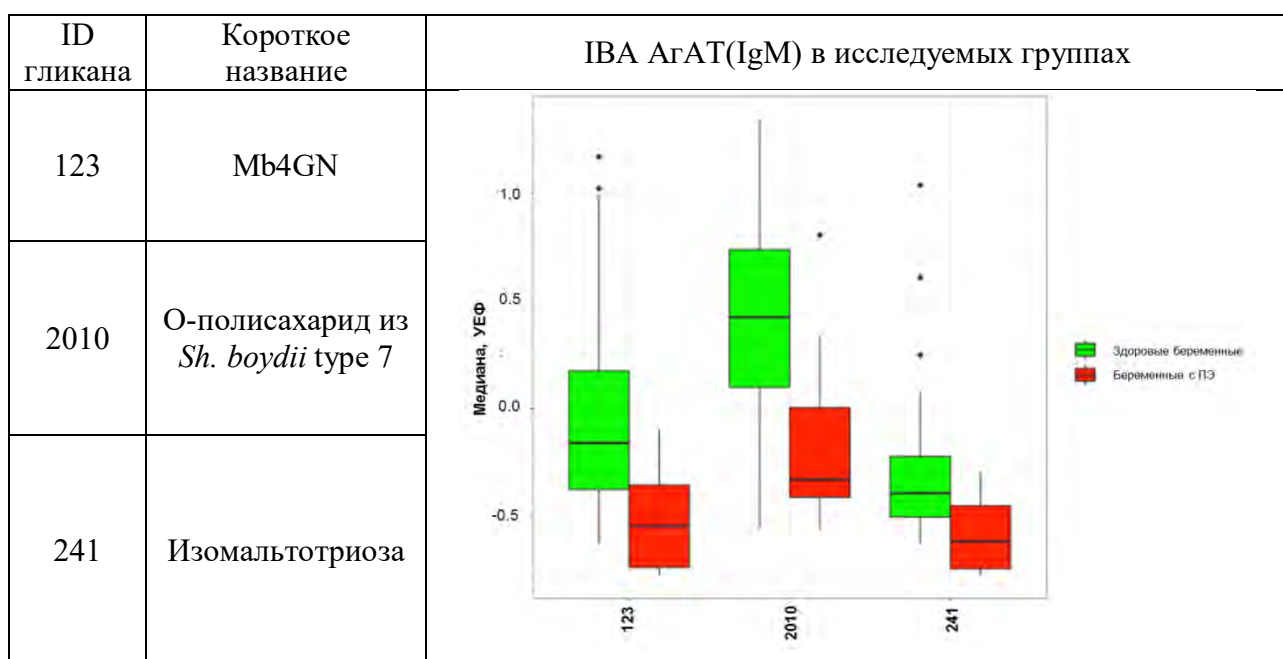


“Выявлено снижение IBA AgAT(IgM) к ряду гликанов, среди которых фрагмент пептидогликана клеточной стенки бактерий - глюкозаминилмурамилдипептид (№168), производное дисахарида Le^C (Galβ1-3GlcNAcβ) (№398), изомальтотриоза (№241). Обращает на себя внимание, что IBA антител специфичных к гликану №192 снижен, а IBA антител к гликану № 805, напротив, повышен у пациенток с ЗРП. Оба гликана являются производными ди-N-ацетиллактозамина” (Зиганшина М.М. и др., 2018): №805 – с бензильным заместителем, №192 – с сульфатом. Данные по AgAT(IgM) у беременных с ЗРП были получены в соавторстве с Мантровой Д.А.

- изменения AgAT у беременных с ПЭ тяжелой степени (поздние сроки: после 34 недель)

В Таблица 33 продемонстрирован спектр AgAt(IgM), которые изменены при тПЭ. Более значимо низкий IBA у беременных с тПЭ выявлен к дисахариду - субтерминальной группе N-цепей (№123), изомальтотриозе (№241) и О-полисахариду из *Sh. boydii* type 7.

Таблица 33. Активность связывания анти-гликановых антител (IgM) при нормальной беременности и осложненной ПЭ тяжелой степени на сроке после 34 недель



- различия по AgAT у беременных с у ПЭ по сравнению с беременными с тПЭ (поздние сроки: после 34 недель)

Сопоставление спектров AgAT у пациенток с ПЭ тяжелой и умеренной степенью выявило значимые различия по IBA AgAT(IgM) к изомальтотриозе: значимо более высокая активность связывания установлена при ПЭ тяжелой степени (Рисунок 66).

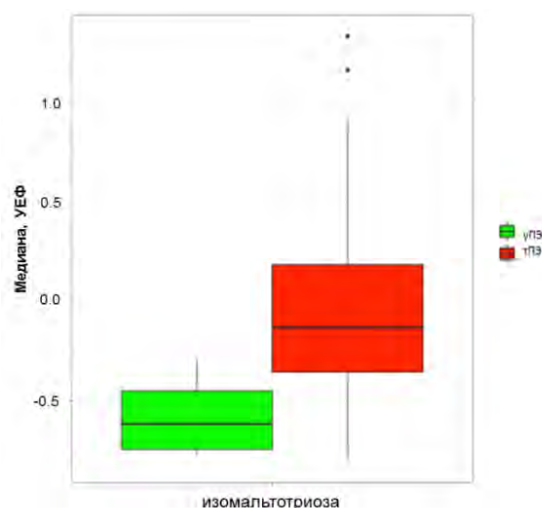
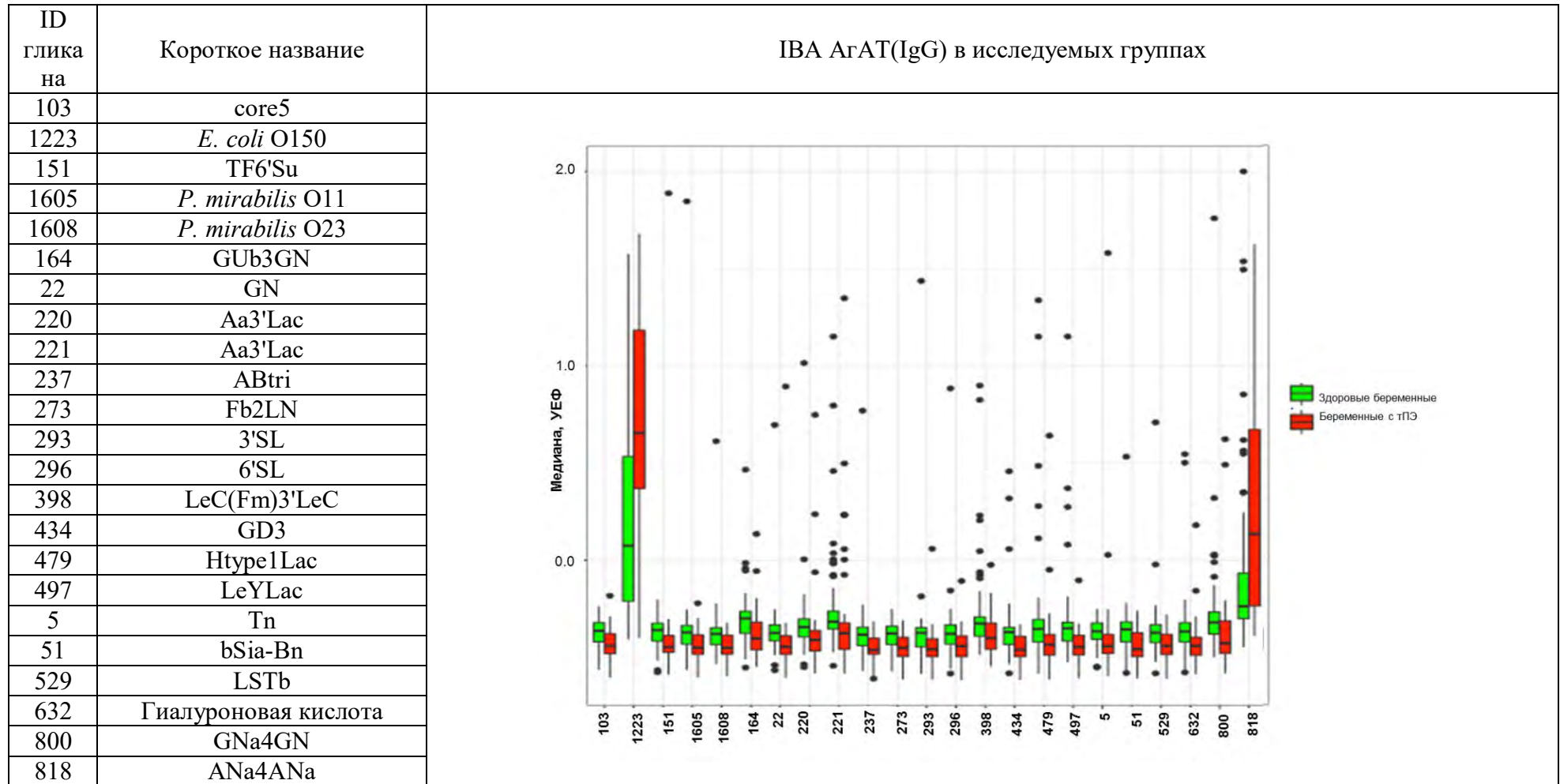


Рисунок 66. Индекс активности связывания AgAT (IgM) с изомальтотриозой у пациенток с беременностью, осложненной умеренной и тяжелой ПЭ.

- изменения AgAT у беременных с ПЭ умеренной степени (поздние сроки: после 34 недель)

Выявлены значимые различия по широкому спектру только АгАТ(IgG) (Таблица 34). При ПЭ умеренной степени, выявляется высокая активность связывания АгАт(IgG) к двум лигандам: О-полисахариду *E. coli* O150 (лиганд №1223) и дисахариду – димеру GalNAcα (лиганд №818). Снижение активности связывания АгАТ выявлено к широкому спектру гликанов: олигомеру гиалуроновой кислоты (№632) и ее структурному дисахариду (№164), бактериальным О-полисахаридам (№1605 и 1608), 3'- и 6'-сиалиллактозе (№293 и 296, соответственно), бета-сиаловой кислоте (№ 51), коровым фрагментам О-цепей (№103, 5), в том числе и сульфатированному производному дисахарида Томсена-Фриденрайха (№ 151), к производным лактозы (№ 220, 221), включая фукозилированные производные (№ 479, 497), глюкозамину (№ 22) и его производному (№ 800), 2'-фукозилированному производному N-ацетиллактозамина (антиген Н типа 2, № 273), конформационному антигену АВ (№ 237), производному дисахарида Le^C (№ 398), ганглиозиду GD3 (№ 434) и олигосахариду женского молока LSTb (№ 529), а также альфа-хитобиозе (№ 800). Данные по АгАТ(IgM) и АгАТ(IgG) у беременных с ПЭ были получены в соавторстве с Тютюнник Н.В.

Таблица 34. Активность связывания анти-гликановых антител (IgG) при нормальной беременности и беременности, осложненной ПЭ умеренной степени на сроке после 34 недель

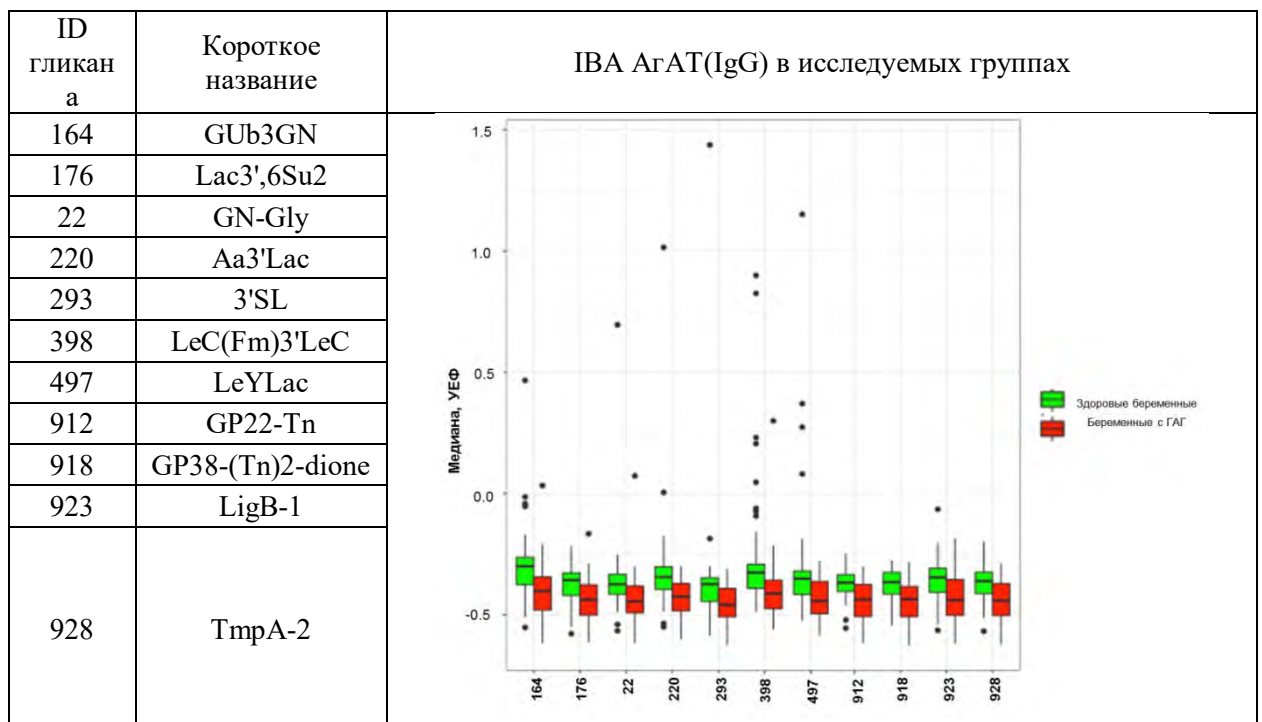


3.9.3. Межгрупповые различия по АгАТ у пациенток с физиологической беременностью и беременностью, осложненной гипертензивными расстройствами

- изменения АгАТ у беременных с гестационной артериальной гипертензией (ГАГ) (поздние сроки: после 34 недель)

Для установления патогенетической роли АгАТ при ПЭ было проведено сравнение спектров АгАТ при физиологической беременности и осложнений, которые входят в группу ГРБ, но не имеют тяжелых последствий для матери и ребенка и не входят в группу БАС. Межгрупповое сравнение не обнаружило значимых различий по АгАт(IgM), но выявило ряд значимых АгАт(IgG), которые отличались в норме и при беременности, осложненной ГАГ. Для всех антител активность связывания была выше при физиологической беременности, чем при беременности, осложненной ГАГ. Частичное совпадение по спектру антител, выявлено с умеренной ПЭ, в частности, совпадающие антитела выявлены к структурному дисахариду гиалуроновой кислоты (№164), производным лактозы (№ 220, 497, 293), производному дисахарида Le^C (№ 398) и глюкозамину (№ 22). Однако выявлен и уникальный для ГАГ спектр антител, представленный антителами к дисульфатированному производному лактозы (№ 176), GalNAcα-содержащим гликопептидам (№912, 918) (Таблица 35).

Таблица 35. Активность связывания анти-гликановых антител (IgG) при нормальной беременности и беременности, осложненной ГАГ на сроке после 34 недель



- изменения АгАТ у беременных с хронической артериальной гипертензией (ХАГ) (поздние сроки: после 34 недель)

Анализ межгрупповых различий АгАТ при нормальной беременности и осложненной ХАГ выявил значительные изменения спектров АгАТ обоих классов: IgM и IgG. Особенностью изменений АгАТ у пациенток с беременностью, осложненной ХАГ, является, в подавляющем большинстве, повышенная активность связывания АгАТ обоих классов с лигандами гликоципа, что отражает и их более высокую аффинность и повышенное содержание при осложненной беременности. Спектр АгАТ, по которым выявлены межгрупповые различия значительно более широкий, чем при других гипертензивных расстройствах во время беременности (Таблица 36, Таблица 37). В частности, анализ спектра АгАТ(IgM) показал, что часть антител, например, антитела специфичные к О-полисахариду *Sh. boydii* тип 7 (№2010) и к дисахариду - внутренней части N-цепей (№123) выявляются как значимые при тяжелой ПЭ, и их активность связывания также снижена по сравнению с нормой. Сниженная активность связывания АгАТ(IgM) выявлена для антител со специфичностью к ряду бактериальных О-полисахаридов (лиганды № 1018, 1404, 2006, 2008, 2102, 2220). Аналогично, сниженная активность связывания установлена для антител специфичных к моносахаридам N-ацетилманозамину и диметилглюкозе (лиганды № 19 и 27, соответственно). Напротив, значимо повышенная активность связывания АгАТ(IgM) выявлена к О-полисахариду *P. mirabilis* O58, а также к хитобиозе (№116), производным лактозамина (модифицированному дилактозамину (№ 375) и сульфатированным (№ 183, 184) и фосфорилированными (№191) производным лактозамина, глобозилцерамиду (№501), а также к гексаарабинозе (№506). Необходимо отметить, что повышенная активность связывания АгАТ(IgM) выявлена к ряду гликанов, в частности, гиалуроновой кислоте (№ 632) и дисахаридам альфа-хитобиозе и димеру GalNAcα (№800 и 818) (Таблица 37). Антитела аналогичной специфичности, но представленные иммуноглобулинами класса G, выявлялись в межгрупповых сравнениях при умеренной ПЭ, но их активность связывания была снижена.

Анализ спектра АгАТ(IgG) показал, что во всех случаях, для которых установлены значимые различия по АгАТ(IgG) при беременности, осложненной ХАГ (спектр при данном сравнении был самый широкий по сравнению с другими гипертензивными расстройствами), активность связывания антител была выше, чем при физиологической беременности (Таблица 36). Спектр выявленных АгАТ(IgG) при беременности, осложненной ХАГ, представлен антителами к бактериальным О-полисахаридам

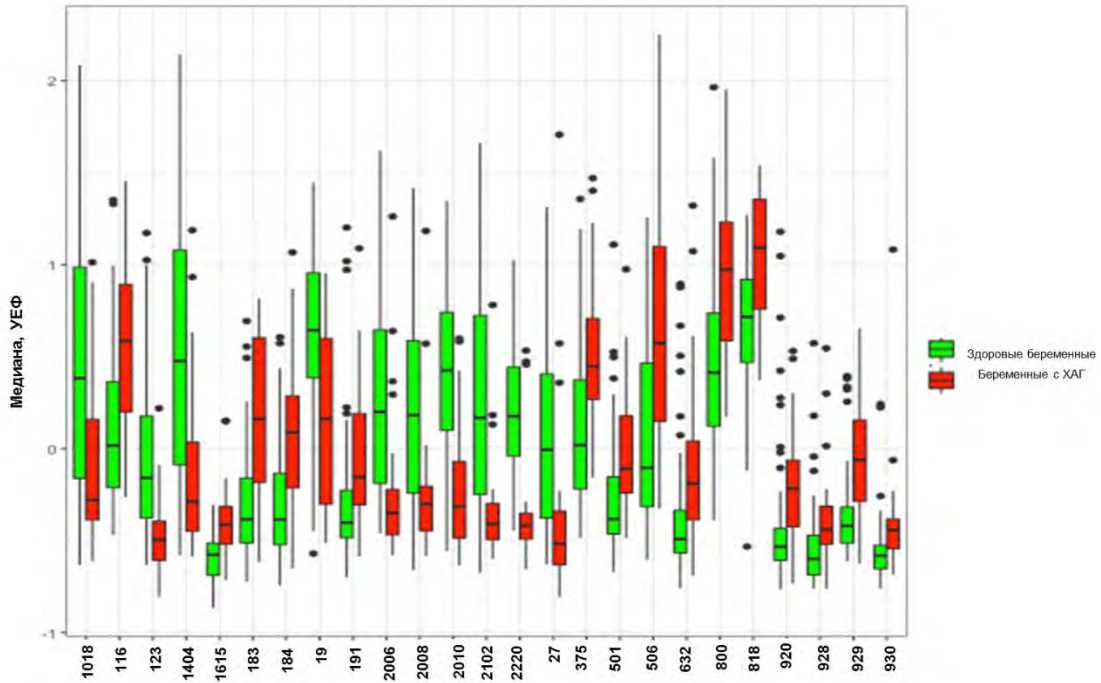
грамотрицательных бактерий (лиганды № 1019, 1024, 1307, 1409, 1411, 1605, 1608, 1609, 1618, 1702, 2202, 2203, 2221), антителами к гиалуроновой кислоте с разным числом дисахаридных звеньев (№ 625 и 632), бета-ацетилгалактозамину (№ 6) и его замещенным производным (№ 77 и 340), замещенным производным гликана Tn (№175, 232), сульфатированным производным лактозы (№ 146, 176, 269, 270), лактозамина (№181), и LacdiNAc (№ 192, 202), бета-фукозилированному N-ацетиллактозамину (№273), дисахариду Le^C с лактозамином в коре (№403), аминокислотным производным хитобиозы (№ 115, 117) и глюкозамина (№ 22), хитотриозе (№252), манно-гликану (№ 120), производным сиалиллактозы (№296 и 297), А-трисахарида (№277), дифукозилированному гликану LeB (№371), замещенному остатком N-ацетилгалактозамина трисахариду LeX (№371), фуранозному производному антигена Форссмана (№ 801), а также к глюкану (№9001), изомеру дисахарида TF (№ 816). Примечательно, что выявлена повышенная активность связывания АгАт обоих классов (IgM и IgG) к глобозилцерамиду (№501) при беременности на фоне ХАГ. Общими мишенями АгАт(IgG), которые значимо отличают норму от беременности на фоне ХАГ, и норму от умеренной ПЭ, являются О-полисахариды (№ 1605 и 1608) и гликаны № 22, 273, 296 и гиалуроновая кислота с числом мономеров (n=13) (№632). Гликаны № 22 и 176 также были выявлены в сравнениях физиологической беременности и ГАГ, как мишени для значимых АгАт(IgG).

Результаты данного раздела опубликованы в (Зиганшина М.М. и др., 2016а; Зиганшина М.М. и др., 2019; Шилова Н.В. и др., 2019; Шилова Н.В. и др., 2021; Ziganshina M.M. et al., 2016).

Таблица 36. Активность связывания анти-гликановых антител (IgG) при нормальной беременности и беременности, осложненной ХАГ на сроке после 34 недель

ID гликана	Короткое название	ID гликана	Короткое название	IBA АгАТ(IgG) в исследуемых группах
1019	<i>S. enterica</i> O44	232	LN6Tn	
1024	<i>C. sakazakii</i> G2356 O2	252	Ch3	
115	Ch2-Asn	268	Fa6Ch2	
117	Ch2-Gly	269	Gal3'Lac	
120	Ma3M	270	Gal4'Lac	
1307	<i>P. alcalifaciens</i> O22	273	Fb2LN	
1409	<i>P. aeruginosa</i> O2ac	277	NGcAtri	
1411	<i>P. aeruginosa</i> O2ad(F7)	296	6'SL-Gly	
146	Lac6Su	297	b6'SL	
1605	<i>P. mirabilis</i> O11	340	b6SiaTab	
1608	<i>P. mirabilis</i> O23	371	Leb	
1609	<i>P. mirabilis</i> O28	403	LeC3'LN	
1618	<i>P. mirabilis</i> OE	404	ANaLeX	
1702	<i>P. penneri</i> 113	501	Gb5	
175	bNeu5GcTn	6	bAN	
176	Lac3',6Su2	625	Гиалуроновая	
181	LN3'4'Su2	632	Гиалуроновая кислота	
192	LacdiNAc6Su	77	Tab	
202	LacdiNAc6,6'Su2	801	Fs(f)-2	
22	GN-Gly	816	Ab4ANa	
2202	<i>Sh. flexneri</i> type 2b	9001	Склероглюкан	
2203	<i>Sh. flexneri</i> type 3a	901	биотин	
2221	<i>Sh. flexneri</i> type Xv	911	N-C5-indazole	

Таблица 37. Активность связывания анти-гликановых антител (IgM) при нормальной беременности и беременности, осложненной ХАГ на сроке после 34 недель

ID гликана	Короткое название	IBA AgAT(IgM) в исследуемых группах
1018	<i>S. enterica</i> O51	
116	Ch2	
123	Mb4GN	
1404	<i>P. aeruginosa</i> O13ab	
1615	<i>P. mirabilis</i> O58	
183	LN4'6'Su2-C2	
184	LN4'6'Su2	
19	bMN	
191	LN6'P	
2006	<i>Sh. boydii</i> type 17	
2008	<i>Sh. boydii</i> type 2	
2010	<i>Sh. boydii</i> type 7	
2102	<i>Sh. dysenteriae</i> type 11	
2220	<i>Sh. flexneri</i> type Yv	
27	3,6-Me2Glc	
375	aLN3'LN	
501	Gb5	
506	Araf6	
632	Гиалуроновая кислота (n = 13)	
800	GNa4GN	
818	ANa4ANa	
920	Flab-1	
928	TmpA-2	
929	TmpA-3	
930	MUTK6	

3.10. Расчет сигнатур АгАТ для дифференциальной диагностики ГРБ

Для применения полученных данных к диагностике ПЭ был использован подход, в котором несколько показателей – в данном случае несколько АгАТ – объединяются, что позволяет достичь лучших диагностических характеристик. Такая комбинация диагностически значимых антител называется сигнатура антител (Зиганшина М.М. и др., 2018). В Таблице 38 представлены показатели диагностической ценности тестов, основанных на сигнатурах АгАТ классов М и G и соответствующие ROC-кривые.

Таблица 38. Характеристики диагностической ценности сигнатур, основанных на АгАТ. Для ROC-кривых по оси X приведена специфичность, по оси Y – чувствительность

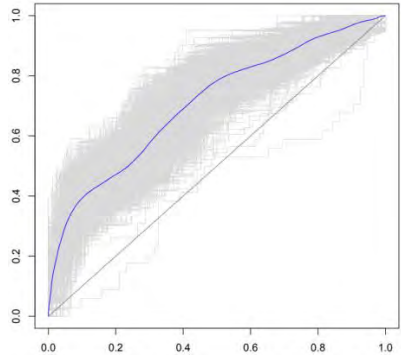
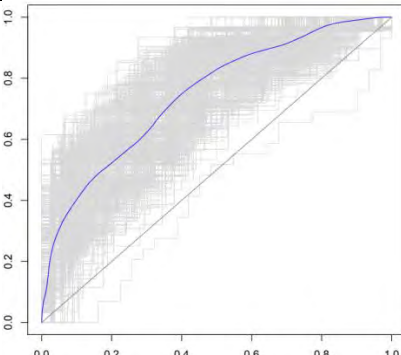
№	Состав сигнатуры: Формула лиганда, (идентификационный № (ID) лиганда, класс антител)	ROC-кривая	AUC*	Sp	Se
Общая выборка беременных, объединяющая нормальную и осложненную беременность исключая ПЭ сравнивалась с ПЭ (объединенной тПЭ и уПЭ): поздние сроки после 34 недель					
1	GlcNAc α 1-4GlcNAc β - (#800, IgM), GlcNAc α 1-4GlcNAc β - (#800, IgG), Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β -(#434, IgG)		0,71*	0,89	0,40
Беременные с нормальным течением гестационного периода сравнивались с беременными с умеренной ПЭ: поздние сроки после 34 недель					
2	Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β - (#497_IgG), Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β -(#434_IgG)		0,75	0,72	0,59

Таблица 38. Продолжение 1.

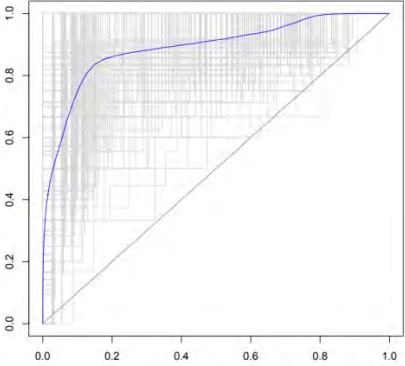
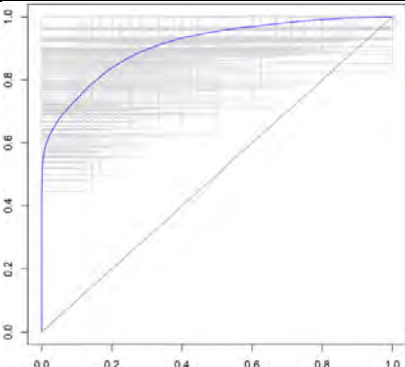
Беременные с нормальным течением гестационного периода сравнивались с беременными с тяжелой ПЭ: поздние сроки после 34 недель					
3	Man β 1-4GlcNAc β - (#123, IgM); Shigella boydii type 7 (#2010, IgM)		0,91	0,97	0,57
Беременные с умеренной ПЭ сравнивались с беременными с тяжелой ПЭ: поздние сроки после 34 недель					
4	(Glc α 1-6)3 β - (# 241, IgM); Proteus mirabilis O23 (№#1608, IgG)		0,91	0,6	0,93

Таблица 38. Продолжение 2.

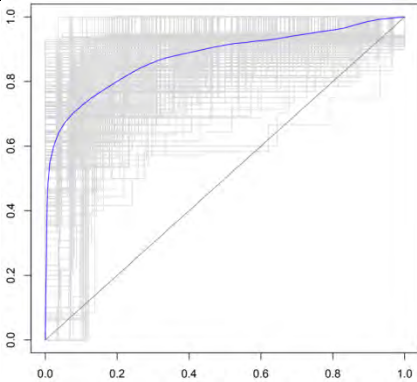
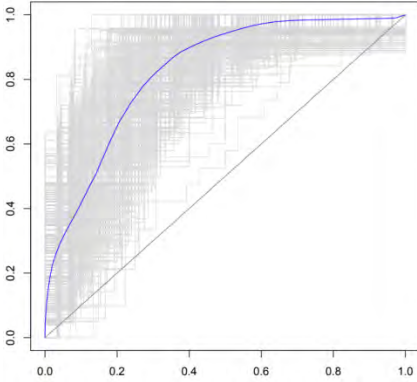
Беременные с умеренной ПЭ сравнивались с беременными с ХАГ: поздние сроки после 34 недель					
5	GalNH ₁ -3(Fuc α 1-2)Gal β -OCH ₂ CH ₂ CH ₂ NHAc (#237_IgG), Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β - (#434_IgG)		0,89	0,89	0,72
Беременные с умеренной ПЭ сравнивались с беременными с ЗРП: поздние сроки после 34 недель					
6	(Glc α 1-6) β - (# 241, IgM); Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β - (#434_IgG); Fuc β 1-2Gal β 1-4GlcNAc β - (#273_IgG)		0,83	0,77	0,71

Таблица 38. Продолжение 3.

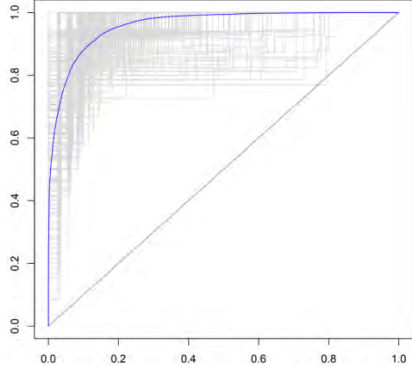
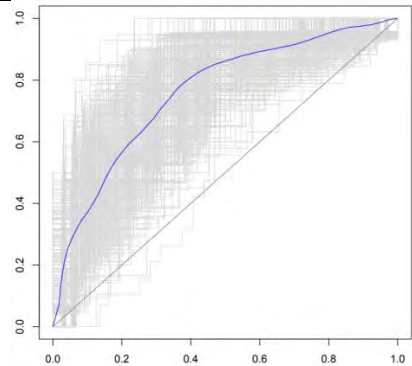
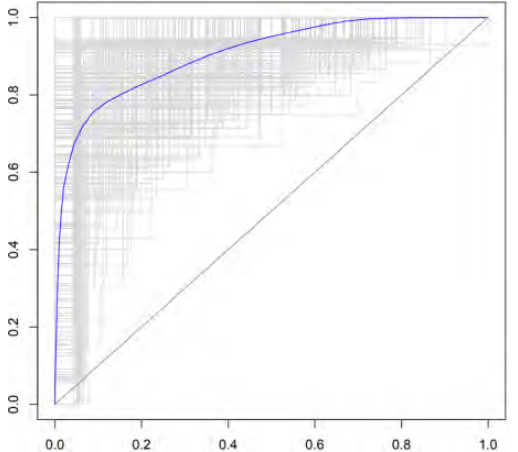
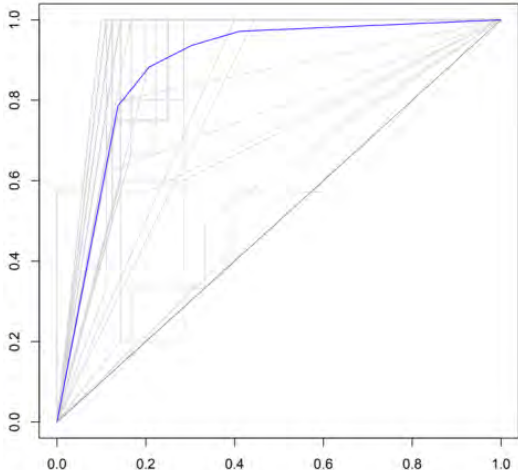
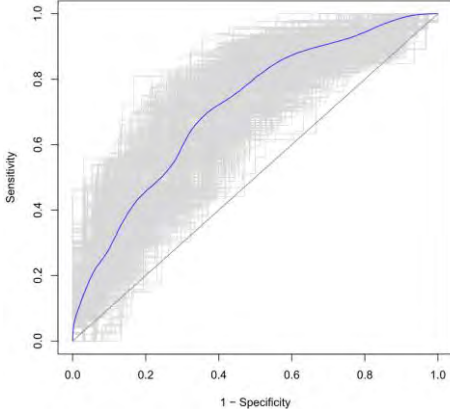
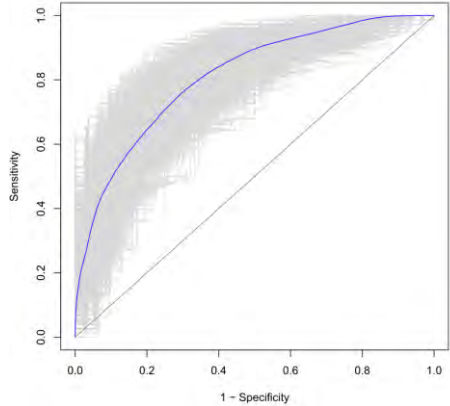
Беременные с нормальным течением гестационного периода сравнивались с беременными с ХАГ: поздние сроки после 34 недель					
7	<i>Shigella flexneri</i> Yv (#2220_IgM), <i>Shigella boydii</i> type 7 (#2010, IgM); Man β 1-4GlcNAc β - (#123, IgM);		0,96	0,94	0,82
Беременные с нормальным течением гестационного периода сравнивались с беременными с ГАГ: поздние сроки после 34 недель					
8	Gal α 1-3Gal β 1-4Glc β -(#220_IgG), GlcA β 1-3GlcNAc β -(#164_IgG)		0,76	0,85	0,47

Таблица 38. Продолжение 4.

Беременные с ГАГ сравнивались с беременными с ХАГ: поздние сроки после 34 недель					
9	<i>Shigella flexneri</i> Yv (#2220_IgM), Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ- (#403_IgG)		0,91	0,82	0,80
Беременные с нормальным течением гестационного периода сравнивались с беременными с тяжелой ПЭ: ранние сроки до 34 недель					
10	Galβ1-4GlcNAcα-(#139_IgM), <i>Shigella flexneri</i> type 3b (#2204_IgG)		0,93	0,88	0,83

Беременные с нормальным течением гестационного периода сравнивались с беременными с ПЭ (объединяющей уПЭ и тПЭ): поздние сроки после 34 нед					
11	Fucα1-2Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ (#497_IgG), PEKAFRELC(# 908_IgG)		0,71	0,53	0,76
Беременные с нормальным течением гестационного периода сравнивались с объединенной выборкой беременных с гипертензивными расстройствами при беременности: поздние сроки после 34 нед					
12	<i>Shigella boydii</i> type 7 (#2010_IgM), Galβ1-3GlcN(Fm)β1-3Galβ1-3GlcNAcβ- (#398_IgM), CGGRSPKSSMNEEGASR(# 928_IgM), 3-O-Su-GalNAcα-(# 61_IgM), Galβ1-4Glcβ-sp4-Trp (#128_IgM), KDNα2-3Galβ1-4GlcNAcβ (#308_IgM), GlcAβ1-3GlcNAcβ (#164_IgG)		0,81	0,52	0,89

* полужирным шрифтом выделены значения показателей $>0,7$; Sp – специфичность; Se – чувствительность.

Сигнатуры №1 и №2 получены в соавторстве с Тютюнник Н.В.

3.11 Репертуар АгАТ пуповинной крови здоровых новорожденных и новорожденных с перинатальной патологией

На следующем этапе было проведено исследование АгАТ в пуповинной крови новорожденных. При поздней ПЭ отмечается достаточно высокая частота развития неонатальной патологии, вследствие этого рассматривалась возможность поиска предикторов тяжести течения раннего неонатального периода. Были проанализированы спектры АгАТ пуповинной крови здоровых новорожденных от матерей с физиологической и осложненной ПЭ беременностью и новорожденных с перинатальной патологией от матерей с ПЭ. Анализ полученных результатов показал, что в пуповинной крови отсутствуют АгАТ(Ig M) – величина ИВА лиганда с антителом, отражающая содержание антител в крови не превышала уровень фона, т.е. сигнала от контрольного сайта, не содержащего лиганд. Напротив, при детекции АгАТ(Ig G) в пуповинной крови установлено их значительное количество. Причем выявляется как изменения спектра АгАТ(Ig G), так и их относительного содержания. Расчет корреляционных связей между уровнем АгАТ(Ig G) одинаковой специфичности в пуповинной крови и периферической крови матери выявил наличие прямых сильных связей, что демонстрирует материнское происхождение этих антител у новорожденного ($r_s \approx 0,9$; $p < 0,05$ с учетом поправки на множественность данных) для 400 антител, исследованных методом гликановых эрреев).

- Сопоставление репертуаров АгАТ(Ig G) у новорожденных от матерей с физиологической и осложненной развитием поздней ПЭ беременностью

Было проведено сопоставление топовых АгАТ(IgG) в пуповинной крови (критерием отбора явились значения ИВА – от максимального к минимальному). Сопоставление проводилось по отношению к значениям ИВА у новорожденных от физиологической беременности. Сравнение значений ИВА этих антител между группами новорожденных показало, что антитела указанных специфичностей (Рисунок 67) присутствуют в крови всех пациентов, однако различия выявляются по их содержанию в пуповинной крови. Т.е. по качественным показателям репертуар АгАТ(IgG) у новорожденных разных клинических групп демонстрирует совпадение, но различия касаются количественного содержания этих антител в крови (Рисунок 67).

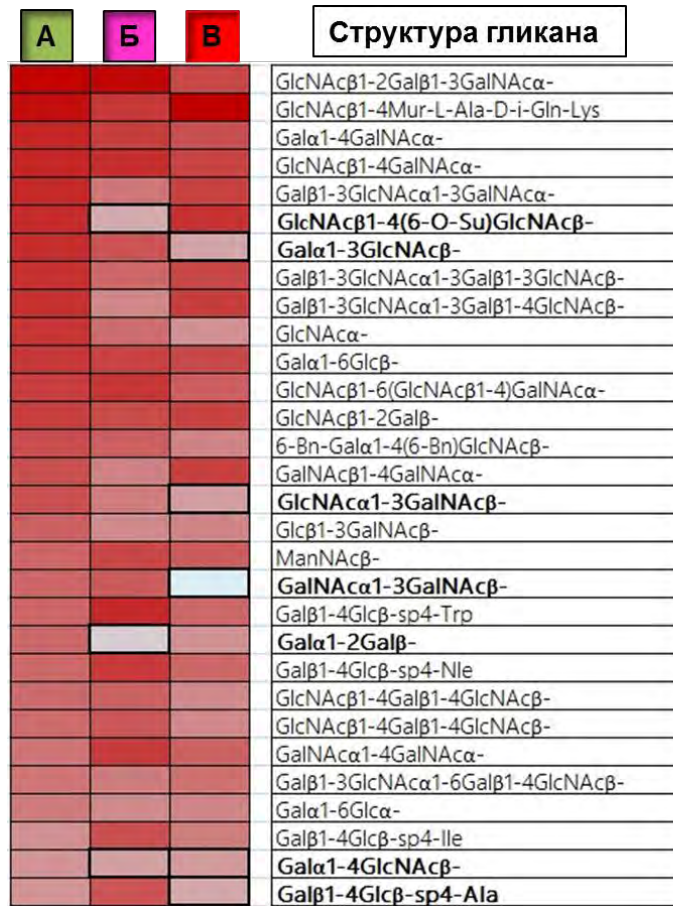


Рисунок 67. Тепловая карта, демонстрирующая изменения значений медианы индекса активности связывания топовых AgAT(IgG) в пуповинной крови здоровых младенцев и младенцев с перинатальной патологией.

А – здоровые новорожденные от матерей с физиологической беременностью; Б – здоровые новорожденные от матерей с ПЭ; В – новорожденные с перинатальными осложнениями от матерей с ПЭ.

Выделены структуры гликанов, связывающихся с антителами, содержание которых значительно отличается от группы А.

Данные получены совместно с Долгополовой Е.Л (Долгополова Е.Л., 2023).

- Содержание AgAT(IgG) в пуповинной крови здоровых новорожденных, рожденных от матерей с физиологической беременностью и осложненной развитием nПЭ

Анализ содержания антител пуповинной крови показал, что значимых различий между группами (с учетом поправки на множественность данных) выявлено не было. На Рисунке 68 представлены антитела, которые при межгрупповых сравнениях имели $p < 0,05$, однако с учетом указанного выше, являются погранично значимыми и их изменение отражает тенденцию, свидетельствующую об их более низком содержании в крови новорожденных, рожденных от матерей с nПЭ. Т.е. эти антитела имеют потенциальный интерес, но их значимость должна быть подтверждена в последующих исследованиях при

увеличении выборки. Среди потенциально значимых антител можно отметить АгАТ, которые связываются с гликанами № 24 и 149, которые представляют собой структурные фрагменты бактериальных полисахаридов (№149 – фрагмент пептидогликана). Гликан №137 – является синтетическим лигандом, миметиком фрагмента мембраны клеток млекопитающих.

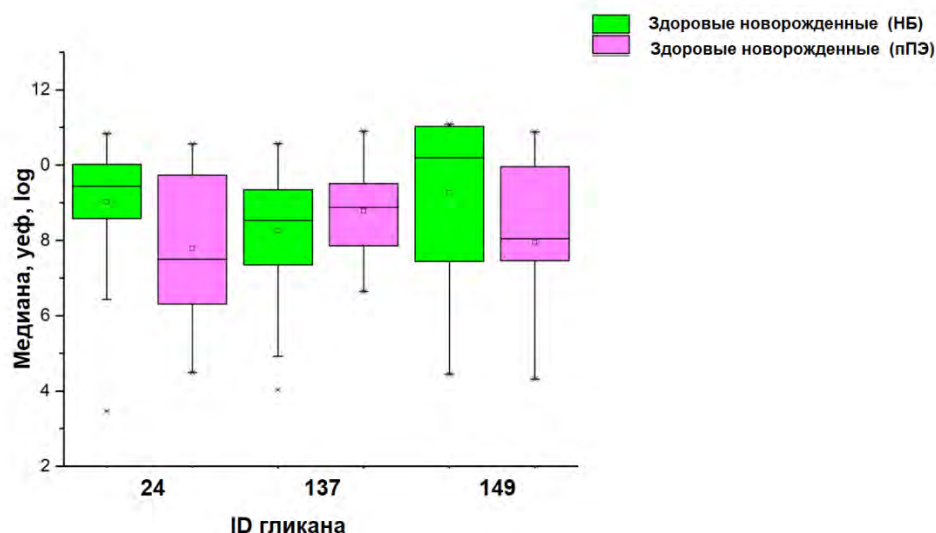


Рисунок 68. Содержание АгАТ(IgG) пуповинной крови у здоровых младенцев от матерей с физиологической беременностью и беременностью, осложненной поздней ПЭ. Данные приведены по погранично значимым антителам ($p < 0,05$).

№24 GlcNAc α -sp;

№137 Gal β 1-4Glc β -sp-Nle;

№ 149 GlcNAc β 1-4(6-O-Su)GlcNAc β -sp

sp* –аминоэтильный, аминопропильный или глицильный спейсер

- Содержание АгАТ(IgG) в пуповинной крови здоровых новорожденных, рожденных от матерей с физиологической беременностью, и новорожденных с перинатальной патологией от матерей с пПЭ

При сравнении АгАТ(IgG) выявлены значимые отличия по 2 антителам из 400 исследованных (Рисунок 69, отмечены рамкой), которые прошли поправку на множественность данных. АгАТ к лигандам № 101, 278, 537, 142 и 376 в сравнениях имели $p < 0,05$ (без поправки на множественность данных), вследствие этого они имеют пограничный уровень значимости и их изменения демонстрируют тенденции к более низкому содержанию у новорожденных с перинатальной патологией от матерей с пПЭ. Значимые антитела связываются с гликанами № 512 – альфа аналог линейного А-антигена системы групп крови человека АВ0 и № 101 – ксеноантиген – дисахарид Форссмана.

АгАТ(IgG), имеющие пограничный уровень значимости, связываются с гликанами № 102 (минимальный фрагмент А-антигена) и № 537 и №376 (олигосахариды молока человека), а также с ксеноантигенами №278 (трисахарид Форссмана) и №142 - синтетический лиганд, Glc-аналог дисахарида Форссмана; Примечательно, что АгАТ(IgG) к дисахариду Форссмана были выявлены в межгрупповых различиях при сравнении содержания пАгАТ(IgG), выделенных из тканей плаценты здоровых беременных и беременных с пПЭ, где они демонстрировали более низкое содержание в элюатах беременных с ПЭ (Рисунок 39).

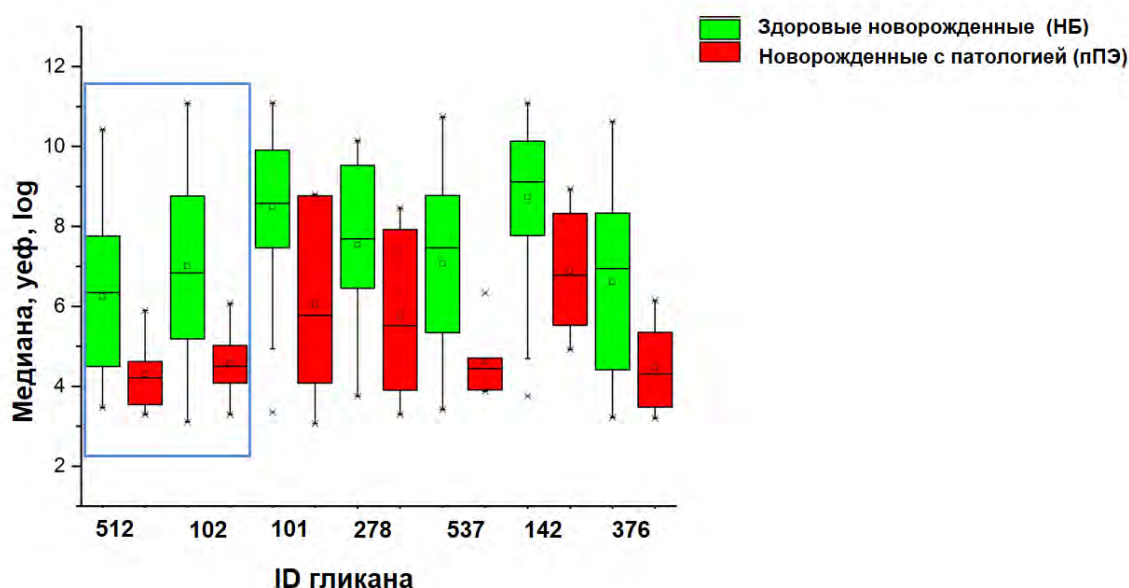


Рисунок 69. Содержание АгАТ(IgG) пуповинной крови у здоровых младенцев от матерей с физиологической беременностью и младенцев с перинатальными осложнениями от матерей с пПЭ. Значимые антитела отмечены синей рамкой ($p < 0,00017$).

№ 512 GalNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp;

№ 101 GalNAc α 1-3GalNAc β -sp;

№ 102 GalNAc α 1-3Gal β -sp;

№ 278 GalNAc α 1-3GalNAc β 1-3Gal β -sp;

№ 537 Neu5Aa2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β -sp;

№ 376 Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β -sp;

№ 142 GlcNAc α 1-3GalNAc β -sp

sp* –аминоэтильный, аминопропильный или глицильный спейсер

- Содержание АгАТ(IgG) в пуповинной крови здоровых новорожденных и новорожденных с перинатальной патологией, рожденных от матерей с поздней ПЭ

Значимые различия между указанными группами установлены по 2 АгАТ(IgG) из 400 исследованных, с учетом поправки на множественность (Рисунок 70, отмечены

рамкой). Содержание антител было сниженным у новорожденных с перинатальной патологией. Антитела связывались с дисахаридом Форссмана (лиганд №101) и минимальным фрагментот А-антигена системы групп крови человека АВ0 (лиганд № 102), о которых упоминалось выше. Также у новорожденных с перинатальной патологией была выявлена тенденция к более низкому содержанию АгАТ(IgG) к гликанам № 537, 383, 479 (олигосахариды молока, причем последний является также фрагментом антигенов групп крови Н и АВ0 человека) и ксеноантигенам: № 278 (трисахариду Форссмана о котором упоминалось выше) и № 481 (пентасахариду Галили). Последний имеет в своем составе Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β (трисахарид Галили), антитела к которому были выделены из тканей плаценты здоровых беременных и беременных с пПЭ и их мишени были идентифицированы в тканях плаценты (Рисунок 53).

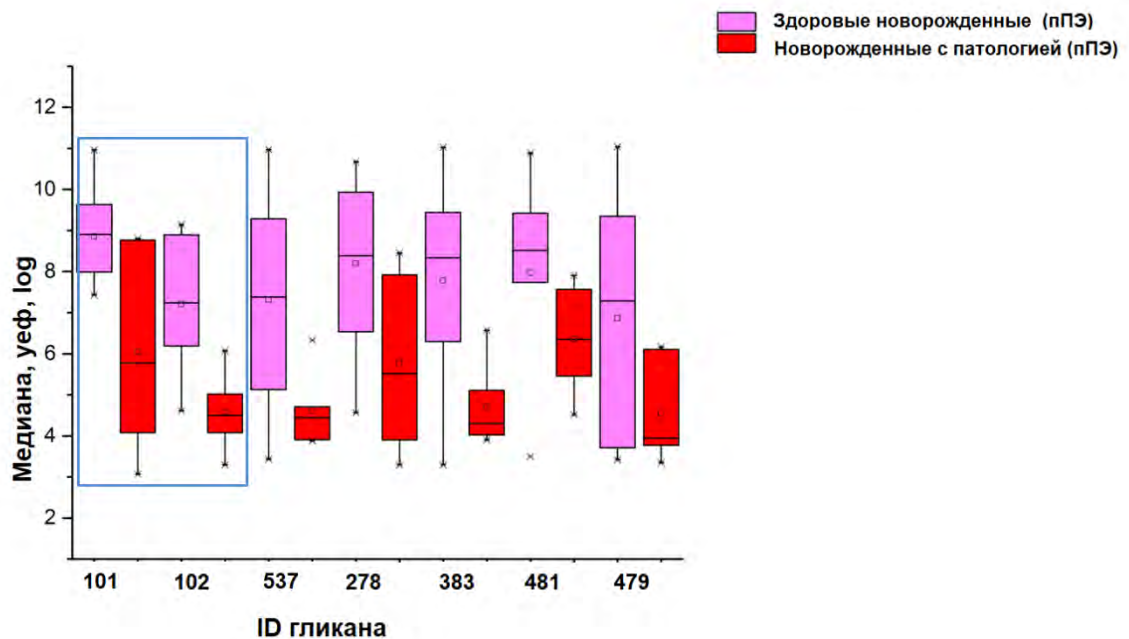


Рисунок 70. Содержание АгАТ(IgG) пуповинной крови у здоровых младенцев и младенцев с перинатальными осложнениями от матерей с беременностью, осложненной поздней ПЭ. Значимые антитела отмечены синей рамкой ($p < 0,00017$).

№ 101 GalNAc α 1-3GalNAc β -sp;

№ 102 GalNAc α 1-3Gal β -sp;

№ 537 Neu5Aa2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β -sp;

№ 278 GalNAc α 1-3GalNAc β 1-3Gal β -sp;

№ 383 Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β -sp;

№ 481 Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β -sp;

№ 479 Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β -sp

sp* –аминоэтильный, аминопропильный или глицильный спейсер

- Корреляционные связи между активностью связывания АгАТ (IgG) пуповинной крови и клинико-лабораторными параметрами беременных и их новорожденных в исследуемых группах

Было выявлено значительное число корреляционных связей. С учетом небольшого объема выборки были отобраны пары показателей с коэффициентом корреляции r_s не менее 0,900 и $p < 0,005$, что соответствует высокосignificantным корреляционным связям высокой силы.

В когорте здоровых новорожденных от матерей с физиологической беременностью корреляционных связей, соответствующих заявленным критериям, выявлено не было.

Анализ корреляционных связей в когорте здоровых младенцев от матерей с ПЭ выявил сильные связи между содержанием АгАТ(IgG) ряда специфичностей и клинико-лабораторными параметрами новорожденных и их матерей. Значительное число обратных корреляционных связей выявлено между уровнем антител и возрастом беременной, балльной оценкой новорожденного по Апгар, содержанием лимфоцитов и глюкозы в крови (Рисунок 71). Прямые связи выявляются между уровнем АгАТ(IgG) и содержанием лейкоцитов и нейтрофилов. Отличительной особенностью этой когорты является связь АгАТ(IgG) с показателями крови, отражающими проявление воспалительной реакции у беременной, глюкозотолерантности и маркерами, отражающими функционирование печени. Из маркеров периферической толерантности отмечается наличие обратной связи между уровнем АгАТ(IgG) к гликану №819 (Glc β 1-4GalNAc α -) и уровнем экспрессии гена *TGF β* в ткани плаценты. Тепловая карта, демонстрирующая корреляционные связи в данной группе представлена на Рисунке 71.

“В когорте новорожденных с перинатальной патологией от матерей с ПЭ выявлено максимальное число высокосignificantных корреляционных связей. Так, уровень представительного числа АгАТ(IgG) имеет сильные прямые корреляционные связи с клинико-лабораторными показателями матери: возрастом, значением диастолического давления, содержанием лейкоцитов, лимфоцитов, нейтрофилов, тромбоцитов, Д-димером, глюкозы, АСТ, АЛТ в крови. 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. Аналогично, лимфоцитоз, высокие значения артериального давления и биохимических показателей крови, отражающие нарушения в функционировании органов-мишеней ПЭ являются следствием развития патологии в системе мать-плацента-плод и, следовательно, связанные с ними АгАТ(IgG) имеют патогенетическое значение. Для данной когорты выявлен спектр АгАТ(IgG), которые позитивно сильно коррелируют с показателями балльной оценки новорожденного по шкале Апгар. Подобный корреляционный анализ на схожей выборке был нами проведен ранее

и получены похожие данные, что подтверждает их патогенетическое значение” (Долгополова Е.Л., 2023). Данный фрагмент получен в соавторстве с Долгополовой Е.Л (Долгополова Е.Л., 2023). Примечателен факт, что в данной когорте выявляется спектр АгАТ(IgG), уровень которых коррелирует как с содержанием в крови иммуно-гормональных факторов, регулирующих гликозилирование, так и с уровнем экспрессии мРНК генов регулирующих периферическую толерантность в плаценте. Подобные связи не выявляются в других когортах. Особенности корреляционных взаимосвязей между АгАТ(IgG) и клиническими и иммуно-биохимическими показателями периферической, пуповинной крови и плаценты могут свидетельствовать о нарушении механизмов формирования толерантности к плоду и развитии патологии у новорожденного, что может быть значимо для предикции неонатальных исходов и осложнений в раннем неонатальном периоде по спектру выявляемых антител при рождении. Тепловая карта, демонстрирующая корреляционные связи в данной группе представлена на Рисунке 72. Результаты данного раздела опубликованы в (Зиганшина М.М. и др., 24; Шилова Н.В. и др., 2020; Шилова Н.В. и др., 2021).

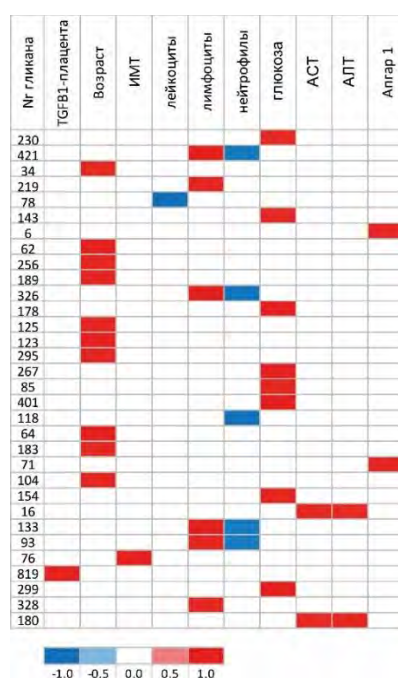


Рисунок 71. Тепловая карта, демонстрирующая корреляционные связи между активностью связывания АГАТ(IgG) пуповинной крови здоровых новорожденных от матерей с пПЭ. По ОУ представлен № ID гликана (список в Приложении), с которым связывается АГАТ(IgG); по ОХ – параметры, исследованные у матери, новорожденного и в тканях плаценты. Представлены только высокосвязные связи $r_s > 0,900$; $p < 0,005$, рассчитанные с учетом поправки на множественность данных.

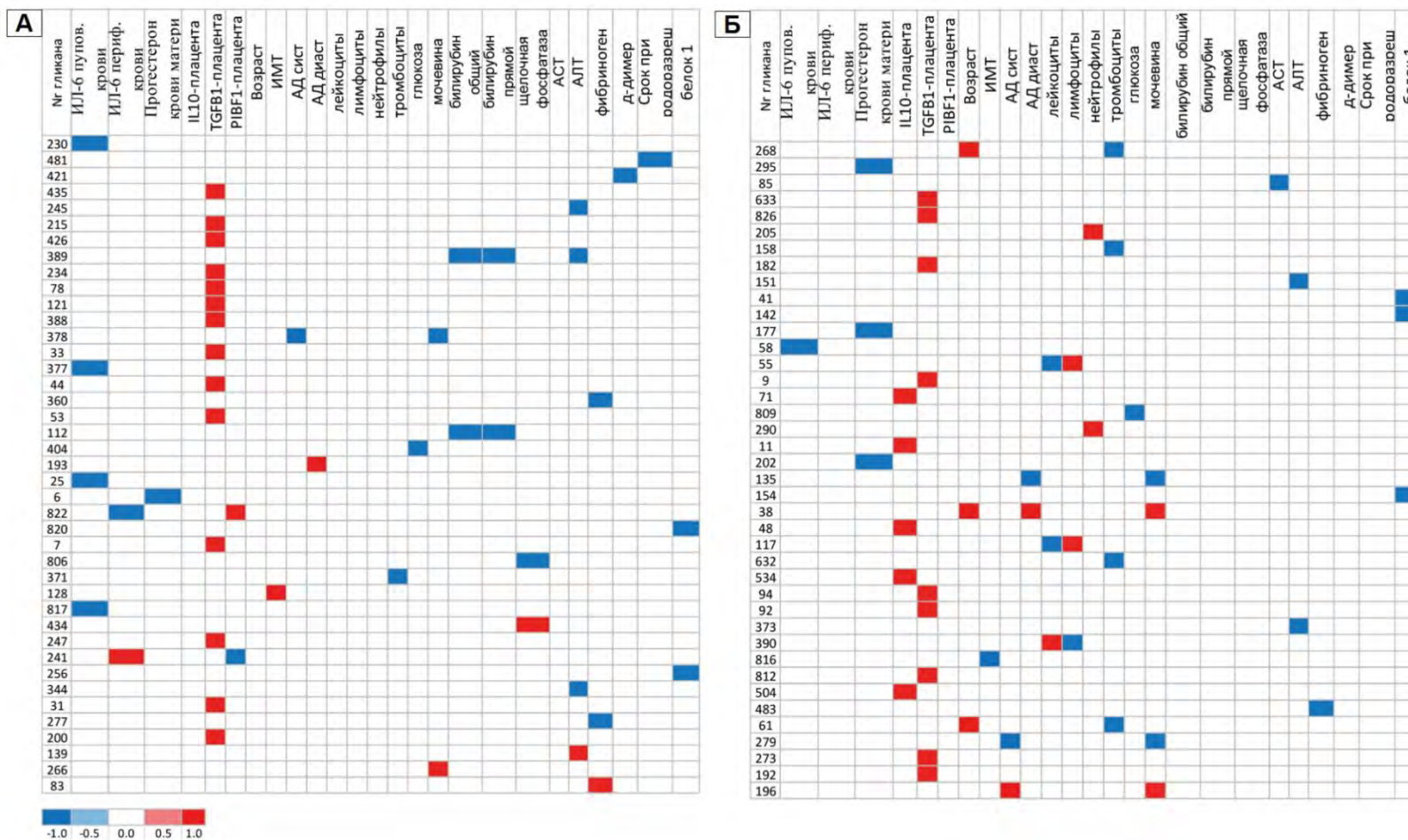


Рисунок 72. Тепловая карта, демонстрирующая корреляционные связи между активностью связывания АГАТ(IgG) пуповинной крови новорожденного с перинатальными осложнениями от матерей с пПЭ. По ОУ представлен № ID гликана (список в Приложении), с которым связывается АГАТ(IgG); по ОХ – параметры, исследованные у матери, новорожденного и в ткани плаценты. Представлены только высокосвязные связи $rs > 0,900$; $p < 0,005$, рассчитанные с учетом поправки на множественность данных.

3.12. Расчет сигнатур АгАТ для предикции состояния здоровья новорожденного

Для предикции рождения ребенка с перинатальной патологией (по периферической крови матери) и тяжелого течения раннего неонатального периода (по пуповинной крови) был использован сигнатурный подход, который основан на выборе комбинации исследуемых АгАТ(IgM) и АгАТ(IgG) матери и новорожденного, сочетание которых дают максимальные значения модели прогноза и показателей диагностической ценности теста. Расчет сигнатур производился с учетом: 1) развития перинатальной патологии у новорожденного (критерием был диагноз новорожденного), рожденного у матерей с ПЭ; 2) тяжести течения раннего неонатального периода, критерием было количество дней, проведенных новорожденным в ОИТиР. Т.е. при поиске сигнатур учитывался исход беременности как для матери, так и для новорожденного.

С помощью генетического алгоритма с методом оптимизации Тагучи (как описано в п. 2.3.5. “Материалов и Методов”) были найдены комбинации диагностически значимых признаков - сигнатуры из показателей (Таблица 39, Таблица 40) - с максимальными показателями качества классификации. Суть метода заключается в том, что данные отображаются в бесконечномерное пространство, в котором рассматриваемые группы линейно разделимы. Метод также позволяет искать также нелинейные зависимости и строить «кривые» разделяющие плоскости, что делает его пригодным для применения к выборкам небольшого объема. Полученные ROC-кривые для сравниваемых групп представлены на Рисунке 73.

Таблица 39. Идентификационные номера и структуры гликанов, антитела к которым входят в состав диагностической сигнатуры по периферической крови матери, предсказывающей перинатальный исход у новорожденного, рожденного на сроках > 34 недель беременности

Состав сигнатуры антител: Класс антител № (ID) гликана	Структура гликана	Короткое название гликана
IgG_167	GlcNAc β 1-4-(HOOC(CH ₃)CH)-3-O-GlcNAc β -sp	GN-Mur
IgG_264	Gal β 1-4Gal β 1-4GlcNAc β -sp	Ab4'LN
IgG_378	Gal β 1-3GlcNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp	LeCa3'LN
IgG_80	Gal α 1-3GlcNAc β -sp	Aa3GN
IgM_174	Neu5Gc α 2-6GalNAc α -sp	Neu5GcTn

Состав сигнатуры антител: Класс антител № (ID) гликана	Структура гликана	Короткое название гликана
IgM 181	3,4-O-Su2-Gal β 1-4GlcNAc β -sp	LN3'4'Su2
IgM 245	GlcNAc α 1-6Gal β 1-4GlcNAc β -sp	GNa6'LN
IgM 252	GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β -sp	Ch3
IgM 334	Neu5Gc α 2-3Gal β 1-4(6-O-Su)GlcNAc β -sp	3'SLN(Gc)6Su
IgM 89	Gal β 1-3GalNAc α -sp	TF
IgM 82	Gal α 1-4GlcNAc β -sp	aLN-PEG
Примечание: sp* –аминоэтильный, аминопропильный или глицильный спейсер		

Сигнатура АгАТ, рассчитанная по материнской крови состоит из 11 антител, из которых 4 АгАТ(IgG) и 7 АгАТ(IgM). Характеристики диагностической ценности модели: AUC=0,931; Чувствительность 1,0; Специфичность 0,833 (Рисунок 73 А).

Таблица 40. Идентификационные номера и структуры гликанов, антитела к которым входят в состав диагностической сигнатуры по пуповинной крови новорожденного, предсказывающей течение раннего перинатального периода у новорожденного, рожденного на сроках > 34 недель беременности

Состав сигнатуры антител: Класс антител № (ID) гликана	Структура гликана	Короткое название гликана
IgG 142	GlcNAc α 1-3GalNAc β -sp	GNa3AN
IgG 138	Gal β 1-4Glc β -sp-Val	Lac-Val
IgG 808	Gal α 1-6Glc β -sp	Aa6G-C3
IgG 80	Gal α 1-3GlcNAc β -sp	Aa3GN
IgG 817	GalNAc β 1-4GalNAc α -sp	ANb4ANa
IgG 136	Gal β 1-4Glc β -sp-Ile	Lac-Ile
IgG 256	GlcNAc β 1-6(GlcNAc β 1-4)GalNAc α -sp	GN2-4,6Tn
IgG 278	GalNAc α 1-3GalNAc β 1-3Gal β -sp	Fs-3
Примечание: sp* –аминоэтильный, аминопропильный или глицильный спейсер		

Сигнатура АгАТ, рассчитанная по пуповинной крови состоит из 8 АгАТ(IgG).
Характеристики диагностической модели: AUC=0,833; Чувствительность 0,875;
Специфичность 0,875 (Рисунок 73 Б).

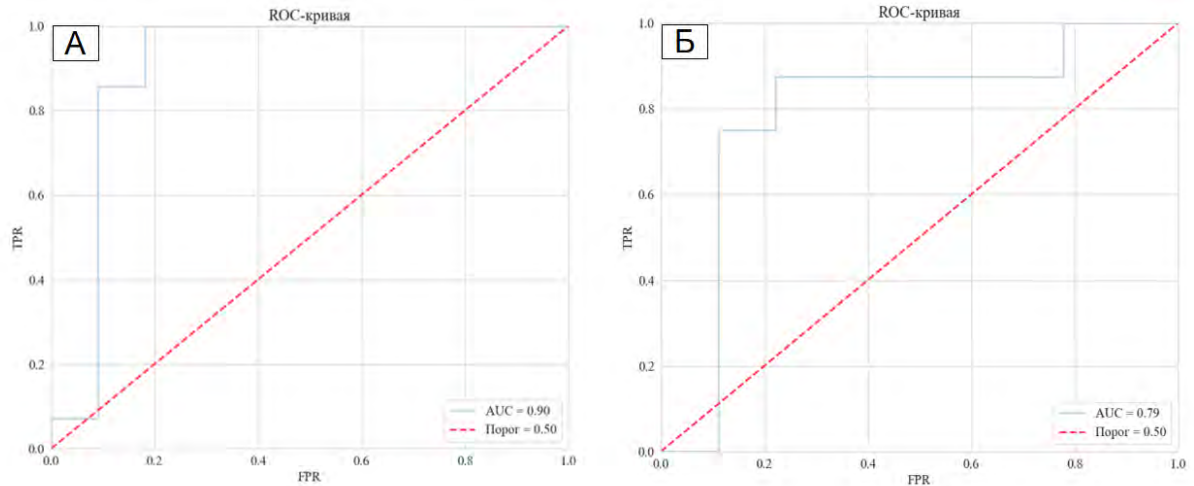


Рисунок 73. ROC-кривая, иллюстрирующая результаты бинарной классификации сигналов с положительными и отрицательными исходами у (А) беременных на сроках беременности > 34 недель; (Б) – новорожденных на сроках беременности > 34 недель. Зависимая переменная – здоровье новорожденного (1 - здоров, 0 - болен). Положительный исход: ребенок здоров; отрицательный исход: ребенок болен.

3.13. Характеристика профилей специфичности галектинов человека

Исследование спектров АгАТ в периферической крови матери и пуповинной крови младенца показало, что значительное число лигандов АгАТ, являются Gal β -терминированными гликанами. Для выявления одинаковых лигандов для АГАТ и галектинов проводилось исследование специфичности последних на гликочипе. Полученные результаты представлены в виде относительной интенсивности флуоресценции, RFU, для каждого лиганда, показавшего связывание выше фонового уровня.

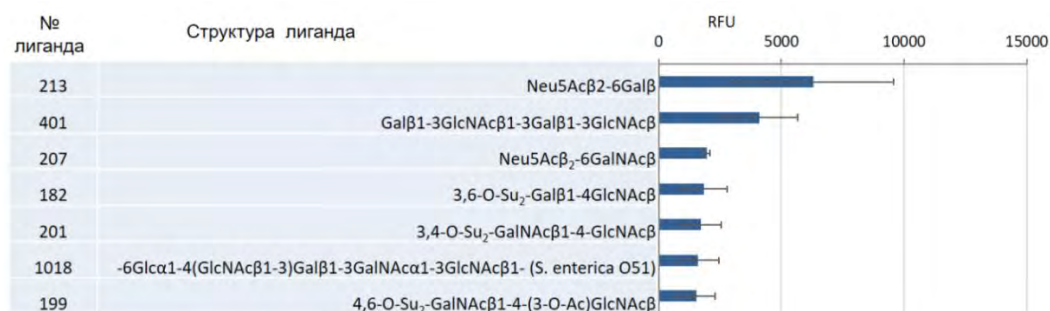


Рисунок 74. Профиль специфичности галектина-1 человека.

В профиле специфичности Гал-1 (Рисунок 74) преобладают замещенные производные сиаловой кислоты (лиганд №213, 207), лактозамина (№182), диацетиллактозамина (№199, 201), дисахарида LeC (№401) и фрагменты О-полисахарида *S. enterica* (№1018).

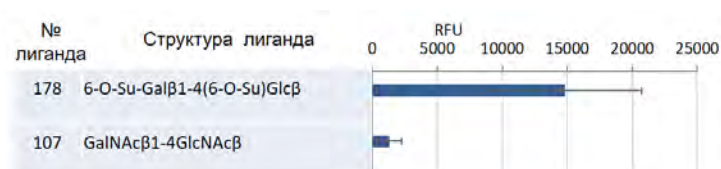


Рисунок 75. Профиль специфичности галектина-2 человека.

При исследовании специфичности Гал-2 обнаружен узкий профиль специфичности, представленный гликанами ди-N-ацетиллактозамином (№107) и дисульфатированным производным лактозы (№178) (Рисунок 75).



Рисунок 76. Профиль специфичности галектина-3 человека.

В профиле специфичности Гал-3 (Рисунок 76) представлены производные лактозамина (№ 534, 420, 480, 498, 375, 384, 379, 250, 383), дисахарида LeC (№ 267, 401), группоспецифических антигенов крови (№ 368, 360, 359), а также установлено связывание с пентасахаридом Галили (№481) и лактозным производным гликана LeY (№ 497).

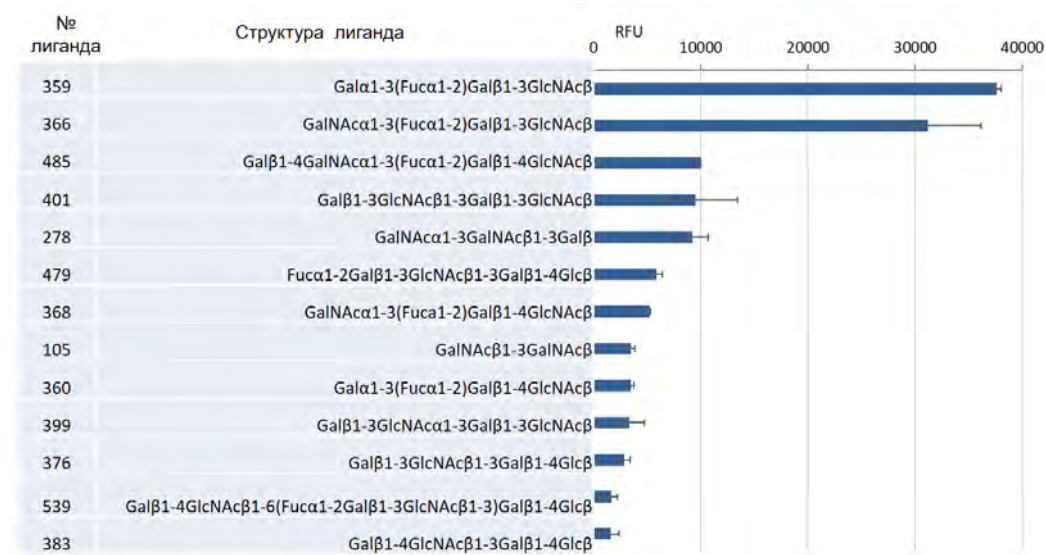


Рисунок 77. Профиль специфичности галектина-4 человека.

Гал-4 (Рисунок 77) преимущественно связывается с группоспецифическими антигенами крови - тетрасахаридами А и В с цепями типа 1 (№ 366 и 359, соответственно); более низкая активность связывания выявлена с тетрасахаридами А и В с цепями типа 2 (№ 368 и 360, соответственно). В профиле специфичности присутствуют также производные лактозамина (№ 485 и 376), дисахарида LeC (№ 399, 401), антигена Форссмана (№278) и пара-Форссмана (№ 105), гликаны с лактозным остатком в коре (№479, 539, 383).

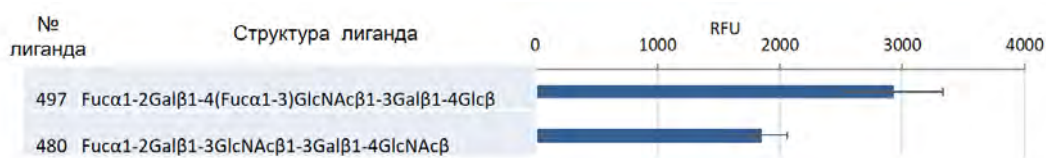


Рисунок 78. Профиль специфичности галектина-7 человека.

Гал-7 связывается с двумя лигандами: лактозным производным гликана LeY (№ 497) и гликаном Н тип 1 с остатком лактозамина (№ 480) (Рисунок 78).



Рисунок 79. Профиль специфичности галектина-8 человека.

Высокая активность связывания Гал-8 выявлена с сиалированными гликанами – производными LeC и антигена Томсена-Фриденрайха (№335, 333, 331, 299, 307, 292), полилактозамином (№ 498), группоспецифическими гликанами с цепями типа 1 и 2 (№ 366, 368, 359, 360). В профиль специфичности Гал-8 также входят сульфатированные производные LeC и лактозы (№ 307, 154, 176), трисахарид Форссмана (№278), а также углеводные компоненты гликолипидов (№ 434, 536, 547, 152, 383) и альфа-связанный олигосахарид женского молока (№407) (Рисунок 79).

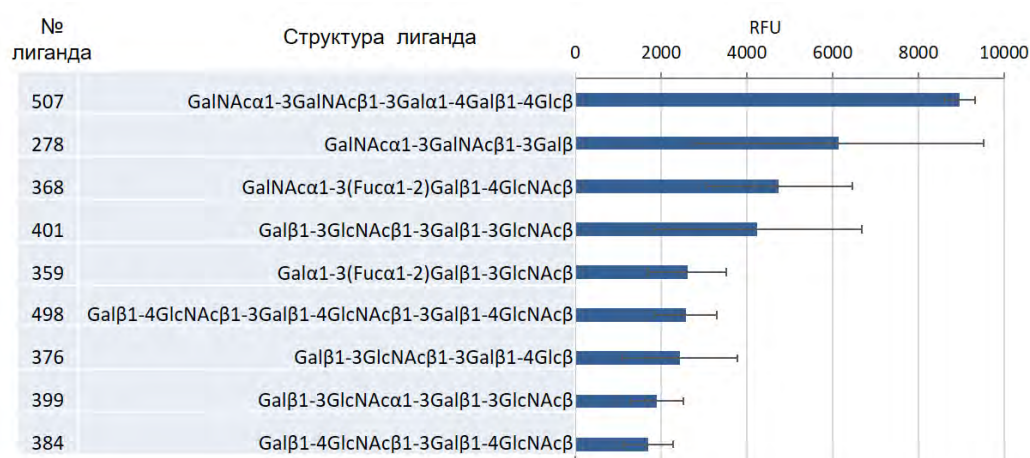


Рисунок 80. Профиль специфичности галектина-9 человека.

Высокая активность связывания Гал-9 выявлена с гликанами, содержащими антиген Форссмана – пента- и трисахарид (№ 507 и 278, соответственно), группоспецифическим антигеном крови А с кором типа 2 (№ 368) и В с кором типа 1 (№ 359), производными LeC (№ 401, 388, 399), лактозамина (№ 498, 384) и лактозы (№376) (Рисунок 80).

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

Наиболее представительный спектр гликанов, по которым выявлено совпадение специфичности для галектинов и АгАТ, установлен при сравнении пациенток с ХАГ с другими группами на поздних сроках беременности. Вероятно, конкуренция АгАТ и галектинов за связывание с гликанами может преимущественно развиваться при беременности, осложненной хронической гипертензией.

Анализ мишеней, с которыми связывались углевод-связывающие белки на эррее, позволил установить, что общими лигандами АгАТ, выявленных в сравнении пациенток с физиологической беременностью и осложненной ГАГ и галектинов, являются сульфатированная лактоза и гексасахарид Le^Y. Сиалилированная и дисиалированная лактоза являются общими лигандами галектинов и АгАТ, выявленных при сравнении пациенток с нормальной беременностью и осложненной развитием умеренной ПЭ. При сравнении пациенток с беременностью, осложненной ГАГ и протекающей на фоне ХАГ, общими лигандами галектинов и АгАТ являются сульфатированные лактоза и ди-N-ацетиллактозамин, а также нейтральные гексасахарид Le^Y и дисахариды пара-Форссман. Общие лиганды для галектинов и АгАТ, выявляемые при сравнении пациенток с беременностью осложненной умеренной ПЭ и протекающей на фоне ХАГ, являются пентасахариды Н тип 1, Форссмана и Галили, гексасахарид Le^Y, тетрасахариды лакто-N-(нео)тетраоза и сульфатированный N-ацетиллактозамин и дисиалилированная лактоза (GD3). В межгрупповом сравнении пациенток с беременностью на фоне ХАГ и здоровых беременных выявлены лиганды: сиалилированная лактоза, тетрасахарид с терминальным α-N-ацетиллактозамином и О-полисахарид из *S. enterica* O51, имеющий в составе дисахарид Томсена-Фриденрайха (TF), которые идентичны лигандам галектинов (Таблица 41). Примечательным является факт, что галектины имеют общие лиганды с АгАТ преимущественно класса G.

Таблица 41. Общие лиганды для галектинов человека и для антигликановых антител, выявленных при межгрупповых сравнениях на сроках после 34 недель беременности*

Структура лиганда (ID лиганда)	Галектины	класс АгАТ
Здоровые беременные _vs_ ГАГ		
3-O-Su-Gal β 1-4(6-O-Su)Glc β (176)	Гал-8	IgG
Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β (497)	Гал-3 Гал-7	IgG
Здоровые беременные _vs_ yПЭ		
Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β (434); Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β (293, 3'SL)	Гал-8	IgG
Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β (497)	Гал-3 Гал-7	IgG
Здоровые беременные _vs_ ХАГ		
-6Glc α 1-4(GlcNAc β 1-3)Gal β 1-3GalNAc α 1-3GlcNAc β 1- (1018, <i>S. enterica</i> O51)	Гал-1	IgM
Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β (293, 3'SL)	Гал-8	IgG
Gal α 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β (375)	Гал-3	IgM

*в рассмотрение взяты гликаны, показавшие значимые отличия в межгрупповых сравнениях

Таблица 42. Общие лиганды для галектинов человека и для АгАТ(IgG), выявленных при анализе антител пуповинной крови у здоровых новорожденных от матерей с физиологической беременностью и ПЭ и новорожденных с перинатальной патологией от матерей с ПЭ на сроках после 34 недель беременности

Структура лиганда (№ лиганда)	Галектины
Здоровые новорожденные от матерей с физиологической беременностью _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
Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β -, N-acetyllacto-N-tetraose, LNT (376)	Гал-9
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
Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β -, N-acetyllacto-neo-tetraose, LNnT (383)	Гал-3 Гал-4 Гал-8
Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β - Galili (penta)(481)	Гал-3

Как демонстрируют данные Таблицы 42, олигосахариды молока (№376 и №383), пентасахарид Галили (№481) и ксеноантиген Форссмана (№278) связывались как с галектинами, так и с АгАТ(IgG) на гликановом эррее. Антитела к этим структурам были выявлены при межгрупповых сравнениях, как указано в Таблице 42.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Важным аспектом в развитии современной иммунологии последних лет явилось изучение гликан-опосредованных взаимодействий, основанных на связывании гликанов с углеводсвязывающими белками (эндогенными лектинами и антигликановыми антителами), что положило основу для выделения этой области знаний в раздел, который посвящен гликан-опосредованным иммунным реакциям в норме и при патологии – гликоиммунологии. Основываясь на ключевой роли гликанов в иммунном ответе на паттерны, распознаваемые как “чужое”, а также их интеграции в канонические сигнальные пути, которые регулируют клеточные и гуморальные механизмы врожденного и адаптивного иммунитета, сформировано понимание о гликанах, как регуляторах иммунологических реакций. В настоящее время уже доказано, что гликаны регулируют провоспалительные процессы, которые связаны с острым и хроническим воспалением и аутоиммунитетом (Maverakis E. et al., 2015; Verhelst X. et al., 2020), а также противовоспалительные реакции, ассоциированные с прогрессированием рака (Pinho S. S., Reis C. A., 2015). Однако в других областях медицины, в частности, в репродукции, роль углевод-опосредованных иммунных реакций не доказана, так же, как и не обосновано применение термина “гликопатология” к изменению углеводного фенотипа клеток, обуславливающего нарушение функционирования органа, системы и организма в целом.

В современном акушерстве выделяют несколько нозологий, включенных в группу «больших акушерских синдромов» (Great Obstetrical Syndromes), связанных с патологией плацентации, которая обусловлена различной степенью нарушения ремоделирования и обструкции спиральных артерий в переходной зоне и в миометрии (Ananth C. V., Friedman A. M., 2014; Brosens I. et al., 2011; Pijnenborg R., Vercruysse L., Brosens I., 2011). Преэклампсия и задержка роста плода входят в эту (Зиганшина М.М. и др., 2022а) группу. Анализ эпидемиологических данных показывает, что частота возникновения этих патологий не снижается (ПЭ от 2 до 10% от всех беременностей, по данным различных авторов, ЗРП – от 5 до 18%), а, напротив, увеличивается, судя по тенденции последних лет. Анализ иммунологических механизмов, которые участвуют в патогенезе ПЭ и ЗРП, свидетельствует, что иммунная система матери приходит в состояние гиперактивации, и реагирует на плод как чужеродный, развивая механизмы отторжения, которые для данных заболеваний проходят по аналогии с хроническим отторжением трансплантата (Wilczyński J. R., 2006), однако механизмы и маркеры этого отторжения в плаценте и крови матери остаются мало исследованными. Аналогично, остается недостаточно исследованным влияние реакций хронического отторжения на плод и, особенно, на его иммунную систему.

Проведенное исследование базировалось на гипотезе о центральной роли развития гликопатологии в плаценте при плацента-ассоциированных осложнениях беременности, которая проявляется в измененном гликотипе ее клеток и структур, что формирует морфологические нарушения органа и активированный гликотип ткани плаценты. Поскольку плацента является основным обменным звеном между матерью и плодом и сайтом контакта материнских и фетальных клеток, активированный гликотип влияет на функцию иммунной системы матери и на развитие иммунной системы новорожденного. Основываясь на этой гипотезе, исследование имело несколько этапов. На **первом этапе** был исследован гликотип ткани плаценты в норме и при ранней и поздней форме ПЭ и ЗРП, определены особенности экспрессии в ткани плаценты факторов, регулирующих периферическую толерантность, проведена элюция связанных с тканью плаценты “плацента-ассоциированных” АгАТ, установлены особенности их специфичности (при сопоставлении специфичности АгАТ из плаценты и периферической крови) в норме и при патологии, выявлены особенности изотипического состава АгАТ(IgG) из крови и плаценты, выполнено окрашивание ткани нормальной плаценты и плаценты пациенток с ПЭ и ЗРП аффинно выделенными АгАТ, исследована функциональная активность аффинно-выделенных АгАТ в *in vitro* модели на клетках эндотелиальной линии. На последующих этапах исследования акцент был сделан на анализе клеточных и гуморальных факторов иммунной системы в контексте взаимодействия мать-плод как в норме, так и при патологии, учитывая активированный гликотип плаценты при осложненной беременности. В частности, на **втором этапе** было проведено исследование больших и малых субпопуляций Т-, В- и NK-клеток, а также иммуно-эндокринных факторов в пуповинной крови новорожденного и периферической крови матери. На **третьем этапе** исследовали широкий спектр антител классов М и G в периферической крови матерей с плацента-ассоциированными заболеваниями, сравнивая полученные спектры с таковыми при гипертензивных расстройствах беременности. Были рассчитаны диагностические сигнатуры для дифференциации различных нозологий в группе ГРБ, исследованы АгАТ(IgG) пуповинной крови и установлены маркеры неонатальных исходов, а также изучена специфичность семи рекомбинантных галектинов человека и установлены их общие лиганды с лигандами АгАТ периферической крови матери и пуповинной крови новорожденного.

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

В соответствии с вышеизложенным, на первом этапе исследования проводилось изучение гликотипа плаценты, и результаты рассматривались в двух аспектах, основанных на:

- 1) значимости гликанов в морфогенезе плаценты и ее структур. “Межклеточные контакты происходят в области мембран клеток, покрытых гликокаликсом — надклеточной структурой, состоящей из углеводной части мембранных гликоконъюгатов (гликопротеинов и гликолипидов) и протеогликанов” (Долгополова Е.Л., 2023). Гликаны, входящие в состав гликокаликса, играют ключевую роль в клеточном взаимодействии и иницировании сигнальных каскадов, способствующих пролиферации и правильному морфогенезу тканей и органов, включая плацентарный барьер, который обеспечивает обмен веществ между матерью и плодом. Изменения в составе гликанов важных структур плаценты могут указывать на нарушения как в функционировании плацентарного барьера, так и в лиганд-рецепторных взаимодействиях, опосредованных их участием.
- 2) участии гликанов в развитии толерантности к молекулам, которые распознаются как чужеродные (в данном случае - фетальные аллоантигены), что было описано ранее при канцерогенезе и бактериальных и вирусных инфекциях. Уклонение от функции надзора, осуществляемой иммунной системой матери в отношении полуаллогенного плода, имеющего отцовские антигены, может осуществляться с помощью гликан-зависимых механизмов апоптоза эффекторных клеток, а также маскирования потенциально опасных гликанов плода путем их модификации остатками сиаловой кислоты, которая несет биологическую метку “свой”. Такие модификации лигандов-гликанов предотвращают потенциальную активацию иммунной системы, в результате чего потенциально “опасный” гликан теряет способность взаимодействовать с рецепторами, которые вызывают активацию иммунной системы, но приобретают способность взаимодействия с ингибирующими, в частности ITIM-содержащими рецепторами. Этот аспект чрезвычайно важен, поскольку апикальная мембрана синцитиотрофобласта, покрытая гликокаликсом, контактирует с кровью матери, содержащей иммунные клетки, которые могут развивать эффекторные реакции отторжения.

Плацента - динамически развивающийся орган, исследования которого в режиме реального времени доступны только в экспериментальных *in vitro* и *in vivo* моделях. У человека исключительно по постнатальным исследованиям ткани плаценты сложно судить о значении гликанов для морфогенеза органа, поэтому выводы могут носить вероятностный

характер, но возможно констатировать факт, свидетельствующий об измененном гликотипе структур, составляющих плаценту при конкретной нозологии. Т.е. возможно охарактеризовать “паттерн” гликозилирования структуры плаценты (гликопаттерн), который отражает изменение экспрессии гликанов в патологической ткани. В проведенном исследовании основное внимание было уделено анализу состава гликокаликса синцитиотрофобласта и эндотелия ворсин плаценты, так как они формируют плацентарный барьер, обеспечивающий двунаправленный транспорт веществ между матерью и плодом. Синцитий представляет собой внешний слой ворсин и является ключевой структурной и функциональной единицей плаценты, находящейся в непосредственном контакте с материнской кровью. В сочетании со стромой и эндотелием фетальных капилляров синцитиотрофобласт образует плацентарный барьер, эффективность которого критически важна для нормального роста и развития плода (Ortega M.A. et al., 2022).

Основными механизмами, основанными на гликозилировании, посредством которых регулируется активность рецепторов являются: (1) участие гликанов в непосредственной регуляции связывания лигандов, олигомеризации, передаче сигналов рецепторов и внутриклеточном транспорте; (2) связывании углеводной части рецепторов с галектинами, с формированием “галектиновой решетки”, которая регулирует перемещение рецепторов на плазматической мембране (Зиганшина М.М. и др., 2017а). Ряд модификаций гликанов, например, присоединение остатков фукозы в коре и β 1,6-разветвления цепей, оказывают стимулирующее действие на все рецепторы, в то время как присоединение терминальных остатков сиаловых кислот, оказывает разнонаправленное действие на различные рецепторы, что может определяться микроокружением клетки (Gomes Ferreira I. et al., 2018). Вследствие этого, особенности гликотипа клетки, связанные с патологическим процессом, вносят ключевой вклад в развитие органа, влияя на его правильный цитокинез и морфогенез. Однако эти особенности могут быть обусловлены как врожденными нарушениями функционирования ферментных систем гликозилирования/дегликозилирования, так и являться следствием вторичных патологических процессов, влияющих на активность ферментов. В данной работе генетические особенности пациентов (гены ферментов гликозилирования) и активность этих ферментов не исследовалась, что вносит определенные ограничения на трактовку результатов. Изучение гликотипа клеток и структур плаценты проводилось постнатально, с учетом того, что патогенетические факторы ПЭ и ЗРП: фактор гипоксии, окислительного стресса и стерильного воспаления (инфекционные случаи исключались) оказывали влияние на плаценту. Поскольку группы пациенток были сформированы по методу подбора пар, а

основными критериями выбора были: возраст женщины, ИМТ, отсутствие тяжелой экстрагенитальной патологии и острого или хронического инфекционного процесса, то рассматриваемые когорты пациенток были сопоставимы по основным сопутствующим факторам, которые могут влиять на результаты, искажая их значимость. Единственным фактором, который не удалось скомпенсировать – отсутствие группы сравнения (ткани плаценты при нормальной беременности) для пациенток с ранней манифестацией ПЭ и ЗРП. Однако этот конфаундер является типичным для исследований на плаценте человека (Зиганшина М.М. и др., 2022а).

В данном исследовании был оценен состав гликокаликса синцитиотрофобласта и эндотелия терминальных ворсин плаценты пациенток с нормальной беременностью, ПЭ и ЗРП ранней и поздней манифестации на момент родоразрешения (Зиганшина М.М. и др., 2022а). Результаты содержания гликоконъюгатов в ткани плаценты анализировались в двух аспектах: 1) проводилось сравнение содержания гликанов в исследуемых структурах плаценты при ранних и поздних формах ПЭ и ЗРП по отношению к нормальной беременности, что позволило описать тенденции изменения их экспрессии и охарактеризовать паттерны гликозилирования (гликопаттерны) синцитиотрофобласта и фетального эндотелия терминальных ворсин плаценты для разных клинических фенотипов; 2) выполнялась детальная характеристика фукозилированных гликанов, поскольку имеются данные об их участии в ангиогенезе – одном из ключевых процессов морфогенеза плаценты, что определяет формирование сосудистой сети и ворсинчатого дерева, которое обеспечивает адекватный обмен между матерью и плодом.

Нормальный морфогенез ворсинчатого дерева плаценты включает дифференцировку мезенхимальных ворсинок плаценты в незрелые промежуточные ворсинки в первом и втором триместрах и в стволовые ворсинки с ответвляющимися терминальными ворсинами в третьем триместре. Во втором триместре некоторое число стволовых и терминальных ворсин уже сформировано, но их количество невелико, что и является одним из определяющих факторов незрелости ворсинчатого дерева плаценты на этом сроке. Терминальные ворсинки содержат капилляры с циркулирующей кровью плода, и являются основным местом для диффузионного обмена, обеспечивающим его питание (Burton G. J., Jauniaux E., 2015).

Как уже отмечалось, ограничивающим фактором исследования является разный срок беременности, на котором анализировались плаценты от физиологической беременности (поздние сроки) и патологии ранней манифестации, поскольку на ранних

сроках имеет место недостаточная степень зрелости ворсинчатого дерева, которая наблюдается и в норме. Однако такое сопоставление допустимо, поскольку оценка экспрессии гликоконъюгатов, окрашиваемых лектинами проводилась только в терминальных ворсинах; ткань нормальной плаценты использовалась в качестве референсного образца для патологических образцов ткани плаценты на разных сроках беременности.

Анализ данных показал, что гликотип синцитиотрофобласта при ранней задержке развития плода (ЗРП) демонстрирует значительные изменения в составе терминальных гликанов. В частности, наблюдается высокое содержание манно- и $\alpha 2,3$ -сиалогликанов, а также гликанов с терминальными остатками N-ацетилглюкозамина и N-ацетилгалактозамина, в то время как уровень фукогликанов, а также Gal β - и Gal α -терминированных гликанов снижен. Субтерминальные гликаны остаются неизменными (Рисунок 81 А). При поздней ЗРП изменения в составе гликокаликса синцитиотрофобласта менее выражены, чем на ранних сроках, и проявляются в увеличении содержания $\alpha 2,3$ - и $\alpha 2,6$ -сиалогликанов, манногликанов и Gal $\beta 1,4$ GlcNAc $\beta 1$ -терминированных гликанов (Зиганшина М.М. и др., 2019), в то время как субтерминальные фрагменты Gal $\beta 1,4$ GlcNAc $\beta 1$ - снижаются (Рисунок 81 А). Аналогичные закономерности наблюдаются и для гликанов эндотелиального гликокаликса: при ранней ЗРП фиксируются значительные изменения в экспрессии терминальных структур, а при поздней – более выраженные изменения субтерминальных структур гликанов. Кроме того, по ряду гликанов отмечаются схожие изменения их содержания как в эндотелии, так и в синцитии, особенно на ранних сроках ЗРП (Рисунок 81 А, Рисунок 82 А). Особенности состава эндотелиального гликокаликса при ранней ЗРП является высокое содержание терминальных фукогликанов и сниженное – манногликанов и $\alpha 2,6$ -сиалогликанов, а также повышенное содержание субтерминальных фрагментов Gal α - и N-ацетилгалактозамина. При поздней ЗРП – схожие изменения состава терминальных структур гликокаликса синцития и эндотелия отсутствуют. Единственным общим признаком является повышение $\alpha 2,3$ -сиалогликанов в обеих структурах (Рисунок 81 А, Рисунок 83 А). Выраженные изменения субтерминальных структур выявлены в эндотелиальном гликокаликсе, проявляющиеся снижением количества фрагментов Gal $\beta 1,4$ GlcNAc $\beta 1$ - и повышением Gal α - и N-ацетилгалактозамин-содержащих гликанов (Рисунок 82 А) (Зиганшина М.М. и др., 2019).

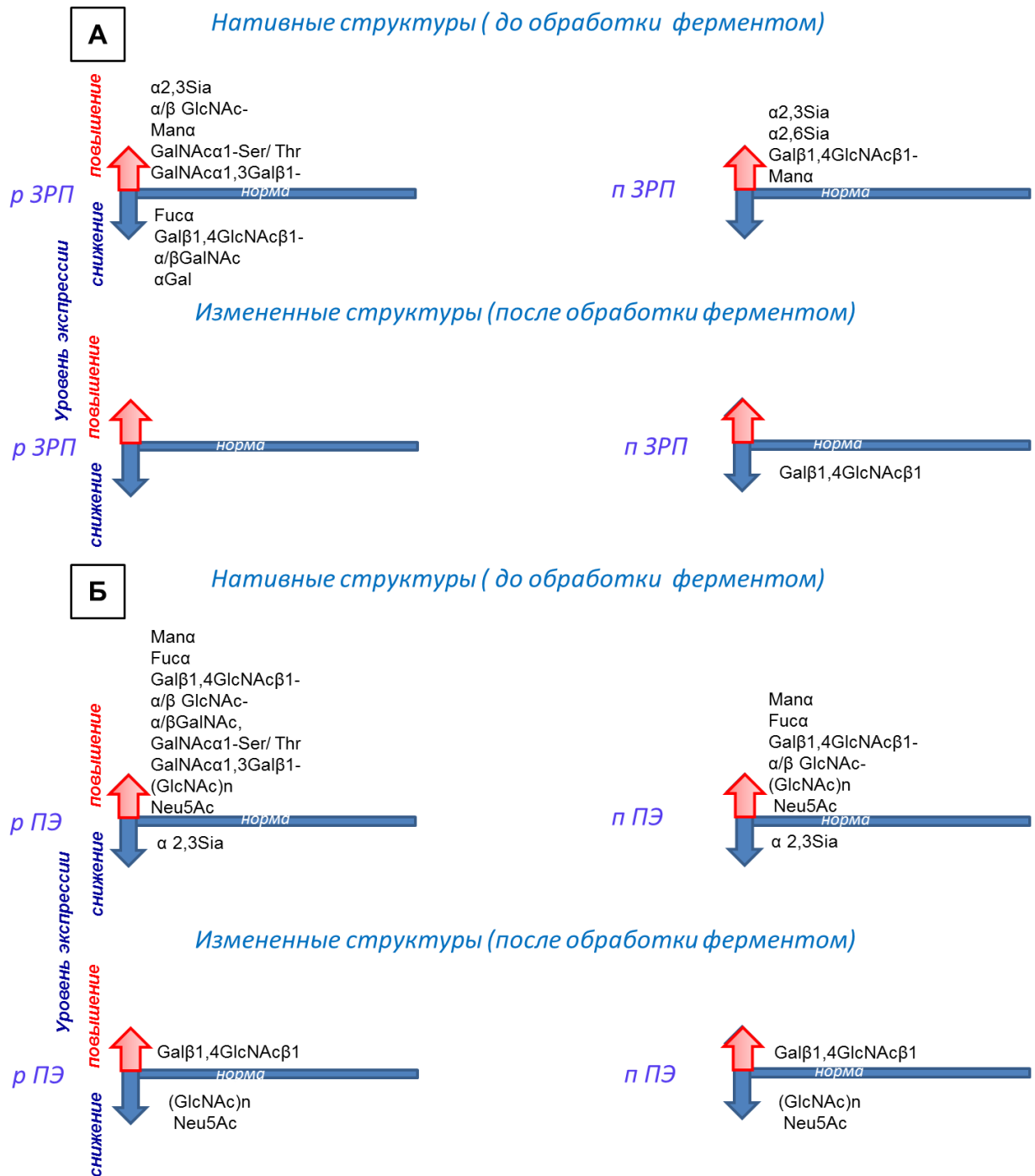


Рисунок-схема 81. Изменения содержания терминальных гликанов (нативные структуры) и субтерминальных фрагментов гликанов (после ферментативной обработки) синцитиотрофобласта терминальных ворсин плаценты при ЗРП ранней и поздней манифестации (А) и ПЭ с ранним и поздним началом (Б). Представлены изменения (повышение/снижение) содержания гликанов по отношению к их содержанию в гликокаликсе синцитиотрофобласта при нормальной беременности.



Рисунок-схема 82. Изменения содержания терминальных гликанов (нативные структуры) и субтерминальных фрагментов гликанов (после ферментативной обработки) эндотелия терминальных ворсин плаценты при ЗРП ранней и поздней манифестации (А) и ПЭ с ранним и поздним началом (Б). Представлены изменения (повышение/снижение) содержания гликанов по отношению к их содержанию в эндотелиальном гликокаликсе при нормальной беременности.

Особенностью паттернов гликозилирования синцитиотрофобласта (Рисунок 81 Б) и фетального эндотелия терминальных ворсин плаценты (Рисунок 82 Б) при ПЭ является схожий характер изменений терминальных гликанов: повышена экспрессия манно- и фукогликанов, гликанов, терминированных остатками $\text{Gal}\beta 1,4\text{GlcNAc}\beta 1$ -, поли-N-ацетилглюкозамина и ацетилнейраминовой кислоты, а также снижены $\alpha 2,3$ -сиалогликаны. Специфичные изменения фиксируются в каждой структуре, но они единичные (Рисунок 81 Б, Рисунок 82 Б). Субтерминальные фрагменты гликанов синцитиотрофобласта также изменены единообразно (Рисунок 81 Б). В фетальном эндотелии – при схожих изменениях подавляющего числа субтерминальных фрагментов гликанов выявляется снижение содержания $\text{Gal}\alpha$ - и N-ацетилгалактозамина в тканях плацент при рПЭ (Рисунок 82 Б).

Приведенные данные демонстрируют, что состав гликокаликса в основных функциональных единицах плацентарного барьера в норме и при патологии схож, изменения касаются количественного, а не качественного состава гликанов. Используемая в данном исследовании панель растительных лектинов охватывает все основные группы гликанов, наиболее часто детектируемые в углеводных цепях клеток и тканей человека. Учитывая это, необходимо отметить высокую распространенность исследуемых лектиновой гистохимией фрагментов гликанов, служащих “строительным материалом” или звеньями, представленными в различных комбинациях в составе значительного числа гликанов, которые являются составной частью мембранных рецепторов. Ряд рецепторов имеют О-гликаны, представленные простыми структурами: GalNAc (Тn-антиген), сиалил-Тn-антиген, кор типа 1 $\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}$ - (Т-антиген) и др. Структуры N-гликанов преимущественно представлены гликанами олигоманнозного типа, сложными или бисектными цепями (Зиганшина М.М. и др., 2019). Фукоза в коре N-цепи, или связанная с остатками N-ацетиллактозамина, а также сиаловая кислота являются наиболее частыми терминальными группами гликанов (Willhauck-Fleckenstein M. et al., 2010). Таким образом, в диссертационной работе охарактеризованы паттерны экспрессии гликанов при исследуемых патологиях, которые отражают определенные закономерности развития патологического процесса в плаценте, зафиксированного на момент родоразрешения, что демонстрирует общие и уникальные изменения гликозилирования в структурах плацентарного барьера терминальных ворсин плаценты, и свидетельствует о развитии гликопатологии плаценты при ПЭ и ЗРП (Рисунок 81, Рисунок 82) (Зиганшина М.М. и др., 2022а)).

Основываясь на обозначенных выше аспектах, в соответствии с которыми проводилось изучение гликотипа плаценты, необходимо отметить, что выявленная

гликопатология обусловлена основным патогенетическим фактором БАС – развитием СВО (изменение активности ферментов мы не рассматривали), и неизбежно должна оказывать влияние на морфогенез плаценты и иммунологическую толерантность к плоду (Зиганшина М.М. и др., 2019). Доказательствами этого являются следующие выявленные факты:

Во-первых, установленный в данном исследовании дисбаланс экспрессии сиалогликанов, свидетельствующий о повышенном количестве $\alpha 2,3$ -связанных остатков сиаловых кислот в эндотелиальном гликокаликсе в ткани плаценты при ЗРП, и снижении $\alpha 2,6$ -связанных остатков с одновременным повышением уровня экспрессии остатков $\alpha 2,3$ -связанных сиаловых кислот при ПЭ согласуется с уже известными данными о влиянии провоспалительного микроокружения на гликом эндотелиальных клеток (Зиганшина М.М., 2016). Поражения плацентарной ткани при ПЭ и ЗРП возникают в результате ишемически-гипоксических повреждений, что приводит к формированию провоспалительного статуса. Этот статус поддерживает постоянную активацию эндотелия, переходящего в состояние эндотелиальной дисфункции, что вызывает и усугубляет сосудистую патологию, определяющую клинические проявления обоих синдромов. Провоспалительные факторы формируют определенное микроокружение клеток, что влияет на процессы гликозилирования, изменения которого ответственны за тонкую настройку различных поверхностных рецепторов эндотелиальных клеток для их взаимодействия с лигандами. Экспериментально было установлено, что *in vitro* активация ангиогенным (VEGF), или провоспалительным (TNF α) фактором клеток линии HBMEC-60 (эндотелий микрососудов костного мозга человека, схожий по углеводному фенотипу и функциям с первичными эндотелиальными клетками костного мозга), вызывает повышенную или пониженную экспрессию различных профилей генов гликома. Наиболее выраженные изменения гликома (количественные и качественные) наблюдались при стимуляции TNF α . Продемонстрировано, что стимуляция VEGF и TNF α предпочтительно воздействовала на гены гликозилтрансфераз, ответственные за терминальные модификации гликанов. В частности, после провоспалительной стимуляции TNF α отмечалось увеличение $\alpha 2,6$ -сиаилирования; проангиогенная стимуляция VEGF приводила к повышению транскрипции ST3Gal1 и синтезу $\alpha 2,3$ -сиалогликанов (Willhauck-Fleckenstein M. et al., 2010). Это согласуется с известными данными о выраженных провоспалительных изменениях с угнетением ангиогенеза в тканях плаценты при ПЭ и развитии проангиогенного статуса, обеспечивающего компенсаторный ангиогенез ворсинчатого дерева при ЗРП.

Во-вторых, изменение экспрессии гликанов, содержащих маннозу, фукозу, сialовую кислоту, N-ацетиллактозамин и N-ацетилгалактозамин, способно влиять на активность рецепторов - способность связывать факторы роста и другие молекулы, нарушать процессы морфогенеза органа и его сосудистой сети. Так, гиперсиалирированные, фукозилированные и олигоманнозные структуры выявлены в составе N-гликанов VEGFR2 (Chandler K.B. et al., 2019). Поскольку в составе углеводной части рецепторов эти фрагменты широко распространены, то изменения гликопаттернов, проявляющиеся в сниженной экспрессии остатков маннозы в эндотелиальном гликокаликсе терминальных ворсин плаценты при ранней и поздней форме ЗРП, а также дисбалансе экспрессии $\alpha 2,3$ - и $\alpha 2,6$ -сиалогликанов в эндотелиальном гликокаликсе при ПЭ с ранним и поздним началом, выявленные в данном исследовании, могут быть связаны с нарушениями морфогенеза сосудистой сети, что характерно для этих осложнений беременности (Зиганшина М.М. и др., 2019).

Анализ состава терминальных гликанов гликокаликса демонстрирует, что в синцитиотрофобласте терминальных ворсин, как при ранних, так и при поздних формах ПЭ и ЗРП наблюдается увеличение содержания остатков маннозы. В эндотелиальном гликокаликсе при ПЭ – манногликаны также повышены, но при ЗРП – выявлено их снижение, что установлено по изменению окрашивания лектином Con A. Повышенная экспрессия гликоконъюгатов, окрашиваемых лектином VVL, который связывает терминальные остатки N-ацетилгалактозамина в N-цепях, а также O-гликана Tn, выявлена в гликокаликсе синцитиотрофобласта и эндотелия при ранних формах ПЭ и ЗРП. По данным литературы, трисиалирированные четырехантенные олигосахариды, фукозилированные на восстанавливающем конце N-ацетилглюкозамина, а также олигоманнозные цепи гликанов обнаруживаются в составе N-цепей EGFR (Зиганшина М.М. и др., 2020; Smith K.D. et al., 1996).

Отмечается наличие остатков N-ацетилгалактозамина в составе O- и N-цепей гликанов и их значение для функционирования EGFR, регуляции миграционного и инвазивного потенциала клеток (Sun Z. et al., 2019). Поскольку функциональная активность этого рецептора зависит от гликозилирования, что было установлено экспериментально с применением различных гликозидаз и ингибиторов гликозилирования (Azimzadeh Irani M., Kannan S., Verma C., 2017; Feduska J.M. et al., 2013; Zhang J. et al., 2021), изменения экспрессии этих гликанов, по-видимому, ассоциировано с нарушениями морфогенеза плаценты, т.к. EGFR является одним из ключевых факторов, регулирующих морфогенез. В частности, лиганд-рецепторная система EGF/EGFR регулирует пролиферацию и

дифференцировку трофобласта (Clemente L., Bird I. M., 2023; Morrish D. W. et al., 1987), а также влияет на ангиогенез плаценты и развитие эндотелиальной дисфункции (Clemente L. et al., 2020) что было подробно рассмотрено в разделе “обзор литературы” (Зиганшина М.М., 2016).

В данном контексте, необходимо отметить, что различные фукозилированные N-гликаны, N-гликаны, терминированные остатками $\alpha 2,6$ -сиаловой кислоты, ассоциированы с IR, IGFR1 и IGFR2 плаценты. Лиганд-рецепторные взаимодействия, в которых они принимают участие, способствует регуляции развития плаценты согласно гестационному сроку (Robajas D. et al., 2016a), а изменения гликозилирования рецепторов влияет на их связывание с лигандом и передачу сигнала в клетку (Hinek A. et al., 2008) и может нарушать функционирование плаценты как органа. Также известно, что биосинтез структурно измененных гликанов с разветвленными цепями N-ацетиллактозамина нарушает функцию рецептора, за счет стерических затруднений для связывания с лигандом, что изменяет IGFR1-опосредованные сигнальные пути в клетке (Sweeney J.G. et al., 2018) и влияет на регуляцию пролиферации (Sweeney J. G. et al., 2018). В плаценте наблюдалось повышенное содержание остатков N-ацетиллактозамина в гликокаликсе синцития и фетального эндотелия терминальных ворсин как при ранней, так и при поздней ПЭ. Также эти остатки были обнаружены в гликокаликсе синцитиотрофобласта при поздней форме задержки развития плода. В то же время, при ранней форме задержки развития отмечалось снижение их уровня в обеих структурах плацентарного барьера. Вероятно, нарушение биосинтеза N-ацетиллактозамин-содержащих гликанов может оказывать влияние на функционирование рецепторов и регуляцию пролиферации клеток плаценты.

В-третьих, изменения экспрессии гликанов, исследованных в данной работе может быть связано с нарушением механизмов развития толерантности к плоду. Поскольку TGF β является мультифункциональной молекулой, которая регулирует пролиферацию, дифференцировку клеток, а также развитие толерантности к аллоантигенам, изменения экспрессии ассоциированных с ним гликанов, в частности, остатков N-ацетилгалактозамина, а также терминальных остатков $\alpha 2,6$ -сиаловой кислоты может оказывать комплексное влияние, как на морфогенез плаценты, так и на функционирование механизмов периферической толерантности к плоду при осложненной беременности (Lu J. et al., 2014; Wu Q. et al., 2021).

Как свидетельствуют данные, представленные в нашем исследовании, описанные гликопаттерны в синцитиотрофобласте и эндотелии терминальных ворсин плаценты при

ПЭ и ЗРП (Зиганшина М.М. и др., 2022а), демонстрируют измененный профиль экспрессии $\alpha 2$ -6-сиалогликанов, Gal β - и N-ацетилгалактозамин-терминированных гликанов, в том числе коротких цепей О-гликанов (Зиганшина М.М. и др., 2019), а также фукогликанов, т.е. функциональных фрагментов, которые могут регулировать процессы клеточной гибели, поскольку являются составной частью углеводных цепей, ассоциированных с рецепторами апоптоза. Особенностью изменений гликопаттернов является повышенная экспрессия $\alpha 2$ -6-сиалогликанов в эндотелии при ПЭ и в синцитии при ЗРП, что сложно интерпретировать, поскольку исследования о влиянии гиперсиалирования на функционирование рецепторов клеточной гибели ограничены (Зиганшина М.М., 2016). Избыточное количество остатков сиаловых кислот негативно сказывается на взаимодействии рецептора клеточной гибели DR5 (TRAILR2) с лигандом TRAIL. Кроме того, ингибирование биосинтеза Т-антигена приводит к образованию укороченных О-гликанов (антигенов Tn и sialyl-Tn), что, в свою очередь, отрицательно влияет на сигналы путей апоптоза в клетках (Jeon M.-Y. et al., 2019; Jiang Y. et al., 2020). Это представляет собой механизм регуляции численности клеток иммунной системы. Установленные изменения гликопаттернов при ПЭ и ЗРП могут быть связаны с изменениями функционирования рецепторов апоптоза, но функциональное значение этих изменений еще предстоит изучить.

В контексте возможной связи между изменениями гликопаттерна плаценты и нарушением механизмов толерантности к плоду необходимо отметить наличие молекул HLA-G на синцитиотрофобласте, углеводные цепи которого имеют в своем составе остатки полилактозамина, способные взаимодействовать с рецепторами иммунных клеток (Pang P.-C. et al., 2016). Поскольку гликокаликс синцитиотрофобласта контактирует с материнскими иммунными клетками, его состав, отражающий рецепторный аппарат синцитиотрофобласта, чрезвычайно важен для развития толерантности. По-видимому, механизмы развития толерантности не ограничиваются только избирательной экспрессией молекул гистосовместимости на синцитии (Clark D. A. et al., 2010), но и должны включать избирательную экспрессию гликанов, поскольку они могут обуславливать внутривидовое разнообразие соответствующего гликопротеина или гликолипида и входить в состав паттернов чужеродности/опасности. Предположение об “избирательной экспрессии гликанов в области прямого контакта материнских и фетальных клеток” (Тютюнник Н.В., 2019) подтверждается данными о том, что щеточная кайма (гликокаликс) синцитиотрофобласта доношенной плаценты человека сильно гликозилирован, и в его составе представлено большое количество остатков N-ацетилглюкозамина, но незначительное - сиаловой кислоты (Зиганшина М.М., 2016; Jones C. J. P. et al., 1997; Jones

С. J. P. et al., 2007; Marini M. et al., 2011). В составе гликопаттернов синцитиотрофобласта, описанных в данном исследовании, обнаружено увеличение N-ацетилглюкозамина (при ранних фенотипах ЗРП и ПЭ), причем при ПЭ также повышена экспрессия остатков поли-N-ацетилглюкозамина. При ЗРП обоих клинических фенотипов выявляются гиперсиалирированные гликопаттерны синцитиотрофобласта. Представленные данные подтверждают развитие гликопатологии синцитиотрофобласта.

В-четвертых, кроме терминальных гликанов, значительным изменениям подверглись субтерминальные структуры, составляющие гликопаттерны структурных единиц плацентарного барьера. Их изменения свидетельствуют о длительном воздействии патогенетического фактора на процессы биосинтеза гликанов, и, вследствие этого, структурных изменениях гликанов при патологии плаценты. Ранее в модели *in vitro* было показано, что при воздействии на эндотелий VEGF и TNF α (ключевые факторы ангиогенеза и воспалительного ответа) наблюдается различная регуляция путей гликозилирования в клетке. Оба эти фактора снижают экспрессию генов гликозилтрансфераз, участвующих в ранних стадиях биосинтеза N-цепей гликопротеинов. В эксперименте *in vitro* под действием VEGF биосинтез гликанов осуществлялся с предпочтительной активацией маннозидазы MAN2A1 и N-ацетилглюкозаминтрансферазы MGAT1, что обеспечивает преимущественное формирование субтерминальных структур соответствующего состава. Стимуляция TNF α по-разному влияет на активность ферментов, что выражается в появлении более широкого спектра субтерминальных структур, включая лактозаминовые фрагменты, синтезируемые при активации B4GALT1, добавляющего остатки галактозы к N-ацетилглюкозамину (Willhauck-Fleckenstein M. et al., 2010). В нашем исследовании повышенное количество субтерминальных остатков поли-N-ацетилглюкозамина и лактозамина было отмечено в гликокаликсе фетального эндотелия при ПЭ с ранним и поздним началом. Снижение количества субтерминальных фрагментов лактозамина детектировалось в гликокаликсе синцитиотрофобласта и эндотелия при пЗРП. Выявленные изменения субтерминальных гликанов, по-видимому, связаны с дисбалансом провоспалительных и проангиогенных сигналов в тканях патологической плаценты.

Цитируемое выше исследование продемонстрировало, что VEGF и TNF преимущественно индуцируют модификации гликанов, но не усиливают их синтез *de novo* (Willhauck-Fleckenstein M. et al., 2010). Этот факт свидетельствует, что провоспалительные и проангиогенные стимулы вызывают эпигенетические модификации белков за счет изменения гликозилирования в условиях развития воспалительной реакции и формирования сосудистого дерева плаценты. В нормальной плаценте развитие

субклинической воспалительной реакции необходимо для ремоделирования матрикса и интенсивного ангиогенеза при морфогенезе органа. Патология плаценты, развивающаяся при ПЭ и ЗРП, для которых характерен чрезмерный воспалительный ответ, сопровождается формированием провоспалительного микроокружения клеток, что может сочетаться с компенсаторным ангиогенезом. Можно сделать вывод о том, что наблюдаемые изменения гликопаттернов эндотелия и синцитиотрофобласта обусловлены патологией и являются следствием несбалансированного ангиогенеза и чрезмерного воспалительного ответа.

В-пятых, в плаценте пациенток с ПЭ и ЗРП установлены отличные от нормы паттерны экспрессии фукогликанов. Фукозилированные гликаны исследовались в плаценте человека ранее, в комплексе с другими гликанами, в частности при физиологической беременности (Tatsuzuki A. et al., 2009), ЗРП (Minas V. et al., 2007; Sgambati E. et al., 2002) и при гипертензивных расстройствах во время беременности (Marini M. et al., 2011). Использование гистохимической техники с окраской лектинами BC2L-C-Nt, UEA-I, LTL, AAL и анти-Le^Y антителами, позволило выявить особенности количественного и качественного состава фукогликанов, в частности, фукозилированных дисахаридов Н тип 1 и Н тип 2 и дифукозилированного дисахарида Le^Y, который имеет особое значение для ангиогенеза плаценты и участвует во множестве физиологических и патологических процессов, включая имплантацию эмбриона, воспаление, канцерогенез и метастазирование (Zhang Z. et al., 2008).

Использование гликанового эррея позволило установить, что в профилях специфичности лектинов выявляются неприродные гликаны (которые являются продуктами химического синтеза, Рисунок 36 – отмечены красной звездочкой). Вследствие широкой специфичности лектинов, они способны узнавать необычные структуры, родственные природным. Их наличие в профиле специфичности лектина не равнозначно их присутствию в ткани плаценты. По-видимому, в ткани мы наблюдаем связывание с молекулярными паттернами («образами опасности»), а необычные неприродные гликаны являются их миметиками. Нельзя исключить, что гликопаттерны эндотелия терминальных ворсин экспрессируют комплексные, в том числе конформационные антигены, выступающих в качестве сайтов связывания с клетками иммунной системы и мишеней для эффекторов врожденного иммунитета.

Значение изменений экспрессии фукогликанов можно интерпретировать в нескольких аспектах. Нельзя исключить, что влияние гипоксии в данном случае проявляется опосредованно через изменение экспрессии или активности ферментных

систем, регулирующих гликозилирование, и выражается в изменениях или нарушениях биосинтеза гликанов с кором типа 2. Известно, что Le^Y синтезируется на основе структуры H тип 2 (Lowe J. B., 1993). Поэтому повышенная по отношению к норме экспрессия обоих гликанов в терминальных ворсинах при ранних и поздних формах ПЭ и ЗРП может быть отражением этого процесса.

В исследованиях патогенеза плацента-ассоциированных осложнений беременности отмечается, что повышение экспрессии факторов с ангиогенной активностью необходимо для компенсации и адаптации плаценты к условиям гипоксии (Barut F. et al., 2010; Gourvas V. et al., 2012; Schoots M. H. et al., 2018). Аналогичное заключение было сделано в исследовании Minas V. относительно повышения экспрессии Le^Y в ткани плаценты при ЗРП (Minas V. et al., 2007), и исходя из этих наблюдений можно заключить, что повышение экспрессии фукогликанов с кором типа 2 является адаптационным механизмом при ПЭ и ЗРП. Также, нельзя исключить, что повышение экспрессии Le^Y связано с адаптационными реакциями, основанными на повышении пролиферативного потенциала клеток, который снижен при обеих нозологиях, “поскольку Le^Y экспрессируется в составе гликанов рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) и рецепторов трансформирующего фактора роста- β – TGF β RI и TGF β RII, которые регулируют” (Долгополова Е.Л., 2023) TGF- β 1 и EGF-зависимые сигнальные пути Smad, ERK и PI3K (Lif F.-F. et al., 2012; Lin W.-L. et al., 2015; Liu J. J. et al., 2010).

Повышение экспрессии фукозилированных гликанов с кором типа 2 в структурах патологических плацент может свидетельствовать о незрелости ворсин, поскольку экспрессия H тип 2 и Le^Y выявлялась на CD34⁺ гематопоэтических прогениторных клетках, но отсутствовала на зрелых лимфоцитах (Cao Y. et al., 2001). Возможно, эти гликаны следует рассматривать как маркеры незрелости ворсин, что требует дальнейших углубленных исследований.

Т.о., был изучен гликотип плаценты – описаны гликопаттерны, экспрессия которых характерна для ПЭ и ЗРП и которые указывают на прошедшие патологические преобразования в процессе морфогенеза плаценты и нарушения толерантности к плоду. Определены схожие изменения и особенности состава гликопаттернов, обуславливающие их специфичность для отдельной нозологии и ее фенотипа. Очевидно, что при схожих патогенетических механизмах развития ПЭ и ЗРП, выявленные измененные паттерны гликозилирования отражают особенности патогенеза этих нозологий в ткани плаценты, и, по-видимому, их формирование имеет различные последствия для ее функционирования,

что влияет на развитие осложнений у матери и плода. Представленные результаты свидетельствуют, что в плаценте при ПЭ и ЗРП развивается гликопатология, которая характеризуется как схожими, так и уникальными изменениями гликоконъюгатов в структурах плаценты. Результаты, обсуждаемые в данном разделе, представлены в (Зиганшина М.М. и др., 2016b; Зиганшина М.М. и др., 2017a; Ziganshina M.M. et al., 2020b).

4.2. 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 могут стимулировать клеточный и гуморальный иммунный ответ, а также являться мишенями естественных АгАТ. Это предположение обосновало формулирование гипотезы о возможном наличии в тканях плаценты резидентных антител, направленных к гликанам – антигенам, которые воспринимаются иммунной системой матери как “образы опасности”, и могут выступать в качестве мишеней для этих антител. Взаимодействие АгАТ с мишенями-гликанами в плаценте, по-видимому, имеет патогенетическое значение, поскольку может, как способствовать сохранению и развитию беременности, так и опосредовать эффекторные реакции иммунной системы. Для подтверждения этой гипотезы, было проведено исследование комплекса иммунологических факторов, которые регулируют формирование иммунологической толерантности к плоду на системном (в крови) и локальном (в плаценте) уровнях с акцентом на факторах, влияющих на гликозилирование, а также стимулирующих продукцию антител с протективными свойствами, которые при беременности выполняют функции блокирующих антител и регулируют толерантность в аллогенных системах. В рамках выполнения этого этапа исследования были подобраны условия элюции антител с ткани плаценты. В элюатах произведено определение АгАТ, изотипический состав и специфичность которых были детально изучены. По результатам исследования специфичности антител были выбраны АгАТ, которые выделялись аффинной хроматографией из иммуноглобулинового препарата в количествах, достаточных для изучения их функциональной активности и подтверждения их связывания с антигенами в тканях плаценты. Т.о. проведено исследование от обоснования гипотезы о наличии в тканях плаценты АгАТ, связанных с гликанами, которые могут выступать в качестве “образов опасности” и нести информацию о чужеродном аллоантигене, до ее подтверждения. Окраска плаценты аффинно выделенными АгАТ, и определение их функциональной активности в *in vitro* экспериментах, позволили подтвердить мишени АгАТ в плаценте и охарактеризовать функцию этих антител.

Для характеристики иммуно-гормонального статуса, способствующего поддержанию толерантности к аллоантигенам в период гестации, были определены ключевые факторы, которые регулируют взаимодействия материнских и фетальных клеток на локальном и системном уровнях. Полученные результаты указывают на то, что из исследованных иммунорегуляторных факторов значимые различия имеются только по экспрессии мРНК гена *PIBF* (Таблица 13), что объясняется участием прогестерона в регуляции экспрессии *PIBF* (Polgar V. et al., 2003). Необходимо отметить, что и экспрессия *PIBF*, и содержание прогестерона были значимо ниже у пациенток с осложненной беременностью (Таблица 13, Рисунок 64), а содержание IL-6 – напротив, выше (Рисунок 63). В пуповинной крови фиксировалась тенденция, свидетельствующая о более высоком содержании IL-6 у новорожденных, рожденных от матерей с осложненной беременностью (Рисунок 63). Полученные нами данные свидетельствуют, что в выборке пациенток, включенных в исследование, адекватное функционирование “регуляторной оси прогестерон-*PIBF*” наблюдается в норме, а ее нарушение - при осложненной беременности, что согласуется с известными данными.

В ряде исследований было отмечено, что прогестерон является основным регулятором иммунного ответа при беременности, стимулируя экспансию Т(рег)-клеток в область контакта материнских и фетальных клеток, снижает провоспалительный фон на местном и системном уровне, способствуя переключению иммунных реакций на Th2-тип. Как следствие, увеличивается продукция Th2-противовоспалительных цитокинов, снижается продукция Th1 и Th17 цитокинов, обладающих эмбриотоксическим действием (Di Renzo G. C. et al., 2016; Piccinni M.-P. et al., 2021), а также стимулирует синтез гликоделина А и TGF- β , что оказывает толерогенный эффект (Shah N. M. et al., 2019), блокирует дегрануляцию NK-клеток и, следовательно, их цитолитическую функцию (Игнатьева Н.В. и др., 2019; Laskarin G. et al., 2002). Прогестерон способствует инвазии вневорсинчатого трофобласта в децидуальную оболочку путем ингибирования апоптоза трофобласта, что улучшает маточно-плацентарное кровообращение (Di Renzo G. C. et al., 2016). Низкое содержание прогестерона в крови матери выявляется при патологии беременности (Nagy B. et al., 2021).

Отдельного внимания заслуживают данные о содержании IL-6 в крови и ткани плаценты. Результаты, свидетельствуют, что мРНК гена *IL-6* не демонстрирует значимых различий между группами исследования, несмотря на тенденцию к его повышению в ткани плаценты при ЗРП. Однако высокий уровень IL-6 в крови свидетельствует о преобладании провоспалительной направленности иммунных реакций при осложненной беременности, что закономерно, поскольку его повышение сочетается с низким содержанием в крови

прогестерона, который реципрочно регулирует IL-6, TNF- α и IL-1 β (Fedotcheva T. A., Fedotcheva N. I., Shimanovsky N. L., 2022).

Повышенное содержание провоспалительных цитокинов, является характерным признаком развития патологии беременности (Vilotić A. et al., 2022). IL-6 - цитокин с плеiotропным эффектом, который в зависимости от микроокружения и концентрации способен вызывать диаметрально противоположные эффекты (Jones S. A., Jenkins B. J., 2018). В плаценте IL-6 является одним из основных регуляторов множественных процессов на границе плода и матери, в частности, он стимулирует инвазию трофобласта в ранние сроки беременности (Jovanović M., Vićovac L., 2009) и процессы ремоделирования спиральных артерий (Choudhury R. H. et al., 2017). Также показано участие IL-6 в регуляции синтеза β -субъединицы хорионического гонадотропина и плацентарного лактогена человека - двух основных плацентарных гормонов, необходимых для успешной беременности (Зиганшина М.М. и др., 2017а; Vilotić A. et al., 2022). В то же время, высокий уровень экспрессии IL-6 в плаценте и в крови является свидетельством провоспалительного фона, активации иммунной системы и ассоциирован с осложнениями беременности (Vilotić A. et al., 2022). Было показано, что эффект IL-6 дозозависим: умеренно низкие значения экспрессии IL-6 стимулируют синтез блокирующих антител, высокие – активируют иммунные клетки (Canellada A. et al., 2002a). Как свидетельствуют данные о пЛАгАТ, которые будут обсуждаться ниже, резидентные АгАТ, выделенные из плаценты, выявляются в норме и при патологии; их профиль во многом сходен, но значимым фактором является количество этих антител. По-видимому, высокая экспрессия в ткани плаценты мРНК гена *PIBF* при высоком уровне прогестерона и низком - IL-6, является достаточным для создания микроокружения, способствующего более высокой тропности АгАТ к тканям нормальной плаценты, несмотря на относительно стабильную и значимо не различающуюся экспрессию генов других иммунорегуляторных молекул: *IL-6*, *IL-10*, *TGF β* и *HLA G*. Т.о., полученные данные свидетельствуют, что в норме на локальном и системном уровнях создаются условия для продукции протективных блокирующих антител, и их акцепции в плацентарной ткани.

Результаты исследования блокирующих антител, на сегодняшний день, ограничены констатацией факта о измененном содержании антител отдельных изотипов. Гипотеза о “блокирующих антителах” не была исследована на высоком доказательном уровне - методические ограничения не позволили исследовать их эпитопную специфичность детально.

В ограниченном числе работ были представлены методические варианты элюции антител из ткани плаценты (Borel I. M. et al., 1991; Chamley L. W., Pattison N. S., McKay E. J.

1993; Faulk W. P. et al., 1974; Lekchnov E. A. et al., 2015; Omwandho C. A. et al., 1997). На основании анализа литературных данных, для элюции АгАТ из ткани плаценты в данном исследовании были апробированы несколько методических подходов, критерием оценки которых был количественный выход антител в элюате и разнообразие профиля элюированных антител (Таблица 14, Таблица 15). Оригинальность проведенного нами этапа заключалась в выборе оптимальных условий элюции с учетом оценки выхода АгАТ (IgG) более 400 специфичностей. Как отмечалось выше, в предшествующих исследованиях, авторы оценивали только классы (IgM, IgG, IgA) или подклассы (IgG₁-IgG₄) выделенных антител, не определяя их специфичность. Исследование “стабильности” АгАТ в элюатах при хранении (под “стабильностью” антител, в данном контексте, имеется ввиду способность сохранять воспроизводимые характеристики связывания с гликанами на гликановом эррее в течение определенного промежутка времени) позволило получить адекватные результаты, отражающие реальное содержание АгАТ в ткани плаценты и возможность сравнивать их между собой (Рисунок 37).

В данной работе из ткани плаценты были выделены резидентные АгАТ (плацента-ассоциированные АгАТ, плАгАТ) и был изучен профиль их специфичности в отношении широкого спектра гликанов. В пользу того, что изучаемые антитела являются резидентными, а не физически “задержавшимися” благодаря эффекту “молекулярных сит” (об этом механизме см. ниже), свидетельствуют следующие факты: 1) проводилась интенсивная энергичная промывка плаценты перед рН-элюцией антител; 2) наблюдается значительная разница репертуаров антител плаценты и периферической крови; 3) наблюдается сходство репертуаров плАгАТ у разных индивидуумов. Однако (учитывая второе упомянутое выше наблюдение), при значительной разнице есть и некоторое сходство репертуаров плАгАТ и АгАТ крови, поэтому нельзя полностью исключить наличия «задержавшихся» антител крови в составе истинно резидентных антител.

С плаценты элюировались только антитела класса G, в то время как IgM практически отсутствовали (IgA не исследовались), что не противоречит ранее опубликованным результатам (Gu J. et al., 2015; Gutierrez G. et al., 2005; Lekchnov E. A. et al., 2018). По данным немногочисленных исследований антител, элюированных с тканей плаценты установлено, что в их составе, кроме преобладающих IgG, в небольшом количестве содержатся IgM и IgA (Lekchnov E. A. et al., 2015). Для антител класса G, элюированных из ткани нормальной плаценты человека, исследована функциональная активность. В частности, описана каталитическая активность антител из элюатов в отношении молекул ДНК (их гидролиз), но, вместе с тем, антител, гидролизующих олигосахариды, в составе элюатов обнаружено не было.

ДНК-гидролизующие антитела (IgG) обладают цитотоксической активностью - они вызывают фрагментацию ядерной ДНК и индуцируют гибель клеток путем апоптоза (Lekchnov E. A. et al., 2018). Высказывается предположение, что благодаря особенностям гликозилирования, плацентарные IgG связывают антиген без инициации их эффекторных реакций, тем самым маскируя антиген от эффекторно-активных антител той же эпитопной специфичности. Это предполагает, что плацентарные IgG могут играть центральную роль в уклонении от иммунного ответа в плаценте (Gu J. et al., 2015).

Ранее было продемонстрировано, что в периферической крови новорожденных избирательно отсутствуют некоторые антитела его матери (Khasbiullina N. R. et al., 2019), предположительно из-за их фиксации в плаценте. Представленные данные по пЛАгАТ свидетельствуют о том, что их репертуар значительно уже, чем в периферической крови. Также показано, что в профиле имеются антитела характерные почти исключительно для плаценты, а уровень некоторых из них снижен при ПЭ. Эти наблюдения позволяют предположить, что тропность антител определенной специфичности в ткань плаценты обусловлена наличием там эпитопа, связывающего их. По-видимому, они выполняют протективную антиген-маскирующую функцию в плаценте. Хотя уникальных специфичностей, характерных исключительно для плаценты, или для нормальной беременности, или для ПЭ найдено не было, некоторые из них (описаны ниже) оказались в значительной степени селективными, то есть, идентифицировались (или наоборот, отсутствовали) у большинства лиц одной из обозначенных выше категорий. В Таблице 43 выявленные пЛАгАТ рассмотрены с точки зрения их: параллельной встречаемости в периферической крови; наличия патологии, что позволяет сделать предположения о функции этих антител.

К первому из четырех типов отнесены антитела, которые идентифицируются как в плаценте, так и в периферической крови того же индивидуума. Сюда отнесены антитела с высоким уровнем в крови. Поэтому, а также вследствие того, что общее количество специфичностей, элюированных из плаценты, слишком велико, было предположено существование механизма физической задержки антител в плаценте, основанного на эффекте молекулярных сит (Squire J. M. et al., 2001), который известен для гликокаликса. Элюция этих белков из плаценты при сдвиге величины pH, по-видимому, происходит из-за изменения размера пор тех «молекулярных сит», в которых белки удерживались при исходном нейтральном значении pH. Антитела к α Gal-эпитопу описаны в плаценте и ранее (Christiane Y. et al., 1992), однако, поскольку у человека отсутствует гликозилтрансфераза, осуществляющая биосинтез этого эпитопа, связывание антител этой специфичности с тканью плаценты должно иметь рациональное объяснение. Одним из объяснений является описанный выше эффект

“молекулярных сит”; альтернативным – появление в результате действия фукозидазы (для плаценты характерна гиперэкспрессия гликозидаз на антиген группы крови В, однако это противоречит наблюдаемой высокой частоте (22 элюата из 29 изученных) общемировой встречаемости групп крови (примерно 30% для общего количества людей с группами крови В и АВ). Поэтому, наиболее правдоподобной гипотезой, можно считать экспрессию в плаценте белкового мимотопы, в пользу чего свидетельствуют данные по связыванию человеческих анти- α Gal антител с ДНК (354) и с пептидным эпитопом муцина (Apostolopoulos V., Sandrin M. S., McKenzie I. F. C., 1999).

Таблица 43. Классификация антител, выделенных из плаценты, в зависимости от их встречаемости в крови здоровых беременных и беременных с ПЭ

Тип	Обнаруженные отличия*	Структуры гликанов**	Предполагаемая физиологическая функция	Комментарии
1	Антитела присутствуют как в крови, так и в плаценте #	Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β (пентасахарид Галили)	Антитела задерживаются в плаценте вследствие функционирования гликокаликса как “молекулярного сита”. Специфическое связывание с антигеном необязательно.	Это объяснение подтверждается тем фактом, что антитела с высоким уровнем, обнаруживаемые в крови, также обнаруживаются в плаценте.
2	Антитела присутствуют только в плаценте здоровых женщин, но отсутствуют в их крови#	GalNAc α -OSer (Tn), Neu5Ac β -Bn**, Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β (Le ^A), Gal β 1-3GalNGc α (TF(Gc)), GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-6)GlcNAc β	Антитела этих специфичностей при прохождении через плаценту полностью связываются с антигеном. Поскольку они отсутствуют в крови, предположительно они выполняют функцию блокирования антигена. Снижение или отсутствие их при патологии критично.	Частота выявления анти- Tn антител в плаценте и в крови при ПЭ низкая. Для остальных четырех антител не было различий между частотой встречаемости в норме и при ПЭ.
3	Антитела присутствует только в плаценте здоровых женщин#	GalNAc α -OSer (Tn)	При патологии способность вырабатывать эти блокирующие антитела утрачивается/снижается. Отсутствие этих защитных естественных антител является одной из причин патологии.	Специфичность анти-Tn-антител зависит от принадлежности человека к системе групп крови ABO.
4	Антитела избирательно отсутствуют в плаценте пациенток с ПЭ#	GalNAc α 1-3GalNAc β (Fs)	Специфичное для патологии отсутствие антигена в плаценте	Fs-дисахарид является терминальной частью пентасахарида Fs, который крайне редко встречается у людей. По-видимому, подобные гликаны являются частью молекулярных паттернов, которые избирательно отсутствуют в плаценте пациенток с ПЭ.

* упрощенные формулировки; на самом деле под «отсутствует» следует понимать как «отсутствует или встречается редко».

** Bn – бензильный остаток, C₆H₅CH₂ ; #по частоте встречаемости внутри соответствующей когорты

Второй тип (Таблица 43) – это антитела, обнаруживаемые почти у всех здоровых беременных в плаценте, но редко обнаруживаемые в крови тех же индивидуумов. Именно эти антитела следует рассматривать как кандидаты на функционально-значимое связывание в плаценте, в отличие от первого типа. Примечательно, но уровень всех антител указанных специфичностей, отнесенных ко второму типу у здоровых доноров (исследование пациентов вне беременности) по данным публикаций (Bovin N. et al., 2012; Huflejt M. E. et al., 2009; Khasbiullina N. R. et al., 2019) относительно низок; поэтому можно ожидать, что у включенных в исследование женщин до беременности он также был низок, а в результате беременности эти антитела имели высокий тропизм к плаценте. Необходимо также отметить, что кроме антигена Tn (о котором речь пойдет ниже), все остальные мишени антител второго типа являются “глико-монстрами” в том смысле, который предложен в работе (Bovin N. et al., 2012) , а именно:

- Neu5Ac β -Вn, бета-связанная нейраминовая кислота, а также бензильная группа в гликанах человека отсутствует, что позволяет предполагать, что эти антитела связываются в плаценте с неизвестным антигеном, а Neu5Ac β -Вn является его мимотопом;
- Le^A, является одним из антигенов системы Льюис, но изучение естественных антител человека к этому гликану (П. С. Обухова, неопубликованные данные) показало их необычную эпитопную специфичность, в частности, для связывания с гликаном наличия остатка фукозы не является обязательным, что исключает их отнесение к истинным антителам против антигена системы групп крови Льюис (Зиганшина М.М., 2016);
- TF(Gc), это опухолеассоциированный гликан Gal β 1-3GalNAc α , в котором N-ацетильная группа заменена N-гликолильной, которая не синтезируется клетками человека;
- GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-6)GlcNAc β является обычным фрагментом N-цепей гликопротеинов, непосредственно прилегающим к полипептидной цепи. Однако он никогда не встречается как таковой, а всегда элонгирован (то есть, маскирован) объемной углеводной цепью. Если наличие антител к нему связано со специфическим формированием в ткани плаценты этой укороченной цепи, то ее образование можно объяснить действием в плаценте эндо- β -маннозидазы, расщепляющей связь $\rightarrow$ в R-Man $\rightarrow$ GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-6)GlcNAc β , фермента существующего у других организмов, но не найденного у млекопитающих.

Полученные данные могут быть основанием для поиска этой укороченной цепи и эндо-фермента в плаценте.

Три из четырех эпитопов второго типа, а именно Neu5Ac β -Bn, Le^A и TF(Gc) нельзя отнести к аутоантигенам, поскольку они не встречаются у человека, и их биосинтез у человека невозможен (в случае Le^A – алло-зависим). Вследствие этого, их нельзя отнести к абберрантным гликанам, т.е., антитела второго типа, по-видимому, связывают белковые мимотопы.

Анти-Tn плаАгАТ в классификации, введенной в таблице 43 отнесены сразу к двум типам (2 и 3), поскольку они имеют дополнительную особенность – практически не обнаруживается у беременных с ПЭ, что подтверждено статистически ($p < 0,01$, Таблица 18). Поэтому относительно анти-Tn плаАгАТ можно предположить, что они являются фактором, способствующим нормальному течению беременности, а их отсутствие способствует развитию ПЭ, хотя и не является ее каузативным фактором. По-видимому, гликан Tn у больных ПЭ, в отличие от остальных антигенов второго типа, относится к абберрантным антигенам, как это описано для ряда карцином (Jiang Y. et al., 2018). Необходимо отметить, что антитела в крови человека, которые принято называть «анти-Tn» антитела, представляют собой довольно широкую по специфичности популяцию иммуноглобулинов, способных узнавать моносахарид GalNAc α , GalNAc α -содержащие олигосахариды, гликопептиды, либо даже пространственный эпитоп. Поэтому к какому из этих вариантов антигена направлены анти-Tn плаАгАТ, предстоит исследовать далее.

К четвертому типу отнесены антитела к гликану GalNAc α 1-3GalNAc β , т.е. терминальному дисахариду пентасахарида Форссмана (Fs). Пентасахарид Fs является составной частью гликофинголипида, который встречается у человека крайне редко, он определяет систему групп крови №31 (Svensson L. et al., 2013), и найден (только иммунохимически) при аденокарциноме (Smorodin E. et al., 2013). Антитела к дисахариду GalNAc α 1-3GalNAc β обнаруживаются у всех людей в очень высоком титре. В данном исследовании они обнаруживаются как в крови (здоровых беременных и беременных с ПЭ), так и в элюатах плаценты здоровых беременных, в то время как в элюатах плаценты при ПЭ они были выявлены только у 4 из 14 пациентов (различие между группами достоверно, Таблица 17, Таблица 18). Сравнение частоты встречаемости антител к GalNAc α -OSer (Tn) (см. выше) и антител к структурно родственному дисахариду GalNAc α 1-3GalNAc β (Fs) у здоровых vs. больных, а также беременных vs. небеременных оказалась совершенно иной,

т.е. это разные антитела. Причину их отсутствия в плаценте пациенток с ПЭ предстоит исследовать.

Кроме особенностей углеводной специфичности отдельного внимания заслуживает анализ изотипического состава пЛАгАТ, поскольку и при нормальной беременности и при ПЭ, преобладающим изотипом является IgG₁, причем в норме содержание этого изотипа выше, чем при ПЭ, а содержание других изотипов (IgG₂₋₄), напротив, снижено. Известно, что по уменьшению содержания в крови изотипы IgG здорового человека распределяются следующим образом: IgG₁, IgG₂, IgG₃ и IgG₄ (Schur P. H., 1988). Однако иммунный ответ на различные типы антигенов может смещаться в сторону одного из изотипов IgG, что наблюдается для белковых антигенов (предпочтительно IgG₁, менее часто IgG₃, иногда IgG₄) или углеводных антигенов - в частности, полисахаридов (IgG₂) (Vidarsson G., Dekkers G., Rispens T., 2014). Такой феномен описан также при некоторых инфекциях, например, вызываемых *Haemophilus influenzae* (преобладает IgG₁) (Ferrante A., Beard L. J., Feldman R. G., 1990). Адаптивные антигликановые антитела в крови преимущественно относятся к IgG₂ изотипу (Hammarström L., Smith C. I., 1983), хотя описаны случаи, когда стимулировалась продукция АгАТ других подклассов, в частности IgG₁ и IgG₃ (Hammarström L. et al., 1987). Опубликованные исследования изотипического состава иммуноглобулинового препарата для внутривенного введения (Сандроглобулин (Sandoglobulin) и Привиген (Privigen), Швейцария) свидетельствуют, что значительная часть антигликановых иммуноглобулинов была представлена изотипом IgG₂, но не ограничивалась им, что демонстрирует присутствие и других изотипов АгАТ в крови доноров (Gunten S. von et al., 2009). Охарактеризованный в нашем исследовании изотипический состав IgG для аффинно выделенных АгАТ из аптечного иммуноглобулинового препарата характеризуется преобладанием IgG₂ изотипа, что согласуется с вышеописанными данными.

Изотипы IgG различаются по способности инициировать эффекторные механизмы. Как правило, IgG₁ и IgG₃ являются мощными триггерами эффекторных реакций: инициируют активацию комплемента, имеют высокую аффинность связывания с FcγR иммунных клеток. Напротив, аффинность связывания FcγR с IgG₂ и IgG₄ значительно ниже, так же, как и их способность активировать комплемент (Vidarsson G., Dekkers G., Rispens T., 2014). В отдельных случаях, тем не менее, IgG₂ активирует комплемент, особенно при высокой плотности распределения фрагментов антигена, как это бывает в случае полисахаридов (Saeland E. et al., 2003; Vitharsson G. et al., 1994) - IgG₂ с большей

вероятностью образует гексамеры, за счет которых повышается его авидность к C1q (Diebolder C. A. et al., 2014).

Внимания также заслуживает факт связывания разных изотипов IgG с FcRn, поскольку с помощью этого механизма осуществляется трансфер антител к плоду, а также часть антител находится в плаценте в связанном с FcRn состоянии, вследствие чего имеет длительный период полураспада (Roopenian D. C. et al., 2003). Согласно данным различных авторов, количественное распределение транспортируемых изотипов через плацентарный барьер представлено следующим образом: $IgG_1 > IgG_4 > IgG_3 > IgG_2$, т.е. перенос IgG_2 самый слабый (Palmeira P. et al., 2012). Однако имеются данные и о другом порядке трансфера изотипов: $IgG_1 > IgG_3 > IgG_4 = IgG_2$ (Clements T. et al., 2020). В любом случае – изотип IgG_1 имеет более высокий коэффициент переноса, чем IgG_2 , но объяснений этому пока нет, за исключением предположений, что этот эффект не является результатом конкуренции за связывание с FcRn определенного изотипа, а повторяет закономерность в крови здоровых людей, где IgG_1 доминирует. Значительно более низкий коэффициент трансфера IgG_2 был выявлен у пациенток с резус-конфликтом, которым вводился анти-резусный иммуноглобулин (Clements T. et al., 2020), что свидетельствует о нарушениях трансфера изотипов IgG при патологии беременности. Особого внимания заслуживает исследование, в котором проводилось количественное определение изотипов IgG в нормальной, доношенной плаценте, что в процентном содержании составило: IgG_1 (47,0), IgG_2 (39,5), IgG_3 (8,8) и IgG_4 (4,3) (Lekchnov E. A. et al., 2015) и продемонстрировало преобладание IgG_1 в тканях плаценты. Большая часть IgG была выявлена на базальной мембране трофобласта и связана с поверхностями микроворсинок и внутренней стенкой эндоцитозных пузырьков синцитиотрофобласта (Lekchnov E. A. et al., 2015). Несмотря на проведенные ранее исследования изотипического состава IgG в плаценте, изотипы антител отдельных специфичностей не определялись.

Как свидетельствуют данные, полученные в нашем исследовании, в аффинно выделенных анти-Галили антителах из элюата пациенток с нормальной беременностью также выявлено преобладание изотипа IgG_1 , что в общих чертах согласуется с результатами исследования (Lekchnov E. A. et al., 2015) (несмотря на то, что мишени этих антител неизвестны). Поскольку значительная часть IgG_1 фиксирована с рецептором на мембранах трофобласта, можно предположить, что этот изотип и попадает преимущественно в элюаты с нормальной плаценты. При ПЭ выявлено более низкое содержание IgG_1 и, напротив, более высокое содержание других изотипов, чем в элюатах плаценты здоровых пациенток, что может иметь патогенетическое значение, поскольку IgG_1 является преобладающим

подклассом IgG, проникающим от матери к плоду и осуществляющим защитные функции в противоинфекционном иммунитете новорожденного. Изменения соотношений изотипов в элюатах с плаценты пациенток с ПЭ может свидетельствовать о нарушениях плацентарного барьера, связанного с взаимодействиями антител с FcRn и преимущественной фиксацией рецептором антител не IgG₁ изотипа, как в норме, а IgG₂. Факт повышенного содержания изотипа IgG₁ “анти-Галили-антител в плаценте здоровых пациенток по сравнению с больными ПЭ свидетельствует об особой роли этих антител при беременности, потенциально протективном эффекте” (Долгополова Е.Л., 2023) и, по-видимому, участия в механизмах развития толерантности к плоду, что требует дальнейших исследований. Но, возможно, не столько изотип антител имеет значение в данном случае (руководствуясь изотипом, IgG₁ – имеет высокое сродство к FcγR и второй по силе активатор комплемента), сколько характеристики самой молекулы – в частности ее гликозилирование. Как было продемонстрировано в исследованиях (Sazinsky S. L. et al., 2008) и (Ha S. et al., 2011), характеристики связывания с FcRn, а также связывание антигена с Fab-фрагментами антитела одинаковы для асимметрично гликозилированного IgG₁ и для классически гликозилированной формы. Асимметрично гликозилированный IgG₁ характеризуется умеренным снижением (≈20%) связывания с C1q и демонстрирует значительно сниженное сродство к связыванию со всеми Fc-гамма-рецепторами (FcγRs), включая высокоаффинный FcγRI и низкоаффинный FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIA и FcγRIIB. Снижение сродства к FcγRs приводит к 3,5-кратному снижению антителозависимой клеточной цитотоксичности (Ha S. et al., 2011; Sazinsky S. L. et al., 2008).

Представленные данные позволяют предположить важную роль изотипов IgG пл-АгАТ в периферической толерантности, поскольку выявлены их отличия от изотипического состава IgG, содержащихся в пуле здоровых доноров, что требует дальнейших исследований, поскольку предусматривают аффинное выделение и тестирование антител определенного изотипа. Учитывая наиболее выраженную разницу в содержании антител изотипов IgG₁, IgG₂ и IgG₃ можно предположить условно благоприятное действие более высокого содержания анти-Галили-антител (IgG₁) в ткани плаценты и условно неблагоприятное действие тех же антител, особенно изотипа IgG₃, которые могут обладать цитотоксическими свойствами, поскольку их содержание повышено более, чем в 2 раза, по сравнению с контрольным образцом, и в 1,6 раза по сравнению с нормальной тканью плаценты.

Кроме изотипического состава, заслуживающим внимания фактом явились особенности специфичности АгАТ из разных источников (иммуноглобулиновый препарат,

полученный из пула небеременных здоровых доноров крови, плацента здоровых беременных, плацента пациенток с ПЭ), которые направлены к “условно одинаковым мишеням”. Несмотря на то, что антитела из трех независимых источников выделялись на аффинном сорбенте с идентичным иммобилизованным гликаном, профили их специфичности значительно различаются. Необходимо еще раз акцентировать внимание, что антитела, которые были выбраны по результатам межгрупповых сравнений пЛАгАТ у здоровых беременных и беременных с ПЭ, имеют мишени, которые можно обозначить как “необычные”. Частично, о них уже упоминалось выше, при обсуждении специфичности пЛАгАТ, выявленных в межгрупповом сравнении антител из элюатов плаценты пациенток с нормальной беременностью и ПЭ. В частности, трисахарид $\text{Gal}\alpha 1\text{-3Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}$, называемый в литературе «антиген Галили» или упрощенно αGal -антиген, является ксеноантигеном и, так же как и антитела к нему - естественные анти- αGal ксено-антитела, достаточно широко изученные в связи с повышенным интересом, который они вызывают в ксенотрансплантологии. Несмотря на отсутствие экспрессии этого гликана на клетках здорового человека, отмечается экспрессия эпитопов, узнаваемых естественными анти- αGal антителами (связывают минимальный фрагмент ксеноантигена – дисахарида $\text{Bdi Gal}\alpha 1\text{-3Gal}\beta 1\text{-}$) (Зиганшина М.М. и др., 2020) на некоторых опухолевых клетках, а также интерстициальном и внутрисосудистом трофобласте в процессе развития фетоплацентарной системы у человека. Считается, что экспрессия этих эпитопов может быть связана с началом инвазии трофобласта и увеличением содержания циркулирующих анти- αGal -антител у пациенток с ПЭ (Christiane Y. и др., 1992).

Несмотря на часто используемый термин «анти- αGal антитела», многочисленные исследования позволили установить, что специфичность анти- αGal -антител не ограничивается узким набором гликанов, в частности, В дисахаридом (Bdi), антигеном Галили и группоспецифическим антигеном В (Зиганшина М.М., 2016; Ni Y. et al., 2000; Obukhova P., Rieben R., Bovin N., 2007). Результаты, описанные в (Cooper D. K. C., 1998; Obukhova P., Rieben R., Bovin N., 2007; Wieslander Jö. et al., 1990; Yeh P. et al., 2010), и данные Консорциума по функциональной гликомике (CFG, <http://www.functionalglycomics.org>) свидетельствуют, что периферическая кровь человека содержит широкий спектр родственных антител против так называемых «не- $\text{Gal}\alpha 1\text{-3Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta$ αGal -терминированных» гликанов, а также против антигенов группы крови В (Dobrochaeva K. et al., 2021).

Второе антитело, которое было отобрано для аффинного выделения и имеет также мишень, которую можно отнести к “необычной” - анти-Tn-антитела, мишенью которых является гликан Tn (CD175, GalNAc α). Гликан Tn экспрессируется на эритроцитах пациентов с редким Tn-синдромом (приобретенная гемолитическая анемия, для которой характерен эффект полиагглютинации эритроцитов под действием естественных анти-Tn-антител, обусловленной наличием гликана Tn) (Зиганшина М.М. и др., 2020). Высокая частота экспрессии этого гликана отмечается при различных злокачественных новообразованиях, включая рак молочной железы, легких, опухоли желудочно-кишечного тракта различной локализации и др. и объясняется незавершенностью биосинтеза О-цепей гликопротеинов в быстро растущих опухолевых клетках. Было установлено, что минимальным эпитопом антигена Tn является моносахарид GalNAc α , но структура Tn как антигенной детерминанты более сложная и включает аминокислоты. Имеются также указания на то, что для связывания с антителами необходима кластеризация нескольких остатков GalNAc α (Blixt O. et al., 2012; Matsumoto-Takasaki et al., 2012).

Третье “необычное” антитело, анти-Neu5Ac β антитела, способные связывать олигосахариды, отличающиеся от типичных сialiлированных гликанов млекопитающих только тем, что природная α -гликозидная форма Neu5Ac заменена на β Neu5Ac, которая не встречается в природе. Однако в крови здорового человека эти антитела (IgG) детектируются в умеренном количестве, причем и у отдельных доноров детектируется спорадически высокий их уровень (Deng L., Chen X., Varki A., 2013). Причина их присутствия, а также что является триггером их продукции у здоровых людей, непонятны. Т.е. все антитела, выделенные аффинно и направленные к мишеням, которые отсутствуют у человека (в норме, либо не могут экспрессироваться ввиду инактивации гена фермента), или неизвестна причина, вызывающая продукцию антител к ним, также как нет информации об их мишенях у человека.

В нашем исследовании был использован подход, аналогичный продемонстрированному в (Dobrochaeva K. et al., 2021). Этот подход основан на аффинном выделении АгАТ, в частности, выделении анти- α Gal-антител на сорбенте с Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -PAA-Sepharose 6FF с последующим профилированием их специфичности на гликановом эррее, что является предпочтительным перед профилированием сыворотки крови, поскольку во втором варианте наблюдается конкуренция широко представленных “Галили-подобных” антител с истинными (Dobrochaeva K. et al., 2021). Аналогичный подход с использованием GalNAc α -PAA-Sepharose 6FF сорбента был применен в (Dobrochaeva K. et al., 2020a). В нашем исследовании для всех трех антител проводилось

аффинное выделение на колонке с сорбентом X-Sepharose 6FF с иммобилизованным гликаном, где X – трисахарид Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β , моносахарид GalNAc α , или Neu5Ac β -Bn.

Вследствие очень низкого содержания анти-Tn и, особенно, анти-Neu5Ac β -Bn антител в тканях плаценты, необходимого количества выделенных антител для исследования специфичности не было получено. В этом исследовании на примере антител анти-Галили, выделенных в достаточном количестве, было проведено сравнение специфичностей, полученных из трех источников: иммуноглобулинового препарата и плаценты пациенток с нормальной и осложненной ПЭ беременностью. Результаты показали, что для антител анти-Галили, выделенных на одной колонке, но из разных биологических источников, профили специфичности антител различались. Также установлено, что профиль специфичности антител анти-Галили зависит от группы крови пациентки, что вполне объяснимо, поскольку известно, что люди с группами крови А и 0 имеют в крови перекрестно-реактивные антитела к Галили и антигену В (Dobrochaeva K. et al., 2021). Также стоит отметить, что профиль специфичности антител анти-Галили из иммуноглобулинового препарата является широким и включает как антигены Галили, так и другие α Gal-терминированные (не Галили) гликаны, а также неродственные структуры, что согласуется с (Dobrochaeva K. et al., 2021). Примечательный факт: у пациенток с ПЭ, профиль специфичности анти-Галили антител также широкий, но в нем присутствуют, кроме антител к аналогичным гликанам, обнаруженным в профиле антител из иммуноглобулинового препарата, антитела к структурам гликанов, не содержащих остаток α Gal-, в частности, к Gal β 1-3GlcNAc α -терминированным структурам. Особый акцент нужно сделать на различия в профилях специфичности антител анти-Галили, выделенных из элюатов нормальной плаценты и плаценты пациенток с ПЭ: профиль специфичности антител при ПЭ значительно шире, чем при нормальной беременности у женщин с одинаковой группой крови. Это позволяет предположить наличие в тканях плаценты при ПЭ гликанов, отличающихся от нормальных и вызывающих реакции хронического отторжения. Причем, необходимо обратить внимание на наличие в спектрах специфичности антител из элюата здоровой пациентки 0(I) группы крови антигенов Галили, и отсутствие этих антигенов у пациентки с группой крови А(II). Т.е. антигены Галили, являющиеся ксеноантигенами, могут присутствовать в профиле мишеней для связывания на гликановом эррее анти-Галили антител из элюата нормальной плаценты с доношенной неосложненной беременностью, но не являются постоянным элементом профиля (повторяющегося от пациента к пациенту). По-видимому, антигены-мишени этих антител

в тканях нормальной плаценты, не являются истинными антигенами Галили, т.к. в противном случае вероятны реакции отторжения вследствие чужеродности, а являются мимотопами (Зиганшина М.М. и др., 2020). Напротив, широкая панель гликанов, связывающих анти-Галили антитела, выделенные из ткани плаценты пациенток с ПЭ, указывают на существование большого числа мишеней по структуре не родственных антигенам Галили и α Gal-терминированным гликанам. Вероятно, именно они могут быть причиной реакции отторжения, цитолиза и цитотоксичности. Эти предположения подтвердились экспериментально при окрашивании ткани плаценты выделенными анти-Галили антителами.

Мишени для анти-Галили антител были подтверждены как для нормальной, так и для патологической тканей плаценты от пациенток с ПЭ и ЗРП (Рисунок 53). Но их гистотопография и характер окрашивания после селективной ферментативной обработки, удаляющей терминальные α Gal- эпитопы, свидетельствует, что в ткани нормальной плаценты отсутствуют α Gal-терминированные структуры гликанов, поскольку интенсивность окрашивания ткани и топография мишеней не изменилась после действия фермента (Зиганшина М.М. и др., 2022a). Аналогичная техника в тканях патологической плаценты показала, что характер окрашивания, и расположение мишеней анти-Галили антител отличаются от ткани нормальной плаценты. Воздействие α -галактозидазы сократила интенсивность сайтов окрашивания гликоконъюгатов в структурах плаценты при ПЭ; при ЗРП сайты окрашивания были полностью редуцированы. Эти данные демонстрируют наличие α Gal-эпитопов в структурах плаценты у пациенток с ПЭ и ЗРП, которые имеют особенности гистотопографии в плаценте и количественного содержания, что имеет патогенетическое значение. Примечательно, что анти-Галили антитела в *in vitro* модели активации эндотелиальных клеток не продемонстрировали функциональной активности, что, однако не исключает других эффектов этих антител, в том числе и системных, но в данном случае, может быть доказательством их преимущественно локального эффекта в плаценте.

Исследование специфичности анти-Tn антител было ограничено антителами, выделенными из иммуноглобулинового препарата и элюата плаценты пациентки с нормальной беременностью. В общих чертах, профиль специфичности анти-Tn антител из первого источника, совпадал с профилем, описанным в (Dobrochaeva K. et al., 2020a); профиль специфичности антител из элюата был более узкий. Причем, если в первом случае в топе специфичности выявляются GalNAc α -терминированные гликаны, то во втором – только сульфатированный GalNAc α , и активность связывания с ним была относительно

невысокой. В ранее упомянутом исследовании было показано, что естественные анти-GalNAc α -антитела и антитела, вырабатываемые в ответ на опухолеассоциированный Tn-антиген, имеют разные профили связывания гликанов (Dobrochaeva K. et al., 2020a). Однако не удалось выявить мишень этих антител в плаценте и их функциональную активность в *in vitro* модели. Тем не менее, обнаружение анти-Tn антител в значительных количествах в элюатах нормальной плаценты и их почти полное отсутствие в элюатах плаценты после ПЭ свидетельствует об их важной роли в плаценте. Вероятно, эти антитела распознают пространственный эпитоп или молекулярный паттерн, который присутствует в нативной ткани, но изменяется при фиксации в процессе подготовки к гистохимическому исследованию. Поскольку мишень для естественных анти-Tn антител включает значительный пептидный фрагмент (Dobrochaeva K. et al., 2020a) помимо моносахаридного, нельзя исключить возможность того, что конформационные изменения при пробоподготовке ткани влияют на связывание с мишенью в плаценте. Предшествующие исследования антигена Tn свидетельствуют, что он представляет собой большое семейство О-гликопептидов, имеющих общий мотив GalNAc α , но имеющих разные пептидные части (Dobrochaeva K. et al., 2020a). Вследствие этого, выявление мишеней для анти-Tn антител и их функции при беременности является отдельной задачей для будущих исследований.

Особого внимания заслуживают результаты выявленного биологического эффекта анти-Neu5Ac β антител на клетки в *in vitro* экспериментах. Как уже отмечалось, эти антитела выявляются и у здоровых людей, причем в отдельных случаях в высоких титрах. Их мишени в организме не описаны. Данные, представленные в нашем исследовании, демонстрируют, что в элюатах с нормальной плаценты выявляется низкое количество антител к бензильному производному β -N-ацетилнейраминовой кислоты (анти-Neu5Ac β -Вп антител), которых в элюатах плаценты пациенток с ПЭ находится еще меньше. Поэтому выделить их из плацентарной ткани в достаточном количестве не представлялось возможным. Изучение специфичности, окраска плаценты и тесты в *in vitro* модели на клетках были проведены с антителами, выделенными из иммуноглобулинового препарата. Как уже было указано в разделе “Результаты”, их специфичность была очень узкой по сравнению с выделенными из того же источника анти-Галили и анти-Tn антителами, а их активность связывания с лигандами на гликочипе - невысокой. В профиле специфичности преобладают олигосахариды, содержащие нейраминовую кислоту в бета-конфигурации, причем связывание с Neu5Ac β относительно невысокое, что незначительно превышает фоновое связывание.

Выделенные антитела не демонстрировали окрашивания ткани плаценты, но оказывали выраженный эффект на клетки перевиваемой линии EA hy.926, которая фенотипически близка клеткам крупных сосудов человека и является линией клеток пупочной вены человека, созданной путем слияния первичных клеток эндотелия пупочной вены с клетками линии A549 (аденокарцинома альвеолярных базальных эпителиальных клеток человека). Как свидетельствуют результаты, предобработка клеток этими антителами до их активации провоспалительным цитокином TNF α сокращала экспрессию активационного маркера CD54 (ICAM-1) в 4,6 раз. Как известно, экспрессия ICAM-1 на эндотелии является конститутивной, но при воспалении происходит гиперэкспрессия этого маркера. Эндотелиальный ICAM-1 является важным медиатором воспаления. Он опосредует адгезию лейкоцитов к эндотелию в условиях воспаления, экстравазацию и миграцию в воспалительный очаг (Frank P. G., Lisanti M. P., 2008). Эффект анти-Neu5Ac β антител в *in vitro* модели, установленный в диссертационном исследовании, свидетельствует, что их присутствие в среде культивирования до воздействия цитокина на клетки является регуляторным, и в условиях *in vivo* может быть сдерживающим фактором, который контролирует избыточную активацию эндотелия и проявления воспалительной реакции. Однако, как показывают данные, высокие концентрации этих антител (в данном случае 10 мкг/мл и частично 5 мкг/мл) (Рисунок 59) оказывают негативный эффект на клетки, вызывая их избыточную гибель. По-видимому, этим обуславливается низкое содержание антител в ткани нормальной плаценты. В иммуноглобулиновом препарате их содержание было также невелико. Однако более низкое, по сравнению с нормой, содержание анти-Neu5Ac β антител в ткани плаценты пациенток с ПЭ, свидетельствует о недостаточном содержании фактора, осуществляющего контроль провоспалительного статуса сосудов плаценты, что имеет патогенетическое значение. Отсутствие окрашивания ткани плаценты анти-Neu5Ac β антителами в данных методических условиях, по-видимому, не отражает реальной картины, поскольку, в связи с низким содержанием антител в плаценте интервал детекции этих антител находится за пределом чувствительности метода. Важным результатом явился также выявленный эффект снижения экспрессии CD54 при пред-активации TNF α эндотелиальных клеток (Рисунок 58). Полная замена среды с удалением TNF α и внесением анти-Neu5Ac β антител (Рисунок 58) также оказывает эффект снижения экспрессии активационного маркера CD54 клетками, что является указанием на терапевтический эффект этих антител, позволяющий снизить последствия активационного стресса.

Эффект анти-Neu5Ac β антител на клетки линии EA hy.926 зависит от дозы антител использованной в эксперименте. Определены диапазоны концентраций антител данной специфичности, которые 1) снижают долю CD106-позитивных клеток (при сохранении значения параметра СИФ) (Рисунок 60), 2) снижают экспрессию маркера CD54 клетками (Рисунок 61), 3) повышают экспрессию CD62E эндотелиальными клетками (возрастают оба параметра: СИФ и % позитивных клеток, экспрессирующих маркер CD62E, Рисунок 62). Эти данные демонстрируют наличие функциональной активности анти-Neu5Ac β антител и свидетельствуют об их выраженном биологическом эффекте, который ассоциирован с воздействием на эндотелиальные клетки.

Т.о. установленные на предыдущем этапе исследования факты, демонстрирующие измененный гликотип плаценты, наличие в структурах плаценты гликанов, которые могут являться факторами активации иммунной системы, и инициировать реакции отторжения, а также измененный спектр резидентных пЛАгАТ свидетельствуют о нарушении функционирования гликан-зависимых механизмов, способствующих формированию периферической толерантности к плоду при беременности, осложненной ПЭ и ЗРП. Т.о. доказано развитие гликопатологии не только в плаценте, но и в иммунной системе матери - ключевых звеньях функциональной системы мать-плацента-плод. Следующий этап исследования был посвящен изучению механизмов центральной толерантности у матери и новорожденного: особенностям функционирования клеточного и гуморального звеньев иммунной системы. Особый акцент был сделан на изучении особенностей иммунной реактивности новорожденных, родившихся от матерей с нормальной и осложненной беременностью. В частности, исследованию особенностей клеточных и гуморальных иммунных факторов, которые отражают функционирование иммунной системы новорожденного, и могут быть следствием трансфера от матери к плоду различных молекул, в том числе растворимых белков, патологических антител и др. Факторы, транспортируемые от матери, могут вызывать иммунный прайминг новорожденного, регулировать развитие и численность определенных субпопуляций иммунокомпетентных клеток, обуславливая иммунологические особенности адаптации новорожденных после осложненной беременности.

4.3. Патогенетические особенности системного иммунитета (клеточное звено) у беременных с ПЭ и их новорожденных

Как известно, иммунная система новорожденного по ряду параметров существенно отличается от иммунной системы взрослого человека. Доказано, что в раннем неонатальном периоде у младенца преимущественно развиты иммунные реакции,

обеспечивающие толерантность к аллогенным влияниям со стороны материнского организма, которые также способствуют снижению риска патологических воспалительных реакций против комменсалов, колонизирующих кишечник младенца и слизистые оболочки сразу после рождения (Harbeson D. et al., 2018). Иммунная система младенца медленно адаптируется к новой среде, где необходим контролируемый воспалительный ответ, который служит для защиты от патогенов (Pieren D. K. J., Boer M. C., Wit J. de., 2022). Наряду с высоким содержанием субпопуляций регуляторных и супрессорных клеток, у новорожденных наблюдается выраженное развитие гуморального и клеточного звеньев врожденной иммунной системы, отвечающих за противодействие патогенам различной природы, в частности, отмечается значительное содержание отдельных субпопуляций эффекторных клеток и неспецифических гуморальных факторов, включая белки-факторы бактерицидности и естественные антитела (Sedney C. J., Harvill E. T., 2023). Адаптивное звено иммунной системы новорожденного характеризуется особенностями развития провоспалительного Th1-ответа (сниженный Th1-ответ) и преобладание противовоспалительных Th2-реакций, что способствует поддержанию толерантности. Неонатальные CD8⁺ и CD4⁺T-клетки осуществляют эффекторные функции и включаются в защиту от патогенов (Whiteside S.K. et al., 2018). Наряду с эффекторными клетками и Th2-поляризацией адаптивного иммунного ответа, у младенцев выявляется высокое количество наивных T- и B-клеток, низкое – клеток памяти (Pieren D. K. J., Boer M. C., Wit J. de., 2022). В процесс противoinфекционной защиты значительный вклад вносят IgG антитела, транспортируемые плоду от матери внутриутробно (Ochola R. et al., 2009), поскольку продукция собственных иммуноглобулинов у новорожденного очень низкая. Высказываются предположения, что высокое содержание материнских антител может тормозить продукцию собственных специфических иммуноглобулинов, что наблюдается, в частности, при вакцинации младенцев (Pieren D. K. J., Boer M. C., Wit J. de., 2022). Популяции иммунных клеток врожденной и адаптивной иммунной системы приобретают полный набор компетенций постепенно, к двум годам жизни, сохраняя при этом особенности, которые исчезают после пубертатного периода ((Sedney C. J., Harvill E. T., 2023). Но к моменту рождения, преобладание супрессорных, противовоспалительных реакций и состояние анергии на аллогенные влияния, является нормой. Однако, отклонение от этого состояния, в частности, связанное с развитием активированных фенотипов свидетельствует о патологии.

В связи с общей супрессорной направленностью иммунных реакций новорожденного, очевидно, что регуляторные клетки должны присутствовать в их крови в

значительном количестве. В этой связи была сформирована панель моноклональных антител для фенотипирования основных субпопуляций клеток, с акцентом на активированные клетки и клетки с фенотипом регуляторных. Иммунофенотипирование клеток проводилось в парах мать – новорожденный для выявления закономерностей развития иммунной системы новорожденных у матерей с нормальной и осложненной беременностью и особенностями иммунного реагирования. В период беременности основным местом локализации регуляторных и активированных клеток является плацента – область аллогенного контакта матери и плода, однако и в крови матери обнаруживается значительное количество популяций Т-клеток, для которых аллогенные антигены являются стимулом для пролиферации и активации (Krop J. et al., 2020).

В данном исследовании фенотип Т(рег)-клеток был определен как $CD3^+CD4^+CD25^{bright}CD127^{low\ to\ neg}$ без стадии пермеабиллизации клеточной мембраны для окрашивания FoxP3, поскольку известно, что популяция Т(рег)-клеток имеет указанный фенотип (Seddiki N. et al., 2006b). В этой популяции не проводилось выделение субпопуляций, в частности $CD45RA^+$ наивных Т(рег)-клеток, которые, как известно, преобладают у новорожденного (Pieren D. K. J., Boer M. C., Wit J. de., 2022), и $CD45RO^+$ Т(рег)-клеток памяти, которые “составляют 70% пула Т(рег)-клеток в периферической крови и 97,9% в эндометрии во время беременности, оказывая протективное толлерогенное влияние на плод (Chen Z. et al., 2023). Результаты нашего исследования свидетельствуют, что по содержанию основных субпопуляций Т-клеток” (Хасбиуллина Н.Р., 2019) (Т-хелперов и Т-цитотоксических клеток) в периферической крови матерей и пуповинной крови новорожденных пациентки с физиологической беременностью и ПЭ и их новорожденные были сопоставимы. В периферической крови женщин с ПЭ не изменено также содержание Т-клеток с фенотипом регуляторных $CD3^+CD4^+CD25^{bright}CD127^{low\ to\ neg}$. В пуповинной крови содержание Т(рег)-клеток было выше у новорожденных, рожденных от матерей с ПЭ (пограничный уровень значимости, $p=0,051$). Полученные результаты не противоречат мировым данным, поскольку данные систематического обзора и мета-анализа (Green S. et al., 2021) демонстрируют, что при поздней ПЭ в трех независимых исследованиях выявляется незначительная значимая разница, свидетельствующая о более низком содержании Т(рег)-клеток. По данным того же систематического обзора при преждевременных родах продемонстрировано как значимое снижение Т(рег) при осложненной беременности, так и отсутствие различий в их содержании по сравнению с нормой. Отмечается, что на результаты оказывает влияние размер выборки, особенно при относительно небольших различиях в содержании Т(рег)-клеток в крови беременных

(Green S. et al., 2021). В данном исследовании не определялся фенотип наивных T(рег)-клеток и T(рег)-клеток памяти, поэтому общая популяция T-клеток с фенотипом регуляторных $CD3^+CD4^+CD25^{bright}CD127^{low\ to\ neg}$ (T(рег)) может не отражать изменений, которые выявляют при анализе субпопуляций, более представленных в раннем неонатальном возрасте и у взрослых. Тем не менее, выявленное повышение T-клеток с фенотипом регуляторных в пуповинной крови новорожденных от матерей с ПЭ указывает на наличие активационных стимулов, способствующих развитию эффекторных субпопуляций клеток.

В нашем исследовании было обнаружено значительное увеличение активированных Т-хелперов как в периферической крови матерей (с погранично значимыми различиями), так и в пуповинной крови новорожденных с перинатальной патологией от матерей с ПЭ (с значимыми различиями). Стерильное воспаление, которое развивается в плаценте, является стимулом для активации иммунной системы матери и плода. Выраженные признаки активации Т-хелперов в пуповинной крови являются свидетельством раннего внутриутробного праймирования эффекторных “Т-клеток, вследствие воздействия DAMPs, образованных в результате ишемии плацентарной ткани, что ведет к экспансии Т-клеток с фенотипом регуляторных и эффекторных $CD127^+$ Т-клеток у новорожденного.

Полученные в нашем исследовании результаты демонстрируют тенденции к повышению содержания у матерей с ПЭ и их новорожденных как общей популяции цитотоксических $CD3^+CD8^+$ Т-клеток, так и $CD3^+CD8^+CD28^-$ Т-клеток с фенотипом регуляторных, а также эффекторных $CD3^+CD8^+CD28^+$ Т-клеток. Данные являются указанием на стимуляцию Т-клеточного ответа и развитие субпопуляции высокодифференцированных Т-клеток” памяти (Зиганшина М.М, 2016), что может быть связано с влиянием провоспалительного микроокружения, в котором происходит их формирование у новорожденных и экспансия у матерей с ПЭ. Относительно функции этих клеток сложно сделать однозначное заключение, поскольку экспрессия дополнительных маркеров, а также их цитокинпродуцирующая способность не исследовались. Несмотря на выявленные тенденции, отсутствие значимых различий между группами в содержании $CD3^+CD8^+CD28^{+/-}$ Т-клеток в пуповинной и периферической крови может быть следствием недостаточной мощности исследования. Альтернативным объяснением сопоставимого количества этих клеток между группами может быть влияние высокого уровня IL-6 в периферической крови матерей с ПЭ и пуповинной крови их новорожденных, выявленного в данном исследовании. IL-6, по данным литературы, является стабилизирующим фактором, поддерживающим баланс между супрессорными и эффекторными

субпопуляциями в популяции $CD3^+CD8^+$ Т-клеток при ПЭ, поскольку известно, что между содержанием IL-6 и содержанием субпопуляций $CD3^+CD8^+CD28^{+/-}$ Т-клеток в крови установлены корреляционные связи. В частности, высокое содержание IL-6 реципрочно регулирует количество “ $CD3^+CD8^+CD28^+$ Т-клеток, подавляя их развитие и стимулируя их к апоптозу у больных с СКВ (Minning S. et al., 2019); напротив, прямая связь между высоким содержанием IL-6 и количеством $CD3^+CD8^+CD28^-$ Т-клеток и его протекция этих клеток от апоптоза установлена при болезни Грейвса” (Долгополова Е.Л., 2023) (Slowik M. et al., 2012), что подтверждено и в *in vitro* исследованиях (Li H. et al., 2020a).

При исследовании NK-клеток акцент был сделан на субпопуляцию $CD56^{bright}$ -NK-клеток, экспрессирующую CD127, поскольку известно, они проявляют регуляторную функцию (NK(рег)-клетки) (Zhang C., Zhang J., Tian Z., 2006). Полученные результаты демонстрируют, что у беременных с ПЭ и их новорожденных содержание $CD3^-CD56^+$ NK-клеток было сопоставимо с группой сравнения. Содержание субпопуляции $CD56^{bright}CD127^+$ NK-клеток как у беременных, так и у новорожденных демонстрировало тренд к более высокому содержанию в норме, чем при ПЭ, не достигая уровня значимости.

В периферической крови матери и пуповинной крови были идентифицированы естественные Т-киллеры (NKT), сходные с NK- и Т-клетками по морфофункциональным характеристикам. Интерес к этой группе клеток вызван их способностью связываться с гликолипидами, в частности, с неполиморфной молекулой CD1d, которая подобна HLA класса I и содержит в составе гликаны (Rout N., Kaur A., 2014). Молекулы CD1d экспрессируются в фетоплацентарной системе – на клетках трофобласте и в децидуальной оболочке (Boyson J. E. et al., 2002; Shimada S., 2004). Связывание NKT-клеток с Т-клеточным рецептором стимулирует продукцию цитокинов Th1 и Th2-спектра, в частности, иммунорегуляторного цитокина IL-10 (Хасбиуллина Н.Р., 2019; Hashemi V. et al., 2017). Представленные в нашем исследовании результаты демонстрируют отсутствие значимых межгрупповых различий в содержании NKT-клеток (фенотипически идентифицируемых как $CD3^+CD56^+$ -клетки) как в периферической крови матерей с ПЭ, так и в пуповинной крови их новорожденных по сравнению с нормой. Наблюдается тенденция, демонстрирующая более низкое (в 2 раза) содержание этих клеток у новорожденных, рожденных от матерей с ПЭ. У матерей, напротив, - тенденция демонстрирует более низкое число NKT-клеток у женщин с физиологической беременностью. Полученные результаты не противоречат данным, описанным в литературе. Поздняя ПЭ характеризуется менее выраженными изменениями в иммунной системе, чем ранняя, при которой перинатальные и неонатальные исходы более тяжелые. Отсутствие изменений компартмента NK- и NKT-

клеток у женщин с ПЭ и их новорожденных, свидетельствуют об отсутствии выраженных реакций гиперактивации при позднем клиническом фенотипе ПЭ.

Отдельного внимания заслуживают результаты анализа больших и малых субпопуляций В-клеток у матерей и их новорожденных, т.к. периферические В-клетки на различных стадиях созревания, от транзиторных до В-клеток памяти, остаются мало охарактеризованной популяцией в этих когортах (Lima J. et al., 2016). Известно, что при беременности численность В-клеток значительно изменена по сравнению с небеременными, поскольку при беременности развивается физиологическая В-клеточная лимфопения вследствие иммуносупрессивного влияния половых гормонов и направленной миграции В-клеток в фетоплацентарную систему, что способствует развитию толерантности к плоду (Lima J. et al., 2016; Muzzio D., Zenclussen A. C., Jensen F., 2013). Традиционно, роль В-клеток при беременности рассматривается в двух аспектах: 1) как продуцентов протективных (блокирующих) или патологических (ассоциированных с патологией) антител (Magatti M. et al., 2021; Muzzio D., Zenclussen A. C., Jensen F., 2013); 2) как клеток с регуляторной активностью (Guzman-Genuino R. M., Diener K. R., 2017). У новорожденных роль В-клеток исследована недостаточно: их онтогенез и функциональная активность изучены в мышиных моделях, а особенности развития больших и малых субпопуляций у новорожденных, рожденных от матерей с осложненной беременностью не определены. В-клетки, выделенные из пуповинной крови новорожденных, сходны с В-клетками взрослых по фенотипу, но у детей их больше по относительному содержанию, а функциональная активность при этом снижена (Budeus B. et al., 2021), что отражает общую супрессорную направленность иммунных реакций, характерную для новорожденного.

В нашем исследовании мембранный фенотип В1 и В2 клеток определялся как $CD19^+CD5^+$ и $CD19^+CD5^-$, соответственно, а также был идентифицирован ряд малых субпопуляций В-клеток, что позволило описать особенности: как субпопуляционного состава В-клеточного звена иммунной системы у матери, так и развития В-клеток у новорожденного. Использование МАт к нескольким дифференцировочным антигенам и поверхностному рецептору В-клеток (CD45, CD19, CD27, CD38 и IgD) позволило определить фенотипы В-клеток различных стадий дифференцировки, которые они проходят после выхода из костного мозга: от транзиторных В-клеток до клеток памяти. Поскольку в настоящее время идентифицированы и описаны различные фенотипы В-клеток, в том числе множество фенотипов В-клеток памяти, в исследовании использованы несколько тактик гейтирования и основанных на них классификаций основных субпопуляций В-клеток периферической крови. Это позволило исследовать широкую

панель В-клеток, которые присутствуют в крови и различаются по степени зрелости и активационному “статусу. В частности, оценивались: 1) основные малые субпопуляции В-клеток по уровню экспрессии CD27 и CD38 (Prak E. T. L. et al., 2011); 2) субпопуляции В-клеток памяти (Вm) в линейке дифференцировки от наивных В-лимфоцитов (Вm1) до В-клеток памяти (Вm5) по экспрессии CD38 и IgD (Bohnhorst J. Ø. et al., 2001); 3) субпопуляции В-клеток памяти”(Елезов Д.С., 2015) по экспрессии CD27 и IgD, которые переключили, или еще не переключили класс продуцируемых антител (Duchamp M. et al., 2014).

Как свидетельствуют результаты (Таблица 23) у матерей с ПЭ содержание больших популяций В-клеток (В1- и В2-клеток), было не изменено по сравнению с женщинами с физиологическим течением беременности. Исследование малых субпопуляций у матерей с ПЭ “продемонстрировало изменения содержания В-клеток на разных стадиях дифференцировки, которые следуют за их выходом из костного мозга. Как известно, на периферии незрелые В-лимфоциты проходят несколько промежуточных стадий транзитных”(Супоницкая Е.В. и др., 2013) В-клеток, которые подвергаются антиген-независимой положительной и отрицательной селекции, редактированию генов BCR, в результате чего удаляются аутореактивные В-клеточные клоны, а часть клонов переходят в состояние анергии. Некоторая часть транзитных В-клеток затем дифференцируется в зрелые наивные В-клетки, которые, после активации антигеном, становятся антителопродуцирующими зрелыми В-лимфоцитами. Часть из них проходит окончательную дифференцировку в долгоживущие покоящиеся В-клетки памяти. Эти В-клетки памяти реагируют на антиген быстрее, чем наивные В-клетки с аналогичной специфичностью (Wu Y.-C. B., Kipling D., Dunn-Walters D. K., 2011).

В-клетки, идентифицированные в данном исследовании как транзитные $CD19^+CD38^{++}CD27^-$ и наивные зрелые $CD19^+CD38^+CD27^-$, демонстрировали значимо повышенное содержание в периферической крови матерей с ПЭ (в 5,5 раз и в 1,8 раз, соответственно). Выявленное одновременное повышение обеих субпопуляций закономерно, поскольку транзитные В-клетки являются предшественниками наивных, и активационный фактор стимулирует развитие обеих субпопуляций. Содержание популяции двойных негативных клеток $CD19^+CD38^-CD27^-$, напротив, было снижено в 2 раза (пограничный уровень значимости). Активированные зрелые В-клетки не различались между группами, но покоящиеся В-клетки памяти были в 3 раза значимо ниже у матерей с ПЭ.

Использование дополнительной техники показало, что у матерей с ПЭ снижено содержание девственно наивных В-клеток (Bm1, CD19⁺CD38^{low}IgD^{dim}) (пограничный уровень значимости), которые характеризуются появлением экспрессии IgD, сопровождающей выход В-клеток из костного мозга в периферическую кровь. Тенденцию к повышению демонстрируют активированные наивные В-клетки (Bm2, CD19⁺CD38^{dim}IgD^{dim}), которые проконтактировали со специфическим антигеном. Значимо высокое содержание (более чем в 2 раза) у матерей с ПЭ установлено для субпопуляции клеток-предшественников герминативного (зародышевого) центра (Bm2', CD19⁺CD38^{hi}IgD^{dim}), которые дифференцируются из Bm2-клеток, перемещающихся из кровеностного русла в фолликулы и характеризуются высокой экспрессией CD38. Субпопуляция клеток герминативного центра, дифференцирующихся из Bm2'-клеток (Bm3 и Bm4), которые последовательно дифференцируются в центробласты и центроциты и имеют чрезвычайно низкое содержание в периферической крови, была сопоставима между группами. Дальнейшая дифференцировочная программа, приводит к образованию "субпопуляций ранних и поздних В-клеток памяти (eBm5, CD19⁺CD38^{dim}IgD^{low} и Bm5, CD19⁺CD38^{low}IgD^{low}, соответственно), демонстрирующих сниженное содержание" (Супоницкая Е.В. и др., 2013) у беременных с ПЭ: субпопуляция Bm5 проявляла тренд к снижению, субпопуляция Bm5 была значимо ниже (в 28 раз) по сравнению с содержанием в крови здоровых беременных.

Поскольку классификация Bm1-Bm5 (Bohnhorst J. Ø. et al., 2001) обладает рядом недостатков, в частности, в субпопуляциях Bm1 и Bm2 могут обнаруживаться В-клетки с переключенными и непереключенными изотипами экспрессируемых иммуноглобулинов, а Bm2'-субпопуляция может содержать транзиторные В-клетки (Богданова И. М., Артемьева К. А., 2021), то для более точной характеристики В-клеток проводилось дополнительное фенотипирование по CD27 и IgD маркерам. Маркер CD27 конститутивно экспрессируется примерно в 40% В-клеток периферической крови человека. Он является членом семейства рецепторов TNF и является важным маркером активации, способствующим экспансии, дифференцировке В-клеток и стимуляции продукции антител посредством взаимодействия с лигандом CD70, экспрессируемым на поверхности активированных Т-клеток. Считается, что передача сигналов CD27-CD70 управляет передачей сигналов CD40-CD154 в герминативном центре для поддержания долговременной иммунологической памяти на Т-клеточно-зависимые антигены. Клетки памяти CD27⁺ присутствуют при рождении, а у здоровых взрослых они составляют примерно 5% популяции периферических В-клеток (Wu Y.-C. B., Kipling D., Dunn-Walters D. K., 2011).

Результаты показали, что переключенные В-клетки памяти с фенотипом $CD19^+CD27^+IgD^-$ демонстрировали в 3 раза более низкое содержание у матерей с ПЭ (пограничный уровень значимости). Высказываются предположения, что клетки памяти $CD27^+$ - это гипермутированные клетками вторичного иммунного ответа, что отличает их от $CD27^-$ клеток памяти, которые, вероятно, появляются при первичном иммунном ответе (Wu Y.-C. B., Kipling D., Dunn-Walters D. K., 2011).

Необходимо отметить, что в литературе присутствуют конфликтные результаты относительно малых субпопуляций В-клеток при ПЭ. В частности, в исследованиях (Liao A. H. et al., 2009; Magatti M. et al., 2021), были описаны результаты, свидетельствующие о повышении содержания В-клеток памяти с фенотипом $CD27^+CD38^-$ в периферической крови, а предшественников плазматических клеток $CD27^+CD38^+$ - как в крови, так и в клетках крови первичной культуры женщин с ПЭ при стимуляции *in vitro*, по сравнению с аналогичными клетками женщин контрольной группы. В исследовании (Zeng B. et al., 2013) отмечена отрицательная корреляция между Т(рег)-клетками и В-клетками памяти, характеризующаяся системным снижением Т(рег) и увеличением В-клеток памяти. В нашем исследовании фенотипирование субпопуляций В-клеток памяти проводилось тремя способами, в каждом из которых получены данные о снижении В-клеток памяти всех исследованных фенотипов у беременных с ПЭ. Известно, что в динамике неосложненной беременности наблюдается низкое содержание всех субпопуляций В-клеток периферической крови, фенотипированных по классификации Bm1-Bm5, которые повышаются только в послеродовом периоде (не менее 6 недель от момента родов) (Lima J. et al., 2016). Вероятно, что этот эффект является результатом механизма системного ограничения численности В-клеток при беременности вследствие их локальной экспансии в фето-плацентарную систему, и/или супрессии их пролиферации, в целях ограничения эффекторных реакций на аллоантигены плода. При ПЭ, по-видимому, развивается клональная супрессия некоторых субпопуляций В-клеток, поскольку исследования спектра антител в периферической крови матери и элюированных с ткани плаценты показали низкие уровни антител некоторых специфичностей.

Исследование субпопуляционного состава В-клеток в пуповинной крови выявило сопоставимые количества больших популяций В1- и В2-клеток между сравниваемыми группами новорожденных (Таблица 24). Однако у новорожденных от матерей с ПЭ наблюдался тренд к более низкому содержанию В1-клеток и, напротив, более высокому содержанию В2-клеток. Известно, что количество В1-клеток у взрослого человека и у новорожденного различно. В частности, у новорожденных выявляется более высокое

количество В1- и более низкое – В2-клеток (Medvinsky A., Rybtsov S., Taoudi S., 2011), что соответствует данным, полученным в нашем исследовании. В исследовании (Basha S., Surendran N., Pichichero M., 2014) отмечается, что в нормальных условиях большинство неонатальных В-клеток остаются наивными, поскольку они не подвергались антигенному воздействию и имеют лишь частично развитый репертуар поверхностных иммуноглобулинов. Это сказывается на их функциональной активности: незрелость В-клеток, ограниченный репертуар (недостаток или очень низкое содержание некоторых малых субпопуляций), снижение передачи сигнала через BCR и дефицит продукции антител (Basha S., Surendran N., Pichichero M., 2014). Указывается, что в младенчестве количество В-клеток остается стабильным в течение длительного времени. После года жизни общее число В-клеток уменьшается, “что коррелирует со снижением количества транзиторных и наивных В-клеток. Напротив, количество непереключаемых и переключаемых В-клеток памяти увеличивается (Prak E. T. et al., 2011).

Полученные результаты свидетельствуют, что” (Супоницкая Е.В. и др., 2013) у новорожденных от матерей с ПЭ отсутствуют изменения не только в содержании больших, но и малых субпопуляций В-клеток. Все изменения описываются как тенденции, но заданного уровня значимости достигнуто не было. Субпопуляция наивных В-клеток являлась преобладающей среди общего числа В-клеток, что соответствует описанным в литературе наблюдениям. Пограничный уровень значимости был установлен для субпопуляции наивных зрелых В-клеток с фенотипом $CD19^+CD38^+CD27^-$, которые дифференцируются из транзиторных В-клеток, мигрируют в региональные лимфоузлы, образуя В-зону первичного фолликула. Эти клетки характеризуются отсутствием CD27, экспрессируемого популяцией В-клеток памяти, но умеренной экспрессией CD38, что характерно для зрелых активированных и фолликулярных В-клеток (Zeng F. et al., 2022). Наивные зрелые В-клетки являются функционально компетентными, при контакте с антигеном не подвергаются апоптозу, а активируются и дифференцируются в клетки-предшественники зародышевого центра с последующей дифференцировкой в антитело-продуцирующие клетки (Богданова И. М., Артемьева К. А., 2021). Значительное развитие субпопуляции наивных зрелых В-клеток указывает на выраженную активационную направленность В-клеточного звена новорожденных от матерей с ПЭ.

Необходимо отметить, что и в периферической, и в пуповинной крови выявлены сопоставимые между сравниваемыми группами значения численности В-клеток с фенотипом регуляторных: $CD19^+CD24^+CD27^+$ и $CD19^+CD24^+CD38^{hi}$. Продemonстрировано в 3 раза более низкое содержание В(рег)-клеток с фенотипом $CD19^+CD24^+CD38^{dim}$ у

беременных с ПЭ, по сравнению со здоровыми беременными, однако заданный уровень значимости достигнут не был. Примечательно, что у новорожденных выявляется более низкое содержание субпопуляций В(рег)-клеток с фенотипами $CD19^+CD24^+CD27^+$ и $CD19^+CD24^+CD38^{dim}$, но более высокое с фенотипом $CD19^+CD24^+CD38^{hi}$, чем в крови матерей. По данным литературы отмечается, что у беременных и младенцев субпопуляция В(рег)-клеток с фенотипом $CD24^{hi}CD38^{hi}$ является наиболее изученной малой субпопуляцией из всех описанных (Flores-Borja F. et al., 2013; Mauri C., Ehrenstein M. R., 2008). Количество этих клеток в крови увеличивается в первом триместре нормальной беременности, однако снижается при развитии осложнений (Nguyen T. G., Ward C. M., Morris J. M., 2013; Rolle L. et al., 2013). Снижение также наблюдается на поздних сроках беременности, что указывает на подготовку организма к родам (Lima J. et al., 2016). Предполагается, что В(рег)-клетки играют роль в формировании общей супрессорной направленности иммунных реакций у новорожденных, способствуя толерантности к аллоантигенам и снижая реакции "трансплантат против хозяина" путем ингибирования Th1-ответа (Esteve-Solé A. et al., 2018). Однако это может увеличить риск инфекций при трансплантации пуповинной крови (Lin S. J. et al., 2012). Результаты данного исследования по содержанию В(рег)-клеток согласуются с литературными данными: наблюдающееся у пациенток с ПЭ более низкое число В(рег), вероятно, отражает гиперактивацию иммунной системы; у новорожденных от матерей с ПЭ тенденция к повышению указывает на более выраженную иммуносупрессию, что требует особого внимания к их здоровью, поскольку инфекционно-воспалительные осложнения у новорожденных этой группы имеют более высокую частоту согласно литературным данным (Suppo de Souza Rugolo L. M., Bentlin M. R., Petean Trindade C. E., 2012).

Представленные данные свидетельствуют о значительных нарушениях функционирования В-клеточного звена иммунной системы у пациенток с ПЭ, проявляющееся в дисбалансе содержания В-клеток "наивных" фенотипов и В-клеток памяти. Известно, что при ПЭ может развиваться избирательная активация антиген-специфических клонов В-клеток, продуцирующих избыточное количество патологических антител. В частности, такие данные имеются относительно АФА (Hoogen L. L. van den, Bisoendial R. J., 2022). По-видимому, у пациенток с ПЭ наряду с активацией гуморального ответа на клеточный стресс и генерируемые клеткой образы опасности, развивается также истощение пула В-клеток памяти. Осложненная беременность может быть ассоциирована с недостатком антител с регуляторной функцией, а также "блокирующих антител", что может быть связано с селективной down-регуляцией В-клеток памяти. У новорожденных

от матерей с ПЭ более развита субпопуляция наивных зрелых В-лимфоцитов, готовых к праймированию антигеном и развитию гуморального иммунного ответа. Стимулом к этому является провоспалительное микроокружение, в котором развивался плод, что может приводить в дальнейшем к гипертрофированным иммунным реакциям. Косвенно это предположение подтверждает наблюдаемая тенденция к более высокому содержанию В2-клеток, а также суммарной фракции центробластов и centroцитов у новорожденных от матерей с ПЭ, полученная в нашем исследовании.

Т.о. исследование широкой панели больших и малых популяций иммунных клеток, ответственных за иммунный ответ, иммунорегуляцию и иммунологическую память у новорожденных и их матерей показало, что активационный стимул, который исходит из плаценты при беременности, осложненной ПЭ, влияет на иммунную систему матери и новорожденного по-разному: для материнского организма характерны выраженные изменения В-клеточного звена иммунитета, включая изменения наивных фенотипов и клеток памяти, а у новорожденных наибольшие изменения затрагивают Т-хелперы и Т-клетки с фенотипом регуляторных.

4.4. Патогенетические особенности системного иммунитета (гуморальное звено) у беременных с ПЭ и их новорожденных

Изменения В-клеточного звена матери обуславливают исследования комплекса антител, поскольку качественные и количественные изменения продуцируемых В-клетками антител является отражением нарушений функциональной активности клеток. Исследования спектра АгАТ, представленных иммуноглобулинами классов М и G, проводилось в периферической крови беременных и пуповинной крови их новорожденных. Для выявления особенностей иммунного реагирования беременных с ПЭ также проводилось исследование АгАТ в расширенной группе беременных с ГРБ и у беременных с ЗРП. Были получены ответы на вопросы: содержание каких АгАТ меняется при: 1) плацента-ассоциированных осложнениях беременности (ПЭ и ЗРП); 2) гипертензивных расстройствах во время беременности. Спектр АгАТ был изучен у новорожденных от матерей с физиологической беременностью и беременностью, осложненной ПЭ, и анализировался с учетом исходов беременности и состояния здоровья новорожденных.

При анализе результатов у беременных была дана характеристика специфичности антител, и выявлены отличия в содержании значительного числа АгАТ между группами исследования. Поскольку на гликановом эррее локализованы лиганды, которые являются коровыми и терминальными фрагментами N- и O-связанных гликанов, антигенов групп

крови углеводной природы, а также бактериальные полисахариды, (главным образом О-полисахариды бактерий) (см. Приложение), то данное исследование является первым масштабным исследованием антител при беременности у большой когорты пациенток разных нозологий. Анализ данных позволил выявить ключевые факты: а) ранним срокам беременности (и, соответственно, ранней манифестации патологии) сопутствуют отличия только по одному антителу для пациенток с беременностью, осложненной ЗРП; б) наиболее широкий спектр АгАТ классов G и M наблюдается у пациенток с беременностью, протекающей на фоне ХАГ; в) диагностические сигнатуры АгАТ, состоящие из антител IgG и IgM, включают уникальные антитела, т.е. в каждой сигнатуре для дифференциации одного осложнения от другого присутствуют антитела, не встречающиеся в других сигнатурах.

Установлено, что на сроках беременности, соответствующих ранней манифестации патологии, значимые отличия от нормальной беременности (повышенный уровень антител) выявлены только для пациенток с ЗРП по АгАТ(IgM) к бактериальному О-полисахариду патогенной бактерии *Sh. boydii*, которая вызывает дизентерию, и в норме отсутствует у человека (Рисунок 65). На сроках, соответствующих поздней манифестации ЗРП, уровень АгАТ(IgM) был снижен к лигандам, которые можно причислить к DAMPs, в частности, фрагмент пептидогликана и изомальтотриоза (Таблица 32). Специфичность, класс этих антител (IgM), а также их более низкое содержание у пациенток с ЗРП, позволяет предполагать их принадлежность к естественным АгАТ.

При тяжелой ПЭ с поздним началом выявляются похожие изменения спектра АгАТ(IgM): снижение ограниченного числа антител (3 из 689 специфичностей, Таблица 33) и по специфичности их мишени можно также отнести к DAMPs, в том числе и гликан Mb4GN (№123), поскольку этот дисахарид присутствует во внутренней части N-цепей гликопротеинов и маскирован для распознавания антителами в норме. При умеренной ПЭ с поздним началом выявляются изменения широкого спектра АгАТ(IgG): (23 антитела из 689, Таблица 34), подавляющее большинство из которых имеет значимо более низкое содержание, чем в норме. Анализ их эпитопов позволяет сделать заключение о принадлежности к “образам опасности”: низкомолекулярная гиалуроновая кислота (№632) и ее структурный дисахарид (№164), О-полисахариды *P. mirabilis*, а также гликаны, которые в норме скрыты (коровые фрагменты О-цепей и др.), или не встречаются у человека (альфа-хитобиоза №800, бета-сиаловая кислота №51 и др.). Повышенное содержание АгАТ(IgG) при умеренной ПЭ выявлено к двум структурам: фрагменту О-полисахарида *E. coli* O150 (№1223) и гликану, встречающемуся в бактериальных

полисахаридах (№818). По-видимому, выявленные значимые АгАТ, уровень которых снижен при плацента-ассоциированных осложнениях беременности (ЗРП и ПЭ), относятся к пулу регуляторных, естественных антител. Основные аргументы, которые можно привести в пользу этого утверждения: 1) преимущественно выявленные антитела относятся к иммуноглобулинам М класса (известно, что в пуле естественных антител IgM доминируют, составляя, как правило, величину ~80%, (Bovin N. V., 2013; Huflejt M. E. et al., 2009; Shilova N. et al., 2013) но IgG также встречаются); 2) выявленное снижение уровня АгАТ у пациенток с осложненной беременностью может свидетельствовать как об истощении пула предрасполагающих естественных АгАТ, так и о исходно низком их количестве у пациенток с ПЭ и ЗРП вследствие более низкой продукции этих антител В1-клетками; 3) естественные антитела полиреактивны и их связывание с О-полисахаридами патогенных и условно-патогенных микроорганизмов не является свидетельством присутствия этих бактерий в организме или предшествующей стимуляции ими иммунной системы матери. Скорее, АгАТ распознают не выявленный гликан, а его мимотоп.

Поскольку факт взаимодействия антител с рядом гликанов эррея интерпретируется нами как связывание с “образами опасности”, необходимо пояснить, что такое объяснение является отражением известных представлений о патофизиологии ПЭ. Гиперактивация иммунной системы является результатом нарушений плацентации, поскольку провоспалительное состояние возникает вследствие прогрессирования ишемических повреждений ткани плаценты (Ananth C. V., Friedman A. M., 2014; Banerjee S. et al., 2021; Nadeau-Vallée M. et al., 2016). Развивается стерильное воспаление, которое является доказанным значимым патогенетическим фактором ПЭ (Banerjee S. et al., 2021) и ЗРП (Baker B.C. et al., 2021). Стерильное воспаление, характеризуется высвобождением эндогенных молекул, обычно скрытых от PRRs, за счет декомпартиментализации (внутриклеточные DAMPs), секвестрации из ВКМ (внеклеточные DAMPs) (Schaefer L., 2014) при повреждении или гибели клеток (Gong T. et al., 2020). Эндогенные DAMPs (неоантигены), также могут образовываться вследствие тканевого стресса, при котором меняется активность ферментативных систем, в частности, ферментов гликозилирования (Maverakis E. et al., 2015; Rosin D. L., Okusa M. D., 2011). Клеточный стресс также инициирует химические модификации белков и липидов – происходит гликирование с продукцией конечных продуктов гликирования (AGEs) и экспрессируется их рецептор RAGE (Lee E. J., Park J. H., 2013). Наиболее охарактеризованные DAMPs из ВКМ – протеогликаны; они обладают сложным строением, состоят из основы (молекулы белка) и боковых цепей гликозаминогликанов, и способны взаимодействовать с рецепторами,

запуская передачу сигналов в клетке (Chiffolleau E., 2018; Frevert C. W. et al., 2018; Schaefer L., 2014).

Известно, что естественные антитела, значительный уровень которых выявляется с раннего детства, выполняют важную роль в физиологическом клиренсе, специфически связывая антигенные детерминанты на поврежденных и стареющих клетках (Игнатьева Н.В. и др., 2019). В том числе, они связывают неоантигены, образованные при воспалительных реакциях, сопровождающихся окислительным стрессом. Естественные IgM, связывающиеся с такими антигенами апоптотических клеток (Зиганшина М.М., 2016), усиливают фагоцитарный клиренс и подавляют гипертрофированные провоспалительные реакции через ингибирование MAPK-сигнального пути в ДК (Vas J., Grönwall C., Silverman G. J., 2013), сохраняя иммунный гомеостаз в организме и выполняя регуляторную надзорную функцию за воспалительной реакцией. Поскольку ПЭ является провоспалительным состоянием, которое в тяжелых случаях переходит в неконтролируемое с развитием полиорганной недостаточности, вероятно, что низкий уровень значительного числа АгАТ, выявленный в данном исследовании, является следствием истощения антител, необходимых для клиренса и контролирующего провоспалительный статус. Поскольку апоптоз плаценты выявляется при нормальной беременности, и усиливается к концу III триместра (Smith S., Baker P. N., Symonds E. M., 1997), а при ЗРП (Dai S.-Y. et al., 2004; Lekchnov E. A. et al., 2015) и ПЭ (Kasture V. V., Sundrani D. P., Joshi S. R., 2018; Raguema N., Moustadraf S., Bertagnolli M., 2020; Sharp A. N. et al., 2010) наблюдаются выраженные процессы апоптоза, превосходящие, наблюдаемые в норме, вероятность этого предположения является очень высокой. Дополнительным аргументом в пользу патофизиологической роли естественных АгАТ при ПЭ и ЗРП являются, нарастающие со сроком беременности, проявления феномена старения плаценты (Cox L. S., Redman C., 2017), который значимо более выражен при ПЭ (Scaife P. J. et al., 2021) и ЗРП (Sultana Z. et al., 2018) и усиливает провоспалительный фон.

Низкий уровень естественных антител, включая естественные АгАТ, был выявлен при различных патологиях, в частности при онкологии (Тупицын Н.Н. и др., 2008). Было установлено снижение содержания естественных анти-Le^C антител у пациенток с Le^C-позитивной опухолью молочной железы. Предполагается, что эпитоп, узнаваемый естественными анти-Le^C антителами, не ограничивается гликаном Le^C, а представляет собой молекулярный паттерн с углеводной составляющей, поскольку *in vitro* исследования показали, что дисахарид Le^C (Обухова П.С., 2011) не ингибирует взаимодействие антител с клетками, а напротив усиливает его (Dobrochaeva K. et al., 2020b).

Кроме АгАТ, уровень которых снижен у пациенток с осложненной беременностью, относимых нами к естественным антителам, при ЗРП на ранних (Рисунок 65) и поздних (Таблица 32) сроках, а также у пациенток с умеренной ПЭ на поздних сроках (АгАТ(IgG) к гликанам № 818 и 1223 (Зиганшина М.М. и др., 2022а), Таблица 34) выявлен повышенный уровень АгАТ обоих классов. По-видимому, данные антитела относятся к адаптивным антителам, продукцию которых провоцирует развитие воспалительного ответа, инициируемого нарушениями плацентации (Зиганшина М.М., 2016). Поскольку системное воспаление является ключевым звеном патогенеза не только плацента-ассоциированных осложнений беременности, но и гипертензии (Agita A., Alsagaff M. T., 2017; Schiffrin, 2014), был проанализирован спектр АгАТ при гипертензивных расстройствах во время беременности (ГРБ) и проведено сопоставление спектров антител.

Анализ изменения АгАТ у пациенток с ГРБ, которые включают беременность на фоне предсуществующей ХАГ, беременность, осложненную гестационной артериальной гипертензией (ГАГ) и беременность, осложненную развитием ПЭ, показал, что только при беременности на фоне ХАГ выявляются отличия от нормы по широкому спектру антител, G и M классов: 26 АгАТ(IgM) (Таблица 37) и 23 АгАТ(IgG) (Таблица 36). Причем, в спектре значимых АгАТ(IgG) при беременности на фоне ХАГ повышен уровень всех антител, а в спектре АгАТ(IgM) для 14 антител уровень был выше, чем в норме. У пациенток с беременностью, осложненной ГАГ, значимые отличия от нормы выявлены только по АгАТ(IgG), причем уровень всех антител был выше у здоровых беременных (Таблица 35). Необходимо отметить, что у пациенток с ГАГ часть АгАТ(IgG) совпадает по специфичности с выявленными при умеренной ПЭ (Таблицы 34 и 35); у пациенток с ХАГ (Таблицы 36 и 37) – часть АгАТ(IgG) совпадает с выявленными как при умеренной ПЭ (Таблица 34), так и при ГАГ (Таблица 35), а часть АгАТ(IgM) – с тяжелой ПЭ (Таблица 33).

Воздействие этиологических факторов развития гипертензии влияет на иммунную систему, вызывая активацию врожденного и адаптивного иммунитета, окислительный стресс и развитие перманентного воспаления, степень выраженности которого зависит от длительности заболевания и поражения органов-мишеней (Wenzel, Ehmke, Bode, 2021). Активированные клетки врожденного иммунитета продуцируют активные формы кислорода (АФК), которые инициируют перекисное окисление липидов и образование изокеталей (гамма-кетоальдегидов) (Wenzel U. O., Ehmke H., Bode M., 2021). Изокетали присоединяются к лизину, переводя белок в статус чужеродного с последующей презентацией ДК в виде неоантигенов Т-клеткам, что вызывает их пролиферацию и синтез эффекторных цитокинов; результатом становится развитие гипертензии (McMaster W. G. et

al., 2015; Mian M. O. R., Paradis P., Schiffrin E. L., 2014; Wenzel U. O., Ehmke H., Bode M., 2021; Xiao L., Harrison D. G., 2020). В качестве DAMPs могут выступать не только неангигены, но и ядерные и цитозольные белки, высвобождаемые из поврежденных клеток (Тютюнник Н.В., 2019), что активирует Toll-подобные рецепторы (Mikolajczyk T. P., Guzik T. J., 2019).

АФК и провоспалительные цитокины, продуцируемые иммунными клетками, вызывают повреждение и “сдувание” протективного слоя на поверхности эндотелия – эГК (Зиганшина М.М., 2016; Зиганшина М.М. и др., 2022b; Зиганшина М.М., Павлович С.В., 2021). Установлено, что интактный эГК в физиологических условиях имеет толщину, необходимую и достаточную для проведения в эндотелиальные клетки сигналов от напряжения сдвига, вызываемого током крови и тангенциального давления крови на стенку сосуда, которые обуславливают стимуляцию синтеза NO, и поддерживают гомеостатические значения артериального давления в сердечно-сосудистой системе (Зиганшина М.М. и др., 2022b). Сокращение слоя эГК вызывает дезрегуляцию сосудистого тонуса, проадгезивный статус эндотелия, гиперкоагуляцию и повышение проницаемости сосудистой стенки (Нагоев Т.М. и др., 2020). В условиях выделения структурных компонентов эГК (протеогликанов, гликозаминогликанов и других гликанов, составляющих эГК) в кровь (Ziganshina M.M. et al., 2022b), создаются условия для их презентации В-клеткам и иммунного ответа (Зиганшина М.М., 2016). Сами гликаны являются низкоиммуногенными, но их презентация в комплексе с белками или элементами клеточного дебриса, который может выполнять роль адъюванта, способствует продукции антител соответствующей специфичности. В аспекте исследований гуморального иммунитета и его роли в гипертензии показано, что В-клетки и их продукты – IgG являются важным патогенетическим звеном артериальной гипертензии (Mikolajczyk T. P., Guzik T. J., 2019), одной из гипотез развития которой является аутоиммунный фактор (Wenzel U. O., Ehmke H., Bode M., 2021), поскольку при АГ выявляется активация В-клеток и высокая продукция аутоантител (анти-Hsp70, анти-Hsp65, анти-Hsp60, анти-AT1R, анти- α 1AR и анти- β 1AR) (Mikolajczyk T. P., Guzik T. J., 2019).

Выше уже отмечалось, что только у пациенток с беременностью, на фоне ХАГ, выявлялся самый широкий спектр значимых АгАТ обоих классов, и абсолютное большинство АгАТ было повышено, причем значимые АгАТ(IgG) – повышены все. Вероятно, интенсивный иммунный ответ на гликаны вызван длительной перманентной активацией эндотелия у этих пациенток и иммунным ответом на эти гликаны, имевшим место ранее. Известно, что адаптивный иммунный ответ сопровождается развитием

популяций Т- и В-клеток памяти, распознающих специфические антигены, которые повторном появлении в организме обеспечивают быстрый и эффективный иммунный ответ (Barski A. et al., 2017). При АГ накопление клеток памяти было описано как у животных, при моделировании развития АГ (Itani H. A. et al., 2016a), так и у людей, страдающих АГ (Itani H. A. et al., 2016b). Также, отмечалось, что АГ ассоциирована с повышением уровня IgG в крови (Chan C. T. et al., 2015). Несмотря на то, что исследование В-клеток памяти у беременных с ГАГ и беременностью на фоне ХАГ не проводилось, наши данные согласуются с этими наблюдениями, и свидетельствуют, что у “беременных с ХАГ выявляется высокий уровень АгАТ(IgG) к широкому спектру гликанов, что, по-видимому, подтверждает их адаптивное происхождение, а также высокий уровень АгАТ(IgM) к ряду гликанов” (Долгополова Е.Л., 2023), что может быть свидетельством продолжающегося иммунного ответа. Необходимо отметить, что у пациенток с ХАГ и ГАГ были изменены ряд антител к компонентам ЭГК и ВКМ, в том числе антитела к гиалуроновой кислоте и ее структурному дисахариду, а также фрагментам коровьих цепей О- и N-гликанов, которые являются составной частью этих структур.

Выявленное снижение АгАТ(IgG) при беременности, осложненной ГАГ по сравнению с нормой, по-видимому, свидетельствует о недостаточном содержании антител с регуляторной активностью и отличном от ХАГ механизме развития АГ у этих пациенток. Более выраженная активация эндотелия у пациенток с беременностью на фоне ХАГ подтверждается значимо повышенным уровнем АгАТ(IgG) и ряда АгАТ(IgM), чем у пациенток с ГАГ. Обращает на себя внимание более высокий уровень ряда АгАТ(IgG) у пациенток с ГАГ при сравнении с их содержанием у пациенток с умеренной ПЭ. Значение этого факта еще предстоит исследовать, “поскольку у таких пациенток необходимо оценивать состояние сердечно-сосудистой системы в катамнезе, исследовать Т- и В-клеточные звенья иммунитета и выявлять роль антител данной специфичности в поражении органов-мишеней при развитии патологии сердечно-сосудистой системы” (Долгополова Е.Л., 2023).

По данным литературы, исследования роли В-клеток и продуцируемых ими антител при АГ показало, что отсутствие зрелых В-клеток у нокаутных мышей, обусловленное дефицитом рецептора фактора активации В-клеток (BAFF-R^{-/-}), приводит к ослаблению зависимых от ангиотензина II гипертензивных реакций. У мышей отмечались нормальные показатели жесткости аорты, отсутствие накопления коллагена и низкое содержание IgG и макрофагов в аорте. При трансфере В-клеток мышам восстанавливался ангиотензин II-обусловленный эффект повышения АД (Chan C. T. et al., 2015). Дингуэлл et al. подтвердили,

что дефицит В-клеток приводил к снижению артериального давления у мышей (Dingwell L. S. et al., 2019).

В представленном исследовании определение субпопуляций В-клеток проводилось только у беременных с ПЭ, что вносит определенные ограничения на интерпретацию полученных результатов по разнообразию спектра и содержанию АгАТ по всей выборке беременных с ГРБ. У беременных с ПЭ содержание наивных зрелых клеток фенотипа $CD19^+CD38^+CD27^-$ и транзиторных клеток $CD19^+CD38^{++}CD27^-$ было повышенным, что свидетельствует о наличии активационного стимула. Высокое содержание субпопуляции $Bm2^+$, $CD19^+CD38^{hi}IgD^{dim}$, характеризующихся высокой экспрессией CD38, также подтверждает этот факт. Но, содержание зрелых В-клеток памяти было низким, что демонстрирует отсутствие хронического продолжительного процесса стимуляции и позволяет предполагать, что изменения в спектре и содержании АгАТ у беременных с ПЭ имеет механизм отличный от других гипертонических расстройств данной группы. Основываясь на полученных данных, демонстрирующих особенности спектров АгАТ у беременных, можно сделать ряд выводов. Во-первых, на ранних сроках, соответствующих манифестации плацента-ассоциированных осложнений беременности, гуморальный иммунный ответ на гликаны выражен слабо и проявляется только при ЗРП (повышение АгАТ(IgM) к бактериальному О-полисахариду, который относят к DAMPs, активирующему иммунную систему матери). Во-вторых, особенности иммунного ответа у пациенток с плацента-ассоциированными осложнениями беременности и развившейся при беременности ГАГ на поздних сроках проявляются преимущественным снижением АгАТ, которые можно отнести к естественным антителам. В-третьих, у пациенток с гипертензией на фоне предсуществующей ХАГ выявляется интенсивный иммунный ответ на гликаны, что проявляется повышением уровня АгАТ обоих классов, которые, по-видимому, являются адаптивными АгАТ.

Несмотря на отсутствие значимых изменений В-клеточного звена иммунитета и низкое содержание В-клеток памяти у новорожденных от матерей с ПЭ, в пуповинной крови выявляется значительное количество и разнообразие АгАТ(IgG). АгАТ(IgM) в пуповинной крови не выявлялись во всех когортах, включенных в исследование – их уровень находился за пределами чувствительности теста. Известно, что средняя концентрация общего IgM в крови новорожденных составляет около 100 мкг/мл (Alkan Ozdemir S. et al., 2016). В литературе имеются данные о наличии в пуповинной крови естественных IgM. Отмечается, что репертуар IgM пуповинной крови новорожденных консервативен, в отличие от репертуара IgG, который, напротив, более разнообразен и

определяется репертуаром IgG матери (Madi A. et al., 2009). В частности, в пуповинной крови выявляются аутоантитела IgM к относительно однородной панели аутоантигенов: гормонам, иммунным факторам, белкам теплового шока, белкам плазмы крови и др. (Merbl Y. et al., 2007). Имеются данные о присутствии в пуповинной крови естественных IgM к окисленным эпитопам, а также антигенам апоптотических клеток (Chou M.-Y. et al., 2009; Grönwall C. et al., 2016). Однако, эти данные относятся, главным образом, к антителам, направленным к белковым антигенам. Наличие АгАТ(IgM) у новорожденных до сих пор является предметом дискуссий. Так, в одной из работ (Rapaka R. R. et al., 2010) сообщается об обнаружении в пуповинной крови IgM, направленных к β -глюкану и хитозану, однако в других работах было показано, что АгАТ(IgM) отсутствуют в течение первых недель жизни младенца (Хасбиуллина Н. Р., 2019; New J. S., King R. G., Kearney J. F., 2016). Описано одно масштабное исследование АгАТ(IgM) в пуповинной крови новорожденных, сопоставимое с представленным в нашей работе, проведенное с использованием гликанового эррея, где идентифицирован спектр специфичностей АгАТ(IgM), выявляемых у младенцев (Xia L., Gildersleeve J. C., 2019). В частности, обнаружено значительное количество АгАТ(IgM) к трисахаридам группы крови А ($\text{GalNAc}\alpha 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-2)\text{Gal-}$) и В ($\text{Gal}\alpha 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-2)\text{Gal-}$). Однако выявляемость этих антител зависела от типа углеводной цепи-носителя: от высокой выявляемости до отсутствия сигналов. Необходимо отметить, что цитируемая выше работа была проведена с использованием проб крови, приобретенной в сервисе ProMedDx и авторы приводят данные отрицательных результатов их тестирования на антитела к ВИЧ, гепатиту С и отсутствия мРНК ВИЧ-1, гепатита В и С. Однако клиническая характеристика женщин и новорожденных не приводится, что не позволяет дать однозначного ответа на отсутствие инфекционных агентов в этих когортах, а также клинических особенностях когорт. Также конъюгация гликанов с носителем и плотность гликанов в конъюгатах отличалась в гликочипах, используемых в диссертационном исследовании, и цитируемом выше, что также могло оказать влияние на результаты определения АгАТ(IgM) в пуповинной крови.

В нашем исследовании представлены результаты, свидетельствующие, что основной вклад в разнообразие репертуара АгАТ и значительную представленность в крови имеют АгАТ(IgG), по которым выявлены межгрупповые отличия. Как было указано выше в разделе “Результаты”, высокие корреляционные связи между АгАТ(IgG) одинаковой специфичности из пуповинной и периферической крови свидетельствуют о “материнском” происхождении этих антител, поскольку у младенца синтез собственных IgG отсрочен (Clements T. et al., 2020). Известно, что трансплацентарный трансфер IgG от матери к плоду,

осуществляемый посредством неонатального Fc рецептора (Fc γ R), экспрессируемого клетками и тканями плаценты (Kiskova T. et al., 2019) в норме (Зиганшина М.М., 2016), начинается с 22 недель беременности и выходит на плато к 35 неделям, после чего эффективность трансфера остается стабильной (Mimoun A. et al., 2020). Исследования показали, что от матери плоду происходит передача не только протективных и регуляторных антител, обеспечивающих защиту от инфекций и гомеостаз. Кроме них осуществляется трансфер и патологических антител, обозначаемых условно как «ассоциированные с патологией» IgG, которые могут вызывать патологические реакции у младенцев (Fu C. et al., 2024; Morel N. et al., 2015; Simchen M. J. et al., 2009; Soybilgic A., Avcin T., 2020; Vanoni F. et al., 2017). Яркими примерами такого трансфера являются гемолитическая болезнь новорожденных (ГБН), вызываемая изоиммунизацией матери белковыми и углеводными антигенами эритроцитов плода, при несовместимости матери и плода по антигенам систем ABO и резус (Rh) (Hall V., Vadakekut E. S., Avulakunta I. D., 2024; Watchko J. F., 2023), а также неонатальная волчанка, развивающаяся вследствие трансфера материнских анти-Ro-антител (IgG) (Grönwall C. et al., 2016). Причем в последние годы появляется все больше сообщений о развитии патологических реакций новорожденных, включая ГБН в результате трансфера плоду от матери антител к редким антигенам (Fives K. R. et al., 2023; Jiang L.-L. et al., 2023; Liyan Y., Yongmei J., Jing F., 2023). Учитывая, что у матерей с ПЭ выявлена активация Т- и В-клеточного звеньев иммунной системы и изменен гуморальный ответ на ряд гликанов, а также установлены количественные изменения пЛАгАТ, вероятность трансфера АгАТ(IgG) с эффекторной функцией является высокой.

Вследствие того, что на ранних сроках беременности отсутствует возможность получения пуповинной крови у младенцев контрольной группы, анализ АгАТ проводился только у младенцев от матерей с поздней ПЭ и соответствующей по срокам беременности группы контроля. Сопоставление спектров АгАТ(IgG) младенцев от матерей с ранней и поздней ПЭ не производилось, т.к. трансфер антител от матери плоду на ранних сроках беременности снижен ввиду причин, не зависящих от патологического процесса в плаценте. Поэтому проводился анализ спектров АгАТ(IgG) у здоровых младенцев от матерей с физиологической беременностью и здоровых младенцев от матерей с ПЭ, а также младенцев с перинатальной патологией от матерей с ПЭ, родоразрешенных на поздних сроках беременности (Зиганшина М.М. и др., 2022а).

Анализ спектра АгАТ(IgG) у новорожденных всех исследуемых групп показал отсутствие уникальных антител, характерных только для одной когорты. Таким образом, спектр АгАТ(IgG) у новорожденных схож, различия касаются лишь количественного

содержания антител в различных группах. Тем не менее, несмотря на общую схожесть спектров АгАТ(IgG), “у здоровых новорожденных и новорожденных с перинатальной патологией от матерей с ПЭ были выявлены значительные различия в содержании АгАТ(IgG) различных специфичностей (Рисунок 68, Рисунок 69, Рисунок 70). Анализ спектров АгАТ(IgG) у здоровых новорожденных и новорожденных с перинатальной патологией, рожденных от матерей с осложненной ПЭ беременностью, показал, что все выявленные АгАТ(IgG) (как значимые, так и погранично значимые) демонстрировали сниженное содержание по сравнению со здоровыми новорожденными от матерей с нормальной беременностью (Рисунок 68 и Рисунок 69). Поскольку клинично-лабораторные данные и оценка состояния новорожденных в этих группах были сопоставимы, а различия ограничивались показателями, на основании которых ставился диагноз ПЭ у матерей и ЗРП у новорожденных, можно предположить, что сниженное содержание АгАТ(IgG) указывает на патологические процессы, развивающиеся в плаценте. Анализ мишеней АгАТ(IgG) выявленных в межгрупповом сравнении когорты здоровых новорожденных от матерей с физиологической беременностью и новорожденных с перинатальной патологией от матерей с ПЭ показал” (Долгополова Е.Л., 2023), что эти АгАТ(IgG), связываются с А-антигеном системы групп крови человека АВ0 и его аналогом (Рисунок 69). Также, необходимо отметить, что антитела к олигосахаридам молока и к ксеноантигенам (антиген Форссмана в нескольких вариантах и его синтетический аналог) также демонстрировали снижение в крови новорожденных с перинатальной патологией. Как известно, антиген Форссмана является высокоиммуногенным ксеноантигеном, и значимо низкое содержание антител к нему было выявлено и в элюатах и в крови беременных с ПЭ. Аналогичная тенденция отмечена для плацента-ассоциированных антител к L_{NnT} (олигосахариду молока) (Таблица 18), что указывает на их патогенетическую роль.

Особое внимание привлекают антитела, которые были обнаружены при сравнении здоровых новорожденных и младенцев с перинатальной патологией от матерей с преэклампсией (ПЭ). Эти антитела могут быть полезными для прогнозирования развития патологий в раннем неонатальном периоде (см. Рисунок 70). Результаты показывают, что часть мишеней-гликанов, к которым направлены эти антитела, были выявлены в указанном выше сравнении (антиген Форссмана, А-антиген, олигосахарида молока). Также выявлены антитела к α Gal-терминированным гликанам, содержащим эпитоп Gal α 1-3Gal β , который является частью высокоиммуногенного ксеноантигена Галили (Gal α 1-3Gal β -4GlcNAc β -). Факт наличия Галили-подобных эпитопов, выявленных в ткани плацент беременных и ПЭ и ЗРП, подтверждает важное значение этих антител в механизмах толерантности к плоду.

У новорожденных с перинатальной патологией наблюдается более низкий уровень всех вышеуказанных АгАТ(IgG), что свидетельствует, что именно снижение этих антител имеет патогенетическое значение. Известно, что значительная часть АгАТ является составной частью общего пула естественных антител, постоянно присутствующих в организме и выполняющих регуляторные и гомеостатические функции. Несмотря на то, что большинство естественных антител относятся к иммуноглобулинам класса М, описаны и иммуноглобулины класса G, относящиеся к этой группе. Одна из основных функций этих антител, как указывалось выше, – клиренс метаболитов и поврежденных клеток и их фрагментов, благодаря чему эти антитела контролируют уровень воспаления и аутоиммунитет (Chou M.-Y. et al., 2009; Grönwall C., Silverman G. J., 2014; Xia L., Gildersleeve J. C., 2019). Однако, отличить адаптивные и естественные антитела у пациентов без изучения динамики антител конкретных специфичностей у одного индивидуума является сложной задачей, поскольку даже антитела, связывающиеся с бактериальными и вирусными антигенами, могут быть полиреактивными естественными антителами, которые продуцируются без явного антигенного стимула и выполняют функцию первой линии защиты как гуморальные факторы врожденного иммунитета (Зиганшина М.М. и др., 2016а). Для такого условного разделения проводится исследование антител на больших когортах, что дает возможности для качественной (спектр антител) и количественной (относительное содержание) характеристики антител у каждого индивидуума в когорте. С помощью этого подхода был охарактеризован спектр естественных АгАТ крови, определенных с помощью гликанового эррея, что позволило выявить и классифицировать естественные АгАТ. Если у здорового человека, вне беременности, стабильно выявляются естественные АгАТ двух типов: группоспецифические аллоантитела и антитела консервативного (постоянного для всех людей) спектра и содержания в крови, то при беременности антитела этих двух групп становятся “пластичными”, т.е. их уровень меняется в связи с наличием полуаллогенного трансплантата (Зиганшина М.М., 2016), которым является плод (Bovin N.V., 2013) и формируется панель “пластичных” диагностически значимых естественных АГАТ, содержание которых временно отклоняется от нормы. К естественным АГАТ этого типа относят антитела направленные к А-группоспецифическому антигену (Bovin N.V., 2013), которые выявлены в представленных выше сравнениях, что свидетельствует об их принадлежности к естественным АгАТ крови новорожденного, полученным от матери. Функции этих антител могут быть связаны с удалением измененных и поврежденных клеток, возникающих как в результате естественного процесса старения плаценты (Cox L. S., Redman C., 2017), так и патологическими процессами в плаценте при плацента-

ассоциированных осложнениях беременности. Выявленное снижение уровня естественных АгАТ в крови новорожденных с перинатальной патологией от матерей с ПЭ, вероятно, связано с истощением их пула из-за связывания с большим количеством мишеней — "образов опасности", образованных в результате клеточного стресса в патологической плаценте, что превышает интенсивность наблюдаемого в нормальной ткани. Т.е. причиной может быть высокий клиренс клеток и клеточного дебриса в плодово-плацентарном интерфейсе при ПЭ. Недостаток антител — "мусорщиков" может способствовать поддержанию чрезмерной воспалительной реакции и усугублять эндотелиальную дисфункцию, что может негативно сказываться на сердечно-сосудистой системе женщины и формировать патологию новорожденного.

Это предположение подтверждается исследованием корреляционных связей между уровнем АгАТ (IgG) и клинико-лабораторными параметрами новорожденных и их матерей, что было подробно рассмотрено в п.3.11. Когорта новорожденных с перинатальной патологией от матерей с ПЭ характеризуется максимальным числом высокосignимых корреляционных связей, которые отсутствуют в когортах здоровых новорожденных (Рисунок 72). Связь ряда АГАТ(IgG) с возрастом матери, значениями АД, сроком родоразрешения, а также с иммуно-гормональными факторами плаценты и крови, регулирующими развитие толерантности к плоду свидетельствуют о патогенетической вовлеченности этих антител в развитие патологических нарушений в системе мать-плацента-плод.

Т.о. проведенные исследования антител у матерей и новорожденных позволили выявить АгАТ, которые отражают особенности иммунного реагирования пациенток с гипертензивными расстройствами при беременности, включая ПЭ, беременных с ЗРП, а также новорожденных от матерей с ПЭ. Для каждой группы дана характеристика специфичности АгАТ, однако, функциональное значение этих АгАТ, их роль в патогенезе АГ при беременности, нарушениях плацентации и развитии перинатальной патологии остается неизвестной. Для ответа на этот вопрос было проведено определение специфичности галектинов человека на чипе аналогичного формата и сопоставлены специфичности АгАТ и галектинов.

Полученные результаты свидетельствуют, что наиболее представительный спектр гликанов, по которым выявлено совпадение специфичности для галектинов и АгАТ, установлен у пациенток с беременностью на фоне ХАГ при сравнении с пациентками с другими нозологиями на поздних сроках беременности (Таблица 41). Связываясь с одним

и тем же гликаном, антигликановое антитело и галектин могут конкурировать, вследствие чего механизм действия этих антител можно рассматривать как: а) блокирующее действие - ингибирование взаимодействия галектинов с их клеточными мишенями; б) действие АгАТ в качестве рецептор-активирующих антител (возможно для высокоаффинных антигликановых IgG). По представленным результатам, АгАТ преимущественно G класса способны связываться с одинаковыми с галектинами лигандами эррея. Больше всего гликанов, которые связываются как с галектинами, так и с АгАТ выявлено при беременности на фоне ХАГ (Таблица 41).

Анализ АгАТ (IgG) показал, что у новорожденных также выявляются антитела, имеющие одинаковые гликаны-лиганды с галектинами (Таблица 42), в частности с Гал-3, Гал-4, Гал-8 и Гал-9. Примечательно, что эти лиганды выявляются также среди пАгАТ(IgG), что указывает на вероятность развития конкурирующих взаимодействий между АгАТ и галектинами не только на системном уровне, но и в плаценте.

Анализ литературных данных, представленный в главе I, показывает, что галектины присутствуют в пуле гуморальных иммунных факторов и являются биологически активными молекулами с цитокин-подобным действием, и спектр их действия в организме чрезвычайно широк. Галектины способны регулировать численность Th1, Th2 и Th17 клеток, избирательно связываясь с Gal β -терминированными гликанами, вызывая апоптоз активированных клеток Th1/Th17 клеток, регулируют ангиогенез плаценты, баланс про/противовоспалительного фенотипа ДК и макрофагов и др. Наиболее часто совпадения по связываемым АгАТ выявляются с Гал-3, Гал-7 и Гал-8. Учитывая ключевую роль этих углеводсвязывающих белков в регуляции воспалительной реакции, стимуляции развития толерогенных ДК и экспансии Т(рег)-клеток, можно предположить, что АгАТ влияют на эти взаимодействия, однако, сформулированный тезис необходимо доказывать в дальнейших исследованиях.

4.5. Приложение полученных данных к диагностике ПЭ и прогнозу неонатальных исходов

Масштабное исследование АгАТ при беременности, включающее множество нозологий позволило не только идентифицировать спектр антител значимых для патогенеза заболеваний, но и найти диагностически значимые сигнатуры АгАТ, которые позволяют дифференцировать ГРБ, что является важной клинической задачей, поскольку в ряде случаев клиническая картина не позволяет сразу провести соответствующую дифференциацию. Несмотря на то, что спектр значимых АгАТ, выявленных при межгрупповых сравнениях не

является уникальным для конкретной нозологии, для которой он рассчитан, в его составе присутствуют уникальные АгАТ (т.е. антитела, не встречающиеся в составе других спектров). На основе полученных результатов были найдены диагностические сигнатуры (сочетания антител обоих классов), диагностическая ценность которых превышала показатели сигнатур, представленных иммуноглобулинами одного класса.

Подход, основанный на использовании сигнатур, уже применяется в диагностике. В частности, идентифицирована сигнатура, объединяющая пять маркеров метилирования ДНК (Li R. et al., 2020b), которая выявляла больных с гепатоцеллюлярной карциномой (ГЦК) и классифицировала пациентов высокого и низкого риска развития ГЦК со специфичностью 96,84% и чувствительностью 96,77%. Предложены сигнатуры, основанные на: транскрипционных факторах, дифференцирующие колоректальный рак от воспалительных заболеваний кишечника (Guan Q. et al., 2018); генах, дифференцирующих здоровых и больных атеросклерозом пациентов (Zhu F. et al., 2021); микроРНК, выявляющие 12 типов различных опухолей на ранних стадиях (Tang F. et al., 2023) и др. К настоящему времени известно об одном исследовании, посвященном поиску диагностических сигнатур, основанных на антителах периферической крови, где было определено более 4000 антител к 250 антигенам *Salmonella typhi*, вызывающей брюшной тиф. В результате этого исследования были рассчитаны сигнатуры объединяющие антитела трех классов: А, М и G, что позволило сформулировать оптимальные серологические признаки диагностики брюшного тифа (Darton T. C. et al., 2017).

Основными диагностическими критериями ПЭ и ЗРП являются клинические признаки (отставание массо-ростовых показателей плода от нормативных, артериальное давление, белок в моче, отеки и др.) определяемые инструментальными и лабораторными методами. Однако они не являются специфичными, в связи с чем, проводились исследования, направленные на поиск специфичных для этих нозологий маркеров, которые могли бы на ранних сроках осуществить предикцию осложнений беременности и дифференцировать ПЭ, как тяжелое и жизнеугрожающее состояние, с другими гипертензивными расстройствами. Наиболее изученные и перспективные маркеры, которые рассматривались с этой точки зрения: ангиогенные факторы и их соотношение (sFlt-1/PlGF), ассоциированный с беременностью протеин плазмы А (РАРР-А), аутоантитела к рецептору ангиотензина II типа 1 (АТ1-АА), Гал-13 (РР13), фетальный гемоглобин и фактор роста плаценты и др. (Гребенник Т. К., Павлович С. В., 2011; Дубровина С. О., Муцалханова Ю. С., 2016; Liu M. et al., 2021; Melinte-Popescu A.-S. et al., 2023). Однако их диагностическая ценность спорна, поскольку при проведении ROC-

анализа многие из этих маркеров не достигают необходимых значений обоих показателей чувствительность/специфичность и интервала AUC более 0,7 что можно классифицировать как хорошее и отличное качество модели. Установлено, что модели прогнозирования ПЭ, основанные на использовании sFlt-1, PLGF, их соотношения (sFlt-1/PLGF) и растворимой формы сериновой протеазы корин (Corin) имеют показатели AUC для sFlt-1, PLGF и sFlt-1/PLGF 0,79, 0,72 и 0,87, соответственно. В сочетании с белком корин, прогностическая способность этих маркеров может быть улучшена до 0,88, 0,85 и 0,9, соответственно (Liu M. et al., 2021). Описан подход с использованием машинного обучения, позволивший получить четыре различные модели, использующие параметры УЗ-исследования и “маркеры крови: MAP - среднее артериальное давление; UtA-PI — индекс пульсации маточных артерий; PLGF — фактор роста плаценты; PP-13—плацентарный белок-13; PAPP-A — связанный с беременностью белок плазмы-A”(Долгополова Е.Л., 2023) для прогнозирования ранней и поздней ПЭ различной степени тяжести. Значения AUC лучшей из этих моделей не превышала 0,84 (Melinte-Popescu A.-S. et al., 2023).

Ангиогенные факторы и, в частности соотношение sFlt-1/PLGF, используются для диагностики и дифференциального диагноза ПЭ, ЗРП и HELLP-синдрома. Эти же маркеры используются для дифференциальной диагностики ЗРП и плодов, маловесных к сроку гестации. В подобных исследованиях рассчитываются различные пороговые значения факторов. Значения AUC в таких исследованиях значительно повышается при сочетании биомаркеров с показателями доплерометрии (Stepan H. et al., 2023).

В нашем исследовании были рассчитаны различные варианты диагностических сигнатур AgAT для всех вариантов межгрупповых сравнений и для различных сочетаний антител двух классов, однако, в Таблице 44 представлены только варианты, которые имеют значения AUC более 0,70, т.е. имеют показатели модели классифицируемые как “хорошие” и “отличные”.

Таблица 44. Сравнение показателей диагностической ценности сигнатур с существующими тестами

Маркеры	Сравнение групп			
	Норма vs ГРБ	Норма vs ранняя ПЭ	Норма vs поздняя ПЭ	Норма vs ПЭ
Аутоантитела к рецептору 1 типа Ангиотензина II	0.86/0,46	-	-	0,76/0,86

(чувствит./специф.) (Lei J. et al., 2016)				
sFlt-1 и PlGF; (sFlt-1/PlGF) (чувствит./специф.) (Zhao M. et al., 2017)	-	0,95/0,98	0,89/0,94	-
Сигнатура АгАТ (чувствит./специф.)	<i>0,52/0,89*</i>	0,83/0,88**	<i>0,57/0,97***</i>	<i>0,76/0,53#</i>

Примечание: * Таблица 39, п.12 ; **Таблица 39, п.10; *** Таблица 39, п.3; # Таблица 39, п.11

Сравнение показателей диагностической ценности сигнатур АгАТ и наиболее перспективных, и эффективных на сегодняшний день маркеров показало, что диагностическая ценность предлагаемых нами тестов сопоставима с предложенными ранее, и основанными на определении ангиогенных факторов и аутоантител к рецептору 1 типа ангиотензина II (Таблица 44). Наиболее эффективно использование диагностических тестов для ранней ПЭ (Таблица 44). Также необходимо отметить, что сигнатуры имеют высокие значения AUC, чувствительности и специфичности при дифференциации ПЭ умеренной степени с беременностью на фоне ХАГ, а также осложненной ЗРП. Высокие характеристики диагностической ценности установлены для моделей, дифференцирующих нормальную беременность с беременностью, на фоне ХАГ, а также отличающих беременность, осложненную ГАГ и протекающую на фоне ХАГ (Таблица 38).

Для предикции неонатальных исходов и осложненного течения раннего неонатального периода была рассчитана диагностическая сигнатура, основанная на сочетании АгАТ(IgG)+АгАТ(IgM) в периферической крови матери (Таблица 39) и на АгАТ(IgG) в пуповинной крови ребенка (Таблица 40), соответственно. Рассчитанные сигнатуры имеют высокие показатели диагностической ценности и могут быть рекомендованы в качестве метода предикции неонатальных исходов и осложнений в раннем неонатальном периоде у новорожденных, рожденных от матерей с поздней ПЭ. Поскольку АГАТ(IgG) новорожденного имеют материнское происхождение, предикцию возможно проводить до рождения по периферической крови матери. В литературе отсутствует описание подобных подходов. Т.к. перинатальное программирование при осложненной беременности является длительным процессом, который после рождения реализуется в метаболических нарушениях и высоком риске развития артериальной гипертензии, сахарного диабета 2 типа и сердечно-сосудистых заболеваний (Simmi K., 2015), то предложенный подход имеет перспективы для предикции осложнений в последующей жизни ребенка и наблюдения этих антител в катамнезе.

Таким образом, третий этап исследования позволил идентифицировать патогенетически значимые АгАТ у матери и новорожденного, которые могут быть использованы для прогноза перинатальной патологии и тяжелого течения раннего неонатального периода, а также дифференциальной диагностики нозологий группы ГРБ. На ранних сроках беременности роль АгАТ менее значима, чем на поздних. Выявленные общие гликаны-мишени для АгАТ и галектинов предполагают возможность существования конкурирующих взаимодействий между ними, что является указанием на патогенетическую роль АгАТ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основной функцией иммунной системы является поддержание гомеостаза и защита организма от биологической агрессии, что позволяет выживать в условиях агрессивной внешней среды и контролировать изменения состава клеточных и гуморальных факторов, развивающихся вследствие патологических процессов. Нарушения в работе иммунной системы, проявляющиеся гиперактивацией или супрессией - диаметрально противоположными по смыслу и функциям процессами, обуславливают патогенез практически всех заболеваний. Беременность является “иммунологическим парадоксом”, поскольку развивается временная толерантность к чужеродным аллоантигенам плода. Парадокс заключается в ограничении гиперактивации на аллоантигены, на которые должен был развиваться иммунный ответ, и отсутствии иммуносупрессии, вместо которой развивается иммунорегуляция и кооперативные взаимодействия между аллогенными клетками, что и является особенностями механизмов толерантности при беременности, которые отличаются от механизмов толерантности, развивающейся при аллотрансплантациях. Механизмы формирования толерантности при беременности остаются во многом неясными, также, как и механизмы развития патологической беременности, при которой наблюдается гиперактивация, нарушается иммунорегуляция и проявляются иммунологические реакции острого и хронического отторжения плода.

В представленном исследовании гликопатология плаценты рассмотрена как основной фактор, влияющий на функционирование системы мать-плацента-плод при плацента-ассоциированных осложнениях беременности, который определяет развитие иммунного реагирования по патологическому типу у матери и, особенности иммунного реагирования у плода. Патогенетические механизмы развития гликопатологии в системе мать-плацента-плод, резюмированные по результатам нашего исследования, представлены на Рисунке 83. Центральный элемент Рисунка 83 **“Плацента”** - связующее звено между матерью и плодом и место непосредственного контакта материнских и фетальных клеток, несущих аллоантигены. Гликопаттерны синцитиотрофобласта, на котором представлены фетальные аллоантигены, контактируют с материнской кровью – ее иммунными клетками. α Gal-эпитопы, выявляемые в составе гликопаттернов, можно отнести к образам опасности (DAMPs), поскольку они являются Галили-подобными гликанами, активирующими иммунную систему матери. Контакт иммунных клеток плода осуществляется с гликокаликсом эндотелия терминальных ворсин плаценты, состав которого также изменен, что является фактором активации иммунной системы плода. Выявляемая в фетальном эндотелии повышенная (компенсаторная) гиперэкспрессия фукогликанов с кором типа 2,

которые имеют проангиогенные свойства, свидетельствует о патологическом ангиогенезе плаценты. Измененные гликопаттерны плаценты становятся мишенями для антигликановых IgG, уровень, специфичность и изотипический состав которых отличаются от тех, что присутствуют в организме в норме. В комплексе с недостаточной экспрессией ключевого фактора толерантности – *PIBF* совокупные изменения гликанов плаценты и углевод-связывающих белков – резидентных пЛАгАТ, определяют особенности гликан-опосредованных взаимодействий в плаценте и характеризуют нарушения периферической толерантности в центральном звене функциональной системы “мать – **плацента** – плод”. Вышеописанные изменения являются факторами патогенеза ПЭ и ЗРП – патологий, связанных с нарушением функции плаценты и развитием реакций хронического отторжения, вследствие нарушения толерантности, что доказано в данной работе.

Рисунок 83 демонстрирует взаимосвязь и взаимовлияние изменений факторов, регулирующих гликозилирование и продукцию “блокирующих” антител, гликанов, АгАТ в плаценте, в иммунной системе матери и новорожденного. Гликопатология плаценты, проявляющаяся в активированном фенотипе ее структур и клеток активирует клеточное и гуморальное звенья иммунной системы матери и плода. Гликопатология матери (Рисунок 83, элемент “**Мать**”), проявляющаяся в системном дисбалансе АгАТ и иммуно-гормональных факторов, регулирующих гликозилирование, является следствием активационного стимула “гликопаттернов опасности” плаценты, поскольку в профилях специфичности АгАТ матери выявляются антитела, связывающиеся с близкими по структуре гликанами, которые были обнаружены в плаценте. Гликопатология плода (Рисунок 83, элемент “**Плод**”) является следствием провоспалительной среды в которой происходило формирование его иммунной системы, о чем свидетельствует высокий уровень IL-6 и развитие субпопуляции Т-активированных хелперов. Акцепция АгАТ(IgG) матери посредством трансплацентрного переноса, по-видимому, включает не только передачу протективных антител, но и ассоциированных с патологией, поскольку ряд антител связаны с патогенетическими факторами развития ПЭ, что доказано корреляционным анализом и ассоциировано с перинатальной патологией новорожденного. Это свидетельствует о системном влиянии гликопатологии матери на развитие системной гликопатологии плода. Термин "системный" в данном контексте обозначает изменение центральной толерантности как матери, так и плода в ответ на изменения периферической толерантности в плаценте. Некоторые антитела, обнаруживаемые у матери и новорожденного, могут взаимодействовать с ключевыми регуляторами иммунных реакций — углеводсвязывающими белками галектинами, что приводит к нарушению их функций.

Таким образом, иммунопатогенетическая концепция развития гликопатологии в системе мать-плацента-плод, основанная на нарушении гликан-опосредованных взаимодействий в иммунной и репродуктивной системах обоснована и доказана в диссертационной работе.

Важно подчеркнуть, что данное исследование имеет системный характер, поскольку каждый объект рассматривается как часть целого и анализируется с использованием междисциплинарного подхода. Оно охватывает несколько систем (мать-плацента-плод) и методы (изучение механизмов центральной и периферической толерантности к плоду в контексте гликопатологии в взаимосвязанной системе мать-плацента-плод), объединенных общей концепцией и главным "объектом" исследования — патологией плаценты. Используемый в работе подход к проблеме позволил выявить основные закономерности изменений в ткани плаценты, клеточных и гуморальных иммунных факторах как у матери, так и у новорожденного, а также обосновать новую концепцию развития гликопатологии в системе мать-плацента-плод как одного из патофизиологических механизмов нарушений иммунной системы при патологиях 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 биологически активных молекул, которые имеют значение не только для патофизиологии болезни, но и потенциальное терапевтическое и диагностическое значение. 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 элементов (мать-плацента-плод) как единого целого и обозначает направления дальнейших исследований, которыми для данной работы будут являться поиск биологических мишеней антител в организме беременной, изучение их функциональной активности и сигнальных путей в клетке.

Вопросы, которые остались за рамками данного исследования, но имеют принципиальное значение для данной концепции и на которые предстоит ответить в будущем: 1) является ли выявленная гликопатология врожденной характеристикой, обусловленной особенностями функционирования ферментов гликозилирования, или следствием вторичных процессов, например, системного воспаления вследствие ишемии ткани плаценты?; 2) имеется ли иммунопатология у матери на догестационном этапе,

обусловленная особенностями экспрессии углевод-связывающих белков иммунными клетками и продукцией естественных АгАТ и каково ее влияние на течение беременности?

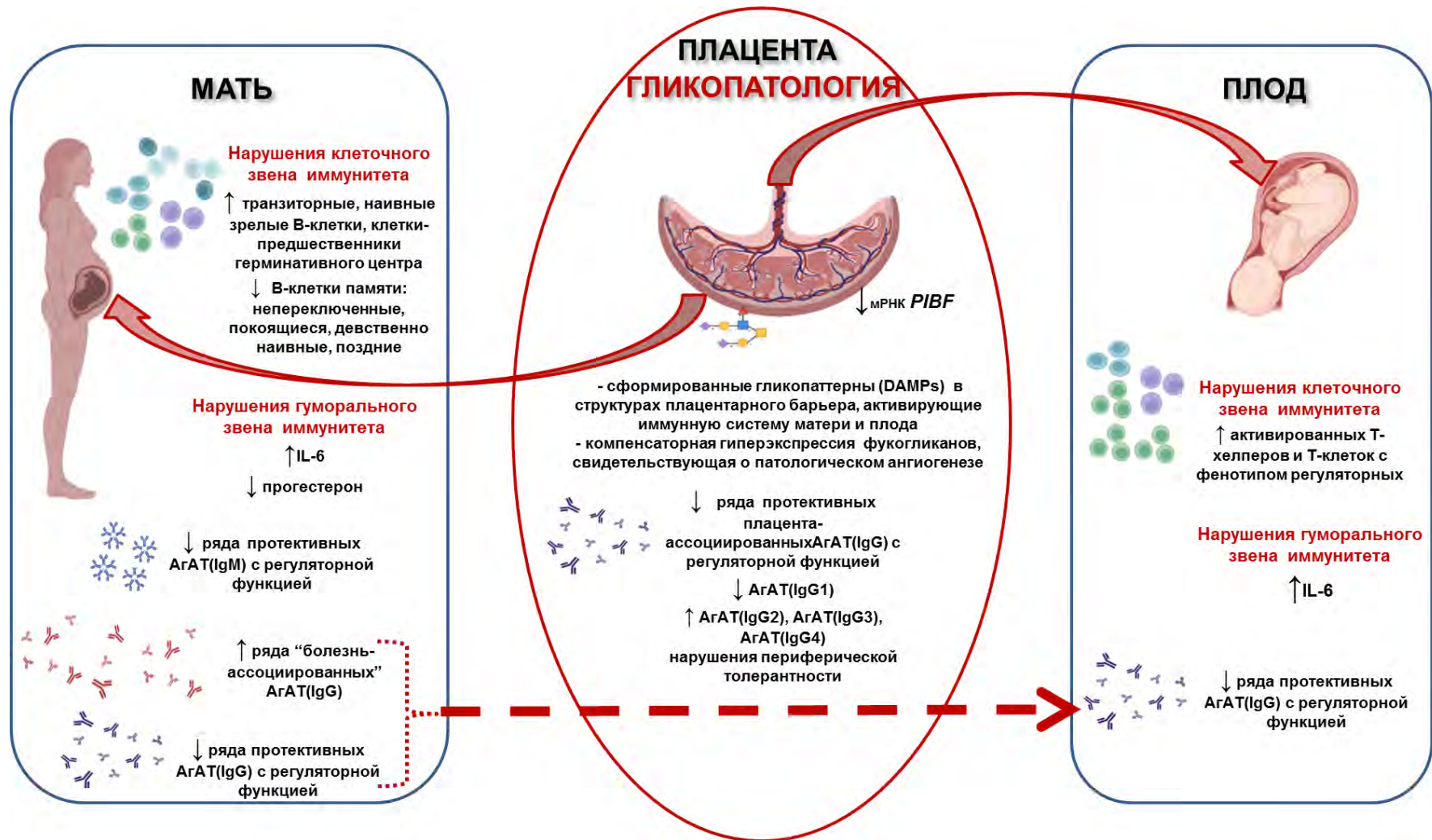


Рисунок 83. Блок-схема, демонстрирующая патогенетические изменения иммуно-гормональных факторов в системе мать-плацента-плод, развивающиеся вследствие формирования гликопатологии плаценты.

ВЫВОДЫ:

1. Продemonстрированы значимые изменения экспрессии терминальных и субтерминальных фрагментов гликанов в структурах плацентарного барьера и отличная от нормы гистотопография гликотопов 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 гликотопы;

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.

БЛАГОДАРНОСТЬ

С признательностью и благодарностью посвящаю эту рукопись трем людям, которые внесли огромный вклад в формирование меня как человека и ученого: моей матери, Ворожайкиной Алле Васильевне, и двум моим консультантам: академику РАН, д.м.н., профессору Сухих Геннадию Тихоновичу и д.х.н., профессору Бовину Николаю Владимировичу.

Также благодарю коллектив ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И.Кулакова» Минздрава России и сотрудников отдела химической биологии гликанов и липидов ФГБУН «ГНЦ ИБХ им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова» РАН за сотрудничество, помощь и всестороннюю поддержку на всех этапах этой работы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АгАТ** – антигликановые антитела
АЛТ – аланинаминотрансфераза
АОАТ – «анти-отцовские» антитела
АПК – антигенпрезентирующие клетки
АСТ – аспартатаминотрансфераза
АФА – антифосфолипидные антитела
АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время
АЭАТ – антиэндотелиальные антитела
ВИЧ – вирус иммунодефицита человека
ВКМ – внеклеточный матрикс
ГАГ – гестационная артериальная гипертензия
ГБН – гемолитическая болезнь новорожденных
ГРБ – гипертензивные расстройства во время беременности
ГСД – гестационный сахарный диабет
ДАБ – 3,3' – диаминобензидин
ДАД – диастолическое артериальное давление
ДК – дендритные клетки
еАГАТ – естественные антигликановые антитела
ЗРП – задержка развития плода
ИГХ – иммуногистохимия
ИКСИ – интрацитоплазматическая инъекция сперматозоидов (от англ. intra cytoplasmic sperm injection)
ИМТ – индекс массы тела
ИФА – иммуноферментный анализ
ИФБ – изотонический фосфатный буфер
КВ – коэффициент вариации
ЛС – лекарственное средство
МАт – моноклональные антитела
мРНК – матричная РНК
НМД – нейраминидаза
ОТ-ПЦР – метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией
плаАгАТ – плацента-ассоциированные антигликановые антитела
пПЭ – поздняя преэклампсия
ПЭ – преэклампсия
рПЭ – ранняя преэклампсия
САД – систолическое артериальное давление
СВО – системный воспалительный ответ
СИФ - средняя интенсивность флуоресценции

ТМА – тканевая матрица
ХАГ – хроническая артериальная гипертензия
ХГЧ – хорионический гонадотропин человека
ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение
 α -DG - α -дистрогликан
АЕС – 3-амино-9-этилкарбазол
AP-1 - белок-активатор 1 (от англ. activating protein-1)
Bm – зрелые В-клетки
BSA – БСА, бычий сывороточный альбумин (от англ. bovine serum albumin)
ССС – согласованный коэффициент корреляции Лина
CCR7 – С-С-рецептор хемокина 7 (от англ. C-C chemokine receptor type 7)
CD – кластер дифференцировки (от англ. cluster of differentiation)
COVID-19 – коронавирусная инфекция 2019 года (от англ. COronaVirus Disease 2019)
CXCR3 – хемокиновый рецептор семейства CXCR (от англ. C-X-C chemokine receptor type 3)
DAMPs –молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждениями (от англ. damage-associated molecular patterns)
DMJ – дезоксиманножиримидин
dNK – децидуальные натуральные киллеры
DSA-FACE – углеводный электрофорез с применением секвенирования ДНК и флюорофора (от англ. DNA sequencer-aided fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis)
EGFR - рецептор эпидермального фактора роста (от англ. epidermal growth factor receptor)
ERKs - митоген-активируемые протеинкиназы (от англ. extracellular signal-regulated protein kinases)
FasL – Fas-лиганд
FITC – флуоресцеин-5-изотиоцианат (от англ. fluorescein isothiocyanate)
FoxP3 – белок семейства FOX (от англ. forkhead box P3)
GAG – гликозаминогликаны
GdA - высокогликозилированный белок гликоделин-А (от англ. glycodelin A)
GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (от англ. granulocyte-macrophage colony stimulating factor)
CTLs – лектины С-типа
HELLP-синдром – тяжелое осложнение в акушерстве, названное по первым буквам трех составных симптомокомплекса: гемолиз (H – hemolysis), повышение активности ферментов печени (EL - elevated liver enzymes) и тромбоцитопения (LP - low platelet count)
HEV - эндотелии высокоэндотелиальных венул (от англ. high endothelial venules)
HGF – фактор роста гепатоцитов (от англ. hepatocyte growth factor)
HLA – человеческий лейкоцитарный антиген (от англ. Human Leukocyte Antigens)
hPL – человеческий плацентарный лактоген (от англ. human placental lactogen)

HRPO – пероксидаза хрена (от англ. Horseradish Peroxidase)

Hu-FEDS – система фето-эмбриональной защиты (от англ. human fetoembryonic defence system)

IBA – индекс связывающей активности (от англ. index of binding activity)

ICAM – молекула клеточной адгезии (от англ. intercellular adhesion molecule)

ICC - внутрикласовый коэффициент корреляции

IDO – индоламин-2,3-диоксигеназа

IFN – интерферон (от англ. interferon)

IGFR – рецептор инсулиноподобного фактора роста (от англ. insulin-like growth factor 1 receptor)

IL – интерлейкин (от англ. interleukin)

INSR, IR – рецептор инсулина (от англ. insulin receptor)

iT(per) – индуцированные Т-регуляторные клетки

ITAM – мотив активации иммунорецептора на основе тирозина (от англ. immunoreceptor tyrosine-based activation motif)

ITIM - мотив ингибирования иммунорецептора на основе тирозина (от англ. immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif)

KIR2DL1 – мембранный гликопротеин из семейства иммуноглобулино-подобных рецепторов естественных киллеров KIR (от англ. killer cell immunoglobulin-like receptor 2DL1)

LYVE-1 – рецептор гиалуроновой кислоты

MALDI-TOF MS - матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация с времяпролетным разделением (от англ. matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry)

MBL – маннозо-связывающий лектин 2 (от англ. mannose-binding lectin 2)

MIP – макрофагальный белок воспаления

MMP-9 - матриксная металлопротеиназа 9

MR – маннозный рецептор (от англ. mannose receptor)

MUC1 – муцин-1, мембранный белок, протеогликан из группы муцинов (от англ. mucin-1)

NF-κB - ядерный фактор «каппа-би» (от англ. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

NKT – Т-клетки-натуральные киллеры

ОССС - обобщенный коэффициент согласованности (от англ. overall concordance correlation coefficient)

PAMPs – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (от англ. pathogen-associated molecular patterns)

PAPP-A – ассоциированный с беременностью протеин А (от англ. pregnancy associated plasma protein-A)

PBS – ФСБ, фосфатно-солевой буфер (от англ. phosphate buffered saline)

PG – протеогликаны

PD-L1, PD-L2 - лиганды рецептора PD1 (рецептор запрограммированной клеточной гибели 1) Т-лимфоцитов

PIBF – прогестерон-индуцированный блокирующий фактор (от англ. progesterone induced blocking factor)

PIGF – плацентарный фактор роста (от англ. placental growth factor)

PPRs – паттерн-распознающие рецепторы (от англ. pattern recognition receptors)

Pre-BCR – рецептор пре-В-клеток (от англ. pre-B-cell receptor)

RFU – относительные единицы флуоресценции (от англ. relative fluorescence units)

Rh – резус

SAMPs – молекулярные паттерны, ассоциированные со структурами на собственных клетках (от англ. self-associated molecular patterns)

SARS-CoV-2 – острый респираторный синдром, вызванный коронавирусной инфекцией 2 (от англ. severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2)

Str – стрептавидин (от англ. streptavidin)

TACA – опухолеассоциированные углеводные антигены (от англ. tumor-associated carbohydrate antigens)

Tfh – фолликулярные Т-хелперные клетки

TGFβ – трансформирующий фактор роста бета (от англ. transforming growth factor beta)

TGFR – рецептор трансформирующего фактора роста бета (от англ. transforming growth factor beta receptor)

Th1, Th2, Th3, Th17 и др. – группы Т-хелперных клеток

Tim-3 – клеточный иммуноглобулин и муцин-3 (от англ. T-cell immunoglobulin and mucin domain 3)

TLR – Toll-подобный рецептор

tT(per) – тимические Т-регуляторные клетки

TNFα – ФНО-альфа, фактор некроза опухоли альфа (от англ. tumor necrosis factor alpha)

TRAIL – цитокин семейства факторов некроза опухоли (от англ. TNF-related apoptosis-inducing ligand)

UAEC – эндотелиальные клетки артерий матки (от англ. uterine artery endothelial cells)

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов (от англ. vascular endothelial growth factor)

VEGFR – рецептор фактора роста эндотелия сосудов (от англ. vascular endothelial growth factor receptor)

WMW - тест Вилкоксона-Манна-Уитни

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдурахманова Н. Ф. Диагностика рецептивности эндометрия в программах вспомогательных репродуктивных технологий на основании иммуноморфологического исследования гликанов эндометрия // Дисс. ... канд. мед. наук. Москва. - 2020.
2. Богданова И. М., Артемьева К. А. Развитие и функция регуляторных В-клеток и их роль в поддержании беременности // Иммунология. 2021. Т. 42. № 4. С. 415–425.
3. Ганичкина М. Б. и др. Ведение беременности при задержке роста плода // Акушерство и гинекология. 2017. Т. 10_2017. С. 5–11.
4. Гребенник Т. К., Павлович С. В. Возможности прогнозирования преэклампсии // Акушерство и гинекология. 2011. Т. 6. С. 17–21.
5. Долгополова Е. Л. Прогнозирование перинатальных исходов при преэклампсии на основании комплексного анализа антигликановых антител // Дисс. ... канд. мед. наук. Москва. - 2023.
6. Дубровина С. О., Муцалханова Ю. С. Ранние прогностические маркеры преэклампсии // Гинекология. 2016. Т. 18. № 5. С. 38–43.
7. Елезов Д. С. Маркеры активации лимфоцитов (CXCR3, CCR6 и CD38) периферической крови больных хроническим вирусным гепатитом С // Дисс. ... канд. мед. наук. СПб. - 2015.
8. Зиганшина М. М. Аутоантитела и молекулы клеточной адгезии при беременности, осложненной преэклампсией // Дисс. ... канд. биол. наук. Москва. - 2016.
9. Зиганшина М. М. и др. Аутоантитела к антигенам эндотелия при преэклампсии // Акушерство и гинекология. 2016а. Т. 3. С. 24–31.
10. Зиганшина М. М. и др. Гиалуроновая кислота в сосудистом и иммунном гомеостазе при физиологической беременности и преэклампсии // Acta Naturae. 2016b. Т. 8. № 3. С. 66–79.
11. Зиганшина М. М. и др. Гликом эндометрия в менструальном цикле и рецептивность эндометрия // Акушерство и гинекология. 2017а. Т. 12. С. 17–24.
12. Зиганшина М. М. и др. Антиэндотелиальные антитела – вершина айсберга: что находится внизу? // Успехи современной биологии. 2017b. Т. 137. С. 288–289.
13. Зиганшина М. М. и др. Спектр и диагностическое значение антигликановых антител, выявляемых при развитии больших акушерских синдромов, связанных с дефектами плацентации // Российский аллергологический журнал. 2018. Т. 15. № S1-2. С. 37–39.
14. 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. С. 267–269.

15. Зиганшина М. М. и др. Оценка экспрессии гликанов в эпителиальных структурах эндометрия как предиктивный фактор рецептивности эндометрия // Гинекология. 2020. Т. 22. № 6. С. 38–43.
16. 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. 2022а. Т. 173. № 2. С. 252–257.
17. Зиганшина М. М. и др. Артериальная гипертензия как следствие дисфункции эндотелиального гликокаликса: современный взгляд на проблему сердечно-сосудистых заболеваний // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2022б. Т. 21. № 9. С. 91–103.
18. 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. 24. Т. 3. № 435–444.
19. 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.
20. Зиганшина М. М., Хайдуков С. В. Визуализация V10-регуляторных клеток в периферической крови при физиологической беременности // Российский иммунологический журнал. 2021. Т. 24. № 2. С. 269–274.
21. Игнатьева Н. В. и др. Выделение иммуноглобулинов класса G, ассоциированных с тканью плаценты человека // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2019. Т. 167. № 1. С. 129–132.
22. Каримова Г. Н. Совершенствование клинико-лабораторных подходов к прогнозированию, диагностике и тактике лечения послеродового эндометрита // Дисс. ... канд. мед. наук. Москва. - 2017.
23. Куликова Г. В. и др. Сравнительная характеристика 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.
24. Мантрова Д. А. Синдром задержки роста плода: клинико-иммунологические и морфологические параллели // Дисс. ... канд. мед. наук. Москва. - 2020.
25. Михайлова В. А. Лимфоциты врожденного иммунитета эндометрия и децидуальной оболочки // Иммунология. 2019. Т. 40. № 3. С. 83–92.
26. Нагоев Т. М. и др. Материнская гемодинамика и преэклампсия // Акушерство и гинекология. 2020. Т. 1. С. 5–11.
27. Обухова П. С. Специфичность естественных анти-углеводных антител человека в норме // Дисс. ... канд. хим. наук. Москва. - 2011.

28. Обухова П. С. и др. Антитела против необычных форм сиалированных гликанов // Acta Naturae. 2022. Т. 14. № 2. С. 85–92.
29. Обухова П. С. и др. Межгрупповой АВ0-конфликт матери и плода: роль анти-гликановых антител в развитии гемолитической болезни новорожденных // Медицинская иммунология. 2021. Т. 23. № 1. С. 7–24.
30. Сидорова И. С., Никитина Н. А., Унанян А. Л. Преэклампсия и снижение материнской смертности в России // Акушерство и гинекология. 2018. Т. 1. С. 107–112.
31. Супоницкая Е. В. и др. Гомеостаз В-лимфоцитов и направления анти-В-клеточной терапии при ревматоидном артрите // Научно-практическая ревматология. 2013. Т. 51. № 4. С. 432–438.
32. Трифонова Н. С. Особенности течения беременности, родов, послеродового периода и перинатальные исходы у женщин с полностью аллогенным плодом // Дисс. докт. мед. наук. Москва. - 2020.
33. Тупицын Н. Н. и др. Снижение уровня специфических антител к углеводному антигену LEc у больных раком молочной железы // Иммунология. 2008. Т. 29. № 2. С. 94–97.
34. Тютюнник Н. В. Клинико-патогенетические особенности преэклампсии на основании изучения уровня антигликановых антител и углеводного профиля плаценты // Дисс. ... канд. мед. наук. Москва. - 2019.
35. Хайдуков С. В. и др. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлюориметров-анализаторов» // Российский иммунологический журнал. 2012. Т. 8. № 17. С. 974–992.
36. Хасбиуллина Н. Р. Репертуар антигликановых антител человека в первые месяцы жизни // Дисс. ... канд. биол. наук. Москва. - 2019.
37. Шевченко Ю. А., Назаров К. В., Сенников С. В. Клеточные механизмы поддержания фетоматеринской толерантности во время беременности // Медицинская иммунология. 2023. Т. 25. № 2. С. 253–270.
38. Шилова Н. В. и др. Гликоэпителии в изучении гликан-белкового взаимодействия // Российский иммунологический журнал. 2019. Т. 13. № 22. С. 987–990.
39. Шилова Н. В. и др. Отрицательная корреляция между естественными антителами человека, направленными к гликотопам Gal β 1-3GlcNAc и Gal β 1-4GlcNAc // Биоорганическая химия. 2020. Т. 46. № 6. С. 746–752.
40. Шилова Н. В. и др. Гликоэпителии в диагностике и терапии заболеваний органов женской репродуктивной системы // Российский иммунологический журнал. 2021. Т. 24. № 3. С. 419–425.
41. Ярыгина Т. А., Гус А. И. Задержка (замедление) роста плода: все, что необходимо знать практикующему врачу // Акушерство и гинекология. 2020. Т. 12. С. 14–24.

42. Abrahams V. M. et al. Macrophages and Apoptotic Cell Clearance During Pregnancy // *Am. J. Reprod. Immunol.* 2004. Vol. 51. No 4. P. 275–282.
43. Abu-Raya B. et al. Maternal Immunological Adaptation During Normal Pregnancy // *Front. Immunol.* 2020. Vol. 11.
44. Adu-Gyamfi E. A. et al. The Involvement of Cell Adhesion Molecules, Tight Junctions, and Gap Junctions in Human Placentation // *Reprod. Sci.* 2021. Vol. 28. No 2. P. 305–320.
45. Agita A., Alsagaff M. T. Inflammation, Immunity, and Hypertension. // *Acta Medica Indones.* 2017. Vol. 49. No 2. P. 158–165.
46. Aisagbonhi O., Morris G. P. Human Leukocyte Antigens in Pregnancy and Preeclampsia // *Front. Genet.* 2022. Vol. 13.
47. Alexander K. L. et al. Modulation of glycosyltransferase ST6Gal-I in gastric cancer-derived organoids disrupts homeostatic epithelial cell turnover // *J. Biol. Chem.* 2020. Vol. 295. No 41. P. 14153–14163.
48. Alkan Ozdemir S. et al. Reference values of serum IgG and IgM levels in preterm and term newborns // *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 2016. Vol. 29. No 6. P. 972–976.
49. Alves I. et al. Glycans as a key factor in self and nonself discrimination: impact on the breach of immune tolerance // *FEBS Lett.* 2022. Vol. 596. No 12. P. 1485–1502.
50. Amirchaghmaghi E. et al. The role of toll like receptors in pregnancy. // *Int. J. Fertil. Steril.* 2013. Vol. 7. No 3. P. 147–54.
51. Amon R. et al. Glycans in immune recognition and response // *Carbohydr. Res.* 2014. Vol. 389. P. 115–122.
52. Amon R. et al. Directed Evolution of Therapeutic Antibodies Targeting Glycosylation in Cancer // *Cancers.* 2020. Vol. 12. No 10. P. 2824.
53. Ananth C. V., Friedman A. M. Ischemic placental disease and risks of perinatal mortality and morbidity and neurodevelopmental outcomes // *Semin. Perinatol.* 2014. Vol. 38. No 3. P. 151–158.
54. Ander S. E., Diamond M. S., Coyne C. B. Immune responses at the maternal-fetal interface // *Sci. Immunol.* 2019. Vol. 4. No 31.
55. Apostolopoulos V., Sandrin M. S., McKenzie I. F. C. Carbohydrate/peptide mimics: effect on MUC1 cancer immunotherapy // 1999. Vol. 77. No 5. P. 427-36.
56. Apps R. et al. A homodimeric complex of HLA-G on normal trophoblast cells modulates antigen-presenting cells via LILRB1 // *Eur. J. Immunol.* 2007. Vol. 37. No 7. P. 1924–1937.
57. Arikawa T. et al. Expression pattern of Galectin 4 in rat placentation // *Placenta.* 2012. Vol. 33. No 10. P. 885–887.

58. Arkwright P. D. et al. Suppression of allogeneic reactivity in vitro by the syncytiotrophoblast membrane glycocalyx of the human term placenta is carbohydrate dependent // *Glycobiology*. 1994. Vol. 4. No 1. P. 39–47.
59. Awoyemi T. et al. Glycosylated Siglec-6 expression in syncytiotrophoblast-derived extracellular vesicles from preeclampsia placentas // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2020. Vol. 533. No 4. P. 838–844.
60. Azimzadeh Irani M., Kannan S., Verma C. Role of α -glycosylation in EGFR ectodomain ligand binding // *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 2017. Vol. 85. No 8. P. 1529–1549.
61. Baba E. et al. N-linked carbohydrate on human leukocyte antigen-C and recognition by natural killer cell inhibitory receptors // *Hum. Immunol.* 2000. Vol. 61. No 12. P. 1202–1218.
62. Bachmayer N. et al. Aberrant Uterine Natural Killer (NK)-Cell Expression and Altered Placental and Serum Levels of the NK-Cell Promoting Cytokine Interleukin-12 in Pre-Eclampsia // *Am. J. Reprod. Immunol.* 2006. Vol. 56. No 5–6. P. 292–301.
63. Bahkali N. M. et al. Association between intrauterine fetal growth restriction and ABO blood groups at King Abdulaziz University Hospital, Saudi Arabia // *Saudi Med. J.* 2023. Vol. 44. No 12. P. 1295–1299.
64. Bai X. et al. A Placental Protective Role for Trophoblast-Derived TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) // *Placenta*. 2009. Vol. 30. No 10. P. 855–860.
65. Baker B. C. et al. Hypoxia and oxidative stress induce sterile placental inflammation in vitro // *Sci. Rep.* 2021. Vol. 11. No 1. P. 7281.
66. Balogh A. et al. Placental Galectins Are Key Players in Regulating the Maternal Adaptive Immune Response // *Front. Immunol.* 2019. Vol. 10. P. 1240.
67. Banerjee S. et al. Etiological Value of Sterile Inflammation in Preeclampsia: Is It a Non-Infectious Pregnancy Complication? // 2021. Vol. 11. P. 694298.
68. Barnhart H. X., Haber M., Song J. Overall Concordance Correlation Coefficient for Evaluating Agreement Among Multiple Observers // *Biometrics*. 2002. Vol. 58. No 4. P. 1020–1027.
69. Barrientos G. et al. Low levels of serum asymmetric antibodies as a marker of threatened pregnancy // *J. Reprod. Immunol.* 2009. Vol. 79. No 2. P. 201–210.
70. Barrientos G. et al. Involvement of galectin-1 in reproduction: past, present and future // *Hum. Reprod. Update*. 2014. Vol. 20. No 2. P. 175–193.
71. Barrientos G. et al. The placenta, fetomaternal tolerance and beyond: A tribute to Sir Peter Medawar on the 60th anniversary of his Nobel Prize // *Front. Immunol.* 2022. Vol. 13. P. 1021885.
72. Barski A. et al. Rapid Recall Ability of Memory T cells is Encoded in their Epigenome // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7. No 1. P. 39785.

73. Barut F. et al. Intrauterine growth restriction and placental angiogenesis // *Diagn. Pathol.* 2010. Vol. 5. No 1. P. 24.
74. Basha S., Surendran N., Pichichero M. Immune responses in neonates // *Expert Rev. Clin. Immunol.* 2014. Vol. 10. No 9. P. 1171–1184.
75. Belisle J. A. et al. Identification of Siglec-9 as the receptor for MUC16 on human NK cells, B cells, and monocytes // *Mol. Cancer.* 2010. Vol. 9. No 1. P. 118.
76. Bennstein S. B. et al. Umbilical cord blood-derived ILC1-like cells constitute a novel precursor for mature KIR+NKG2A- NK cells // *eLife.* 2020. Vol. 9.
77. Bernardi F. C. B. et al. Oxidative Damage, Inflammation, and Toll-Like Receptor 4 Pathway Are Increased in Preeclamptic Patients: A Case-Control Study // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2012. Vol. 2012. P. 1–6.
78. Beutler B. A. TLRs and innate immunity // *Blood.* 2009. Vol. 113. No 7. P. 1399–407.
79. Bhat N. M. et al. Human CD5+ B lymphocytes (B-1 cells) decrease in peripheral blood during pregnancy // *J. Reprod. Immunol.* 1995. Vol. 28. No 1. P. 53–60.
80. Blank M. et al. Anti-GalNAc β : A novel anti-glycan autoantibody associated with pregnancy loss in women with antiphospholipid syndrome and in a mouse experimental model // *J. Autoimmun.* 2012. Vol. 39. No 4. P. 420–427.
81. Blidner A. G., Rabinovich G. A. ‘Sweetening’ Pregnancy: Galectins at the Fetomaternal Interface // *Am. J. Reprod. Immunol.* 2013. Vol. 69. No 4. P. 369–382.
82. Blixt O. et al. Analysis of Tn antigenicity with a panel of new IgM and IgG1 monoclonal antibodies raised against leukemic cells // *Glycobiology.* 2012. Vol. 22. No 4. P. 529–542.
83. Blois S. M. et al. A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance // *Nat. Med.* 2007a. Vol. 13. No 12. P. 1450–1457.
84. Blois S. M. et al. Dendritic Cells: Key to Fetal Tolerance? // *Biol. Reprod.* 2007b. Vol. 77. No 4. P. 590–598.
85. Böckle B. C. et al. DC-SIGN+ CD163+ Macrophages Expressing Hyaluronan Receptor LYVE-1 Are Located within Chorion Villi of the Placenta // *Placenta.* 2008. Vol. 29. No 2. P. 187–192.
86. Boers K. E. et al. Induction versus expectant monitoring for intrauterine growth restriction at term: randomised equivalence trial (DIGITAT) // *BMJ.* 2010. Vol. 341. No dec21 1. P. c7087–c7087.
87. Bohnhorst J. Ø. et al. Bm1–Bm5 Classification of Peripheral Blood B Cells Reveals Circulating Germinal Center Founder Cells in Healthy Individuals and Disturbance in the B Cell Subpopulations in Patients with Primary Sjögren’s Syndrome // *J. Immunol.* 2001. Vol. 167. No 7. P. 3610–3618.
88. Borel I. M. et al. Asymmetrically glycosylated IgG isolated from non-immune human sera // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1989. Vol. 990. No 2. P. 162–164.

89. Borel I. M. et al. IgG asymmetric molecules with antipaternal activity isolated from sera and placenta of pregnant human // *J. Reprod. Immunol.* 1991. Vol. 20. No 2. P. 129–140.
90. Borowski S. et al. Altered Glycosylation Contributes to Placental Dysfunction Upon Early Disruption of the NK Cell-DC Dynamics // *Front. Immunol.* 2020. Vol. 11. P. 1360.
91. Borzychowski A. M. et al. Changes in systemic type 1 and type 2 immunity in normal pregnancy and pre-eclampsia may be mediated by natural killer cells // *Eur. J. Immunol.* 2005. Vol. 35. No 10. P. 3054–3063.
92. Bovin N. et al. Repertoire of human natural anti-glycan immunoglobulins. Do we have auto-antibodies? // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 2012. Vol. 1820. No 9. P. 1373–1382.
93. Bovin N. V. Natural antibodies to glycans // *Biochem. Mosc.* 2013. Vol. 78. No 7. P. 786–797.
94. Box G. E. P., Cox D. R. An Analysis of Transformations // *J. R. Stat. Soc. Ser. B Stat. Methodol.* 1964. Vol. 26. No 2. P. 211–243.
95. Boyson J. E. et al. CD1d and invariant NKT cells at the human maternal-fetal interface // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002. Vol. 99. No 21. P. 13741–13746.
96. Brinkman-Van der Linden E. C. M. et al. Human-specific expression of Siglec-6 in the placenta // *Glycobiology.* 2007. Vol. 17. No 9. P. 922–931.
97. Brosens I. et al. The “Great Obstetrical Syndromes” are associated with disorders of deep placentation // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2011. Vol. 204. No 3. P. 193–201.
98. Brown G. D., Willment J. A., Whitehead L. C-type lectins in immunity and homeostasis // *Nat. Rev. Immunol.* 2018. Vol. 18. No 6. P. 374–389.
99. Budeus B. et al. Human Cord Blood B Cells Differ from the Adult Counterpart by Conserved Ig Repertoires and Accelerated Response Dynamics // *J. Immunol.* 2021. Vol. 206. No 12. P. 2839–2851.
100. Burton G. J., Jauniaux E. What is the placenta? // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2015. Vol. 213. No 4. P. S6.e1-S6.e4.
101. Canellada A. et al. In Vitro Modulation of Protective Antibody Responses by Estrogen, Progesterone and Interleukin-6 // *Am. J. Reprod. Immunol.* 2002a. Vol. 48. No 5. P. 334–343.
102. Canellada A. et al. Interleukin Regulation of Asymmetric Antibody Synthesized by Isolated Placental B Cells // *Am. J. Reprod. Immunol.* 2002b. Vol. 48. No 4. P. 275–282.
103. Cao Y. et al. The fucosylated histo-blood group antigens H type 2 (blood group O. CD173) and Lewis Y (CD174) are expressed on CD34+ hematopoietic progenitors but absent on mature lymphocytes // *Glycobiology.* 2001. Vol. 11. No 8. P. 677–683.

104. Cao Z. et al. Galectins-3 and -7, but not Galectin-1, Play a Role in Re-epithelialization of Wounds // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277. No 44. P. 42299–42305.
105. Casey K. A., Mescher M. F. IL-21 Promotes Differentiation of Naive CD8 T Cells to a Unique Effector Phenotype // *J. Immunol.* 2007. Vol. 178. No 12. P. 7640–7648.
106. Cedeno-Laurent F., Dimitroff C. J. Galectins and their ligands: negative regulators of anti-tumor immunity // *Glycoconj. J.* 2012. Vol. 29. No 8–9. P. 619–625.
107. Cellini M. et al. Recurrent Pregnancy Loss in Women with Hashimoto's Thyroiditis with Concurrent Non-Endocrine Autoimmune Disorders // *Thyroid.* 2020. Vol. 30. No 3. P. 457–462.
108. Chamley L. W., Pattison N. S., McKay E. J. Elution of anticardiolipin antibodies and their cofactor β 2-glycoprotein 1 from the placenta of patients with a poor obstetric history // *J. Reprod. Immunol.* 1993. Vol. 25. No 3. P. 209–220.
109. Chan C. T. et al. Obligatory Role for B Cells in the Development of Angiotensin II-Dependent Hypertension // *Hypertension.* 2015. Vol. 66. No 5. P. 1023–1033.
110. Chandler K. B. et al. N-Glycosylation regulates ligand-dependent activation and signaling of vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) // *J. Biol. Chem.* 2019. Vol. 294. No 35. P. 13117–13130.
111. Chang R.-Q., Li D.-J., Li M.-Q. The role of indoleamine-2,3-dioxygenase in normal and pathological pregnancies // *Am. J. Reprod. Immunol.* 2018. Vol. 79. No 4. e12786.
112. Chaouat G. et al. Cytokines, implantation and early abortion: re-examining the Th1/Th2 paradigm leads to question the single pathway, single therapy concept // *Am. J. Reprod. Immunol.* 2003. Vol. 50. No 3. P. 177–186.
113. Chen Q. et al. Evidence for Differential Glycosylation of Trophoblast Cell Types // *Mol. Cell. Proteomics.* 2016. Vol. 15. No 6. P. 1857–1866.
114. Chen Y.-H. et al. Regulation of CD28 expression on umbilical cord blood and adult peripheral blood CD8⁺ T cells by interleukin(IL)-15/IL-21 // *Cytokine.* 2012. Vol. 58. No 1. P. 40–46.
115. Chen Z. et al. Memory regulatory T cells in pregnancy // *Front. Immunol.* 2023. Vol. 14. P.1209706.
116. Chien C.-H., Chiang B.-L. Regulatory T cells induced by B cells: a novel subpopulation of regulatory T cells // *J. Biomed. Sci.* 2017. Vol. 24. No 1. P. 86.
117. Chieppa M. et al. Cross-Linking of the Mannose Receptor on Monocyte-Derived Dendritic Cells Activates an Anti-Inflammatory Immunosuppressive Program // *J. Immunol.* 2003. Vol. 171. No 9. P. 4552–4560.
118. Chiffoleau E. C-Type Lectin-Like Receptors As Emerging Orchestrators of Sterile Inflammation Represent Potential Therapeutic Targets // *Front. Immunol.* 2018. Vol. 9.

119. Chongsaritsinsuk J. et al. Glycoproteomic landscape and structural dynamics of TIM family immune checkpoints enabled by mucinase SmE // *Nat. Commun.* 2023. Vol. 14. No 1. P. 6169.
120. Chou M.-Y. et al. Oxidation-specific epitopes are dominant targets of innate natural antibodies in mice and humans // *J. Clin. Invest.* 2009. Vol. 119. No 5. P. 1335–1349.
121. Choudhury R. H. et al. Extravillous Trophoblast and Endothelial Cell Crosstalk Mediates Leukocyte Infiltration to the Early Remodeling Decidual Spiral Arteriole Wall // *J. Immunol.* 2017. Vol. 198. No 10. P. 4115–4128.
122. Christiane Y. et al. Galactose alpha 1-3 galactose and anti-alpha galactose antibody in normal and pathological pregnancies // *Placenta.* 1992. Vol. 13. No 5. P. 475–487.
123. Christiansen D. et al. Studies on carbohydrate xenoantigens // *Methods Mol. Biol.* 2012. Vol. 885. P. 47–56.
124. Christiansen O. B. Reproductive immunology // *Mol. Immunol.* 2013. Vol. 55. No 1. P. 8–15.
125. Clark D. A. et al. Placental Trophoblast from Successful Human Pregnancies Expresses the Tolerance Signaling Molecule, CD200 (OX-2) // *Am. J. Reprod. Immunol.* 2003. Vol. 50. No 3. P. 187–195.
126. Clark D. A. et al. Review article: Tolerance Mechanisms in Pregnancy: A Reappraisal of the Role of Class I Paternal MHC Antigens // *Am. J. Reprod. Immunol.* 2010. Vol. 63. No 2. P. 93–103.
127. Clark G. F. et al. A role for glycoconjugates in human development: the human fetο-embryonic defence system hypothesis // *Hum. Reprod.* 1996. Vol. 11. No 3. P. 467–473.
128. Clark G. F. et al. The Species Recognition System: A New Corollary for the Human Fetoembryonic Defense System Hypothesis // *Cells Tissues Organs.* 2001. Vol. 168. No 1–2. P. 113–121.
129. Clark G. F. The role of glycans in immune evasion: the human fetοembryonic defence system hypothesis revisited // *MHR Basic Sci. Reprod. Med.* 2014. Vol. 20. No 3. P. 185–199.
130. Clark G. F., Schust D. J. Manifestations of immune tolerance in the human female reproductive tract // *Front. Immunol.* 2013. Vol. 4.
131. Clemente L. et al. Adenoviral transduction of EGFR into pregnancy-adapted uterine artery endothelial cells remaps growth factor induction of endothelial dysfunction // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2020. Vol. 499. P. 110590.
132. Clemente L., Bird I. M. The epidermal growth factor receptor in healthy pregnancy and preeclampsia // *J. Mol. Endocrinol.* 2023. Vol. 70. No 1. e220105.

133. Clements T. et al. Update on Transplacental Transfer of IgG Subclasses: Impact of Maternal and Fetal Factors // *Front. Immunol.* 2020. Vol. 11. P. 1920.
134. Cohen-Solal J. F. G. et al. Sex Hormones and SLE: Influencing the Fate of Autoreactive B Cells // *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006. Vol. 305. P. 67–88.
135. Cooper D. K. C. Xenoantigens and xenoantibodies // *Xenotransplantation.* 1998. Vol. 5. No 1. P. 6–17.
136. Cooper D. K. C. The Long and Winding Road to Clinical Xenotransplantation: A Personal Journey // *Eur. Surg. Res.* 2022. Vol. 63. No 4. P. 165–172.
137. Cox L. S., Redman C. The role of cellular senescence in ageing of the placenta // *Placenta.* 2017. Vol. 52. P. 139–145.
138. Crocker P. R., Redelinghuys P. Siglecs as positive and negative regulators of the immune system // *Biochem. Soc. Trans.* 2008. Vol. 36. No 6. P. 1467–1471.
139. Crocker P. R., Varki A. Siglecs in the immune system // *Immunology.* 2001. Vol. 103. No 2. P. 137–145.
140. Csabai T. et al. Altered Immune Response and Implantation Failure in Progesterone-Induced Blocking Factor-Deficient Mice // *Front. Immunol.* 2020. Vol. 11. P. 349.
141. Dai S.-Y. et al. Hypoxia-inducible factor-2 α is involved in enhanced apoptosis in the placenta from pregnancies with fetal growth restriction // *Pathol. Int.* 2004. Vol. 54. No 11. P. 843–849.
142. Darmochwal-Kolarz D. et al. Apoptosis signaling is altered in CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T regulatory lymphocytes in pre-eclampsia // *Int. J. Mol. Sci.* 2012. Vol. 13. No 6. P. 6548–6560.
143. Darton T. C. et al. Identification of Novel Serodiagnostic Signatures of Typhoid Fever Using a Salmonella Proteome Array // *Front. Microbiol.* 2017. Vol. 8.
144. Dean J. W., Chandrasekaran S., Tanzer M. L. A biological role of the carbohydrate moieties of laminin. // *J. Biol. Chem.* 1990. Vol. 265. No 21. P. 12553–62.
145. Demmert M. et al. Galectin-3 in cord blood of term and preterm infants // *Clin. Exp. Immunol.* 2012. Vol. 167. No 2. P. 246–251.
146. Deng L., Chen X., Varki A. Exploration of Sialic Acid Diversity and Biology Using Sialoglycan Microarrays // *Biopolymers.* 2013. Vol. 99. No 10. P. 650–665.
147. Di Lella S. et al. When Galectins Recognize Glycans: From Biochemistry to Physiology and Back Again // *Biochemistry.* 2011. Vol. 50. No 37. P. 7842–7857.
148. Di Renzo G. C. et al. Progesterone in normal and pathological pregnancy // *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* 2016. Vol. 27. No 1. P. 35–48.
149. Diamond M. S. et al. Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation // *Cell.* 1991. Vol. 65. No 6. P. 961–971.

150. Diebolder C. A. et al. Complement Is Activated by IgG Hexamers Assembled at the Cell Surface // *Science*. 2014. Vol. 343. No 6176. P. 1260–1263.
151. Dingwell L. S. et al. B-Cell Deficiency Lowers Blood Pressure in Mice // *Hypertension*. 2019. Vol. 73. No 3. P. 561–570.
152. Dobrochaeva K. et al. Specificity of human natural antibodies referred to as anti-Tn // *Mol. Immunol.* 2020a. Vol. 120. P. 74–82.
153. Dobrochaeva K. et al. Human Natural Antibodies Recognizing Glycan Gal β 1-3GlcNAc (LeC) // *Int. J. Mol. Sci.* 2020b. Vol. 21. No 18. P. 6511.
154. Dobrochaeva K. et al. Specificity profile of α Gal antibodies in α GalT KO mice as probed with comprehensive printed glycan array: Comparison with human anti-Galili antibodies // *Xenotransplantation*. 2021. Vol. 28. No 3. e12672.
155. Dobrokhotova Y. E. et al. Placental vasculogenesis and angiogenesis in women undergoing chemotherapy // *Russ. J. Woman Child Health*. 2021. Vol. 4. No 1. P. 23–30.
156. Dotz V., Wuhler M. Histo-blood group glycans in the context of personalized medicine // *Biochim. Biophys. Acta*. 2016. Vol. 1860. No 8. P. 1596–1607.
157. Dridi L. et al. Positive Regulation of Insulin Signaling by Neuraminidase 1 // *Diabetes*. 2013. Vol. 62. No 7. P. 2338–2346.
158. Drobnjak T. et al. Placental protein 13 (PP13)-induced vasodilation of resistance arteries from pregnant and nonpregnant rats occurs via endothelial-signaling pathways // *Hypertens. Pregnancy*. 2017. Vol. 36. No 2. P. 186–195.
159. Drobnjak T. et al. Placental protein 13 (PP13) stimulates rat uterine vessels after slow subcutaneous administration // *Int. J. Womens Health*. 2019. Vol. Volume 11. P. 213–222.
160. Duan S., Paulson J. C. Siglecs as Immune Cell Checkpoints in Disease // *Annu. Rev. Immunol.* 2020. Vol. 38. No 1. P. 365–395.
161. Duchamp M. et al. B-cell subpopulations in children: National reference values // *Immun. Inflamm. Dis.* 2014. Vol. 2. No 3. P. 131–140.
162. Dye J. F. et al. Phenotype of the Endothelium in the Human Term Placenta // *Placenta*. 2001. Vol. 22. No 1. P. 32–43.
163. Eblen A. C. et al. Alterations in humoral immune responses associated with recurrent pregnancy loss // *Fertil. Steril.* 2000. Vol. 73. No 2. P. 305–313.
164. Endo T. Mammalian O-mannosyl glycans: Biochemistry and glycopathology // *Proc. Jpn. Acad. Ser. B*. 2019. Vol. 95. No 1. P. 39–51.
165. Enninga E. A. L. et al. Immunomodulatory Effects of Sex Hormones: Requirements for Pregnancy and Relevance in Melanoma // *Mayo Clin. Proc.* 2014. Vol. 89. No 4. P. 520–535.
166. Erden A. et al. Are the blood groups of women with preeclampsia a risk factor for the development of hypertension postpartum? // *Ther. Clin. Risk Manag.* 2016. P. 617.

167. Erez O. et al. Preeclampsia and eclampsia: the conceptual evolution of a syndrome // 2022. Vol. 226(2S). S786-S803.
168. Erlebacher A. Mechanisms of T cell tolerance towards the allogeneic fetus // *Nat. Rev. Immunol.* 2013a. Vol. 13. No 1. P. 23–33.
169. Erlebacher A. Immunology of the Maternal-Fetal Interface // *Annu. Rev. Immunol.* 2013b. Vol. 31. No 1. P. 387–411.
170. Esteve-Solé A. et al. B Regulatory Cells: Players in Pregnancy and Early Life // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. Vol. 19. No 7. P. 2099.
171. Faulk W. P. et al. Immunological Studies of the Human Placenta Characterization of immunoglobulins on trophoblastic basement membranes // *J. Clin. Invest.* 1974. Vol. 54. No 5. P. 1011–1019.
172. Fedotcheva T. A., Fedotcheva N. I., Shimanovsky N. L. Progesterone as an Anti-Inflammatory Drug and Immunomodulator: New Aspects in Hormonal Regulation of the Inflammation // *Biomolecules.* 2022. Vol. 12. No 9. P. 1299.
173. Feduska J. M. et al. N-glycosylation of ICAM-2 is required for ICAM-2-mediated complete suppression of metastatic potential of SK-N-AS neuroblastoma cells. // *BMC Cancer.* 2013. Vol. 13. P. 261.
174. Feige J. J., Baird A. Glycosylation of the basic fibroblast growth factor receptor. The contribution of carbohydrate to receptor function. // *J. Biol. Chem.* 1988. Vol. 263. No 28. P. 14023–9.
175. Feinberg H. et al. Structural Basis for Selective Recognition of Oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR // *Science.* 2001. Vol. 294. No 5549. P. 2163–2166.
176. Fenton T. R. et al. Validating the weight gain of preterm infants between the reference growth curve of the fetus and the term infant // *BMC Pediatr.* 2013. Vol. 13. No 1. P. 92.
177. Ferrante A., Beard L. J., Feldman R. G. IgG subclass distribution of antibodies to bacterial and viral antigens // *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1990. Vol. 9. No Supplement. P. 516–524.
178. Figueras F., Gratacós E. Update on the Diagnosis and Classification of Fetal Growth Restriction and Proposal of a Stage-Based Management Protocol // *Fetal Diagn. Ther.* 2014. Vol. 36. No 2. P. 86–98.
179. Fives K. R. et al. Hemolytic Disease of the Fetus and Newborn Due to Anti-Gonzales Antibody // *Cureus.* 2023. Vol.15. No 3. e36860.
180. Flores-Borja F. et al. CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation // *Sci. Transl. Med.* 2013. Vol. 5. No 173.
181. Fontenot J. D. et al. Regulatory T Cell Lineage Specification by the Forkhead Transcription Factor Foxp3 // *Immunity.* 2005. Vol. 22. No 3. P. 329–341.

182. Fontenot J. D., Gavin M. A., Rudensky A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells // *Nat. Immunol.* 2003. Vol. 4. No 4. P. 330–336.
183. Fournier T., Guibourdenche J., Evain-Brion D. Review: hCGs: Different sources of production, different glycoforms and functions // *Placenta.* 2015. Vol. 36. P. S60–S65.
184. Fowler C. B. et al. Tissue Microarrays: Construction and Uses // *Methods Mol Biol.* 2011. Vol. 724. P. 23–35.
185. Franchini M., Mengoli C., Lippi G. Relationship between ABO blood group and pregnancy complications: a systematic literature analysis. // *Blood Transfus. Trasfus. Sangue.* 2016. Vol. 14. No 5. P. 441–8.
186. Frank P. G., Lisanti M. P. ICAM-1: Role in inflammation and in the regulation of vascular permeability // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008. Vol. 95. No 3. P. H926–H927.
187. Freitag N. et al. Interfering with Gal-1–mediated angiogenesis contributes to the pathogenesis of preeclampsia // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2013. Vol. 110. No 28. P. 11451–11456.
188. Freitag N. et al. Influence of relative NK–DC abundance on placentation and its relation to epigenetic programming in the offspring // *Cell Death Dis.* 2014. Vol. 5. No 8. P. e1392–e1392.
189. Freitag N. et al. The chimera-type galectin-3 is a positive modulator of trophoblast functions with dysregulated expression in gestational diabetes mellitus // *Am. J. Reprod. Immunol.* 2020a. Vol. 84. No 6.
190. Freitag N. et al. Galectin-3 deficiency in pregnancy increases the risk of fetal growth restriction (FGR) via placental insufficiency // *Cell Death Dis.* 2020b. Vol. 11. No 7. P. 560.
191. Frevert C. W. et al. Danger-Associated Molecular Patterns Derived From the Extracellular Matrix Provide Temporal Control of Innate Immunity // *J. Histochem. Cytochem.* 2018. Vol. 66. No 4. P. 213–227.
192. Froehlich R. et al. Galectin fingerprinting detects differences in expression profiles between bovine endometrium and placentomes as well as early and late gestational stages // *Placenta.* 2012. Vol. 33. No 3. P. 195–201.
193. Fu C. et al. Neonatal lupus erythematosus as a rare trigger of gastrointestinal involvement in neonates // *Sci. Rep.* 2024. Vol. 14. No 1. P. 3791.
194. Fujimaki W. et al. Comparative study of regulatory T cell function of human CD25⁺CD4⁺ T cells from thymocytes, cord blood, and adult peripheral blood // *Clin. Dev. Immunol.* 2008. Vol. 2008. P. 1–12.
195. Fukumori T. et al. CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis. // *Cancer Res.* 2003. Vol. 63. No 23. P. 8302–11.

196. Gabius H.-J., Kayser K. Introduction to glycopathology: the concept, the tools and the perspectives // *Diagn. Pathol.* 2014. Vol. 9. No 1. P. 4.
197. Galili U. The α -gal epitope (Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R) in xenotransplantation // *Biochimie.* 2001. Vol. 83. No 7. P. 557–563.
198. Gao Y. et al. Role of Glycans on Key Cell Surface Receptors That Regulate Cell Proliferation and Cell Death // *Cells.* 2021. Vol. 10. No 5. P. 1252.
199. Garcia-Vallejo J. J., Kooyk Y. van. The physiological role of DC-SIGN: A tale of mice and men // *Trends Immunol.* 2013. Vol. 34. No 10. P. 482–486.
200. Garcia-Vallejo J. J., Kooyk Y. van. DC-SIGN: The Strange Case of Dr. Jekyll and Mr. Hyde // *Immunity.* 2015. Vol. 42. No 6. P. 983–985.
201. Geijtenbeek T. B. H., Gringhuis S. I. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses // *Nat. Rev. Immunol.* 2009. Vol. 9. No 7. P. 465–479.
202. Gentile T., Margni R. A. IgG asymmetric anti-ovalbumin antibodies synthesized by virgin and pregnant rats // *J. Reprod. Immunol.* 1995. Vol. 28. No 1. P. 1–13.
203. Ghafourian M. et al. The Role of CD16+, CD56+, NK (CD16+/CD56+) and B CD20+ Cells in the Outcome of Pregnancy in Women with Recurrent Spontaneous Abortion // *Int. J. Womens Health Reprod. Sci.* 2015. Vol. 3. No 1. P. 61–66.
204. Gillmann K. M. et al. Anti-glycan monoclonal antibodies: Basic research and clinical applications // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2023. Vol. 74. P. 102281.
205. Goettig P. Effects of Glycosylation on the Enzymatic Activity and Mechanisms of Proteases // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. Vol. 17. No 12. P. 1969.
206. Golias C. et al. Review. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules in inflammation focusing on inflammatory heart disease. // *Vivo Athens Greece.* 2007. Vol. 21. No 5. P. 757–69.
207. Gomes de Moraes A. L., Cerdá S., Miguel M. de. New Checkpoint Inhibitors on the Road: Targeting TIM-3 in Solid Tumors // *Curr. Oncol. Rep.* 2022. Vol. 24. No 5. P. 651–658.
208. Gomes Ferreira I. et al. Glycosylation as a Main Regulator of Growth and Death Factor Receptors Signaling // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. Vol. 19. No 2. P. 580.
209. Gong T. et al. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases // *Nat. Rev. Immunol.* 2020. Vol. 20. No 2. P. 95–112.
210. Gonzalez-Gil A., Schnaar R. L. Siglec Ligands // *Cells.* 2021. Vol. 10. No 5. P. 1260.
211. Gordijn S. J. et al. Consensus definition of fetal growth restriction: a Delphi procedure // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 2016. Vol. 48. No 3. P. 333–339.
212. Gourvas V. et al. Angiogenic factors in placentas from pregnancies complicated by fetal growth restriction // *Mol Med Rep.* 2012. Vol. 6. No 1. P. 23–7.

213. Green R. S. et al. Mammalian N-Glycan Branching Protects against Innate Immune Self-Recognition and Inflammation in Autoimmune Disease Pathogenesis // *Immunity*. 2007. Vol. 27. No 2. P. 308–320.
214. Green S. et al. Regulatory T Cells in Pregnancy Adverse Outcomes: A Systematic Review and Meta-Analysis // *Front. Immunol.* 2021. Vol. 12. P. 737862.
215. Grimaldi C. M., Michael D. J., Diamond B. Cutting Edge: Expansion and Activation of A Population of Autoreactive Marginal Zone B Cells in a Model of Estrogen-Induced Lupus // *J. Immunol.* 2001. Vol. 167. No 4. P. 1886–1890.
216. Grönwall C. et al. Modulation of natural IgM autoantibodies to oxidative stress-related neo-epitopes on apoptotic cells in newborns of mothers with anti-Ro autoimmunity // *J. Autoimmun.* 2016. Vol. 73. P. 30–41.
217. Grönwall C., Silverman G. J. Natural IgM: Beneficial Autoantibodies for the Control of Inflammatory and Autoimmune Disease // *J. Clin. Immunol.* 2014. Vol. 34. No S1. P. 12–21.
218. Gu J. et al. Fab fragment glycosylated IgG may play a central role in placental immune evasion // *Hum. Reprod.* 2015. Vol. 30. No 2. P. 380–391.
219. Guan Q. et al. Quantitative or qualitative transcriptional diagnostic signatures? A case study for colorectal cancer // *BMC Genomics*. 2018. Vol. 19. No 1. P. 99.
220. Gunten S. von et al. Intravenous immunoglobulin contains a broad repertoire of anticarbohydrate antibodies that is not restricted to the IgG2 subclass // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009. Vol. 123. No 6. P. 1268- 1276.e15.
221. Guo H.-B. et al. N-Acetylglucosaminyltransferase V Expression Levels Regulate Cadherin-associated Homotypic Cell-Cell Adhesion and Intracellular Signaling Pathways // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278. No 52. P. 52412–52424.
222. Guo J.-P., Li X.-G. Galectin-7 promotes the invasiveness of human oral squamous cell carcinoma cells via activation of ERK and JNK signaling // *Oncol. Lett.* 2017. Vol. 13. No 3. P. 1919–1924.
223. Gutierrez G. et al. Asymmetric Antibodies: A Protective Arm in Pregnancy // *Immunology of Pregnancy*. 2005. Vol. 89. P. 158–168.
224. Guzman-Genuino R. M., Diener K. R. Regulatory B Cells in Pregnancy: Lessons from Autoimmunity, Graft Tolerance, and Cancer // *Front. Immunol.* 2017. Vol. 8. P 172.
225. Ha S. et al. Isolation and characterization of IgG1 with asymmetrical Fc glycosylation // *Glycobiology*. 2011. Vol. 21. No 8. P. 1087–1096.
226. Hackmon R. et al. Definitive class I human leukocyte antigen expression in gestational placentation: HLA-F, HLA-E, HLA-C, and HLA-G in extravillous trophoblast invasion on placentation, pregnancy, and parturition // *Am. J. Reprod. Immunol.* 2017. Vol. 77. No 6. P. e12643.

227. Hadlock F. P. et al. Estimation of fetal weight with the use of head, body, and femur measurements—A prospective study // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1985. Vol. 151. No 3. P. 333–337.
228. Hall V., Vadakekut E. S., Avulakunta I. D. Hemolytic Disease of the Fetus and Newborn. , 2024.
229. Haltiwanger R. S. Fucose Is on the TRAIL of Colon Cancer // *Gastroenterology*. 2009. Vol. 137. No 1. P. 36–39.
230. Hammarström L. et al. Subclass restriction pattern of antigen-specific antibodies in donors with defective expression of IgG or IgA subclass heavy chain constant region genes // *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1987. Vol. 45. No 3. P. 461–470.
231. Hammarström L., Smith C. I. IgG2 deficiency in a healthy blood donor. Concomitant lack of IgG2, IgA and IgE immunoglobulins and specific anti-carbohydrate antibodies. // *Clin. Exp. Immunol.* 1983. Vol. 51. No 3. P. 600–4.
232. Hang J. et al. Protein O-mannosylation across kingdoms and related diseases: From glycobiology to glycopathology // *Biomed. Pharmacother.* 2022. Vol. 148. P. 112685.
233. Hanisch F.-G. et al. A B72.3 Second-Generation-Monoclonal Antibody (CC49) Defines the Mucin-Carried Carbohydrate Epitope Gal β (1—3) (NeuAc α (2—6))GalNAc // *Biol. Chem.* 1989. Vol. 370. No 1. P. 21–26.
234. Hanna J. et al. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface // *Nat. Med.* 2006. Vol. 12. No 9. P. 1065–1074.
235. Harbeson D. et al. Outgrowing the Immaturity Myth: The Cost of Defending From Neonatal Infectious Disease // *Front. Immunol.* 2018. Vol. 9. P. 1077.
236. Hashemi V. et al. Natural killer T cells in Preeclampsia: An updated review // 2017. Vol. 95. P. 412-418.
237. Hashii N., Ishii-Watabe A. Site-specific O-Glycosylation Analysis of Therapeutic Fc-fusion Protein by Mass Spectrometry // *Yakugaku zasshi*. 2018. Vol. 138. No 12. P. 1483–1494.
238. Hashino M. et al. Mannose receptor, C type 1 contributes to bacterial uptake by placental trophoblast giant cells // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2012. Vol. 66. No 3. P. 427–435.
239. Hattori T. Galectins: Their Network and Roles in Infection/Immunity/Tumor Growth Control 2021 // *Biomolecules*. 2022. Vol. 12. No 9. P. 1255.
240. Heindel D. W. et al. Glycomic analysis of host response reveals high mannose as a key mediator of influenza severity // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2020. Vol. 117. No 43. P. 26926–26935.
241. Helske S. et al. Expression of vascular endothelial growth factor receptors 1, 2 and 3 in placentas from normal and complicated pregnancies // *Mol. Hum. Reprod.* 2001. Vol. 7. No 2. P. 205–210.

242. Heusschen R. et al. Profiling Lgals9 Splice Variant Expression at the Fetal-Maternal Interface: Implications in Normal and Pathological Human Pregnancy // *Biol. Reprod.* 2013. Vol. 88. No 1. P. 22.
243. Higai K., Ichikawa A., Matsumoto K. Binding of sialyl Lewis X antigen to lectin-like receptors on NK cells induces cytotoxicity and tyrosine phosphorylation of a 17-kDa protein // *Biochim. Biophys. Acta.* 2006. Vol. 1760. No 9. P. 1355–1363.
244. Higuma-Myojo S. et al. Cytokine Profile of Natural Killer Cells in Early Human Pregnancy // *Am. J. Reprod. Immunol.* 2005. Vol. 54. No 1. P. 21–29.
245. Hinek A. et al. Neuraminidase-1, a Subunit of the Cell Surface Elastin Receptor, Desialylates and Functionally Inactivates Adjacent Receptors Interacting with the Mitogenic Growth Factors PDGF-BB and IGF-2 // *Am. J. Pathol.* 2008. Vol. 173. No 4. P. 1042–1056.
246. Hoek M. et al. Allotype-Specific Glycosylation and Cellular Localization of Human Leukocyte Antigen Class I Proteins // *J. Proteome Res.* 2021. Vol. 20. No 9. P. 4518–4528.
247. Hoffman M. K. The great obstetrical syndromes and the placenta // *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* 2023. Vol. 130. No S3. P. 8–15.
248. Holdbrooks A. T., Britain C. M., Bellis S. L. ST6Gal-I sialyltransferase promotes tumor necrosis factor (TNF)-mediated cancer cell survival via sialylation of the TNF receptor 1 (TNFR1) death receptor // *J. Biol. Chem.* 2018. Vol. 293. No 5. P. 1610–1622.
249. Hönig A. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) expression in invasive extravillous trophoblast supports role of the enzyme for materno-fetal tolerance // *J. Reprod. Immunol.* 2004. Vol. 61. No 2. P. 79–86.
250. Hoogen L. L. van den, Bisoendial R. J. B-Cells and BAFF in Primary Antiphospholipid Syndrome, Targets for Therapy? // *J. Clin. Med.* 2022. Vol. 12. No 1. P. 18.
251. Huang Z. et al. Roles of N-linked glycosylation and glycan-binding proteins in placentation: trophoblast infiltration, immunomodulation, angiogenesis, and pathophysiology // *Biochem. Soc. Trans.* 2023. Vol. 51. No 2. P. 639–653.
252. Huflejt M. E. et al. Anti-carbohydrate antibodies of normal sera: Findings, surprises and challenges // *Mol. Immunol.* 2009. Vol. 46. No 15. P. 3037–3049.
253. Huppertz B. et al. Longitudinal Determination of Serum Placental Protein 13 during Development of Preeclampsia // *Fetal Diagn. Ther.* 2008. Vol. 24. No 3. P. 230–236.
254. Hutter S. et al. Galectin 2 (gal-2) expression is downregulated on protein and mRNA level in placentas of preeclamptic (PE) patients // *Placenta.* 2015. Vol. 36. No 4. P. 438–445.
255. Hutter S. et al. Placental Expression Patterns of Galectin-1, Galectin-2, Galectin-3 and Galectin-13 in Cases of Intrauterine Growth Restriction (IUGR) // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. Vol. 17. No 4. P. 523.

256. Ibeto L. et al. Insights into the hyperglycosylation of human chorionic gonadotropin revealed by glycomics analysis // PLOS ONE. 2020. Vol. 15. No 2. P. e0228507.
257. Itani H. A. et al. CD70 Exacerbates Blood Pressure Elevation and Renal Damage in Response to Repeated Hypertensive Stimuli // Circ. Res. 2016a. Vol. 118. No 8. P. 1233–1243.
258. Itani H. A. et al. Activation of Human T Cells in Hypertension // Hypertension. 2016b. Vol. 68. No 1. P. 123–132.
259. Iwata Y. et al. Characterization of a rare IL-10–competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells // Blood. 2011. Vol. 117. No 2. P. 530–541.
260. Jajosky R. P. et al. ABO blood group antigens and differential glycan expression: Perspective on the evolution of common human enzyme deficiencies // 2023. Vol. 26. No 1. P. 105798.
261. Jensen F. et al. CD19⁺ CD5⁺ Cells as Indicators of Preeclampsia // Hypertension. 2012. Vol. 59. No 4. P. 861–868.
262. Jeon M.-Y. et al. Oridonin enhances TRAIL-induced apoptosis through GALNT14-mediated DR5 glycosylation // Biochimie. 2019. Vol. 165. P. 108–114.
263. Jeschke U. et al. Stimulierung der hCG-, Estrogen- und Progesteronproduktion in isolierten Trophoblastzellen durch Glycodelin A bzw seine N-Glycane // Z. Für Geburtshilfe Neonatol. 2005. Vol. 209. No 2. P. 59–64.
264. Jeschke U. et al. Expression of Galectin-1, -3 (gal-1, gal-3) and the Thomsen–Friedenreich (TF) Antigen in Normal, IUGR, Preeclamptic and HELLP Placentas // Placenta. 2007. Vol. 28. No 11–12. P. 1165–1173.
265. Jiang L.-L. et al. Severe hemolytic disease of the newborn caused by JKb antibody: Two case reports and literature review // Medicine. 2023. Vol. 102. No 30. P. e34390.
266. Jiang Y. et al. Aberrant O-glycosylation contributes to tumorigenesis in human colorectal cancer // J. Cell. Mol. Med. 2018. Vol. 22. No 10. P. 4875–4885.
267. Jiang Y. et al. O-glycans on death receptors in cells modulate their sensitivity to TRAIL-induced apoptosis through affecting on their stability and oligomerization // FASEB J. 2020. Vol. 34. No 9. P. 11786–11801.
268. Johannes L., Jacob R., Leffler H. Galectins at a glance // J. Cell Sci. 2018. Vol. 131. No 9. jcs208884.
269. John J. A., Draper N. R. An Alternative Family of Transformations // Appl. Stat. 1980. Vol. 29. No 2. P. 190.
270. Jones C. J. et al. Glycosylation in the near-term epitheliochorial placenta of the horse, donkey and camel: a comparative study of interbreeding and non-interbreeding species // Reproduction. 2000. Vol. 118. No 2. P. 397–405.

271. Jones C. J. P. et al. Localisation of glycans in the placenta: A comparative study of epitheliochorial, endotheliochorial, and haemomonochorial placentation // *Microsc. Res. Tech.* 1997. Vol. 38. No 1–2. P. 100–114.
272. Jones C. J. P. et al. Glycosylation at the Fetomaternal Interface in Hemomonochorial Placentae from Five Widely Separated Species of Mammal: Is There Evidence for Convergent Evolution? // *Cells Tissues Organs.* 2007. Vol. 185. No 4. P. 269–284.
273. Jones C. J. P., Aplin J. D. Reproductive Glycogenetics – A Critical Factor in Pregnancy Success and Species Hybridisation // *Placenta.* 2009a. Vol. 30. No 3. P. 216–219.
274. Jones C. J. P., Aplin J. D. Glycosylation at the fetomaternal interface: does the glycode play a critical role in implantation? // *Glycoconj. J.* 2009b. Vol. 26. No 3. P. 359–366.
275. Jones S. A., Jenkins B. J. Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer // *Nat. Rev. Immunol.* 2018. Vol. 18. No 12. P. 773–789.
276. Jonuleit H. et al. Identification and Functional Characterization of Human Cd4+Cd25+ T Cells with Regulatory Properties Isolated from Peripheral Blood // *J. Exp. Med.* 2001. Vol. 193. No 11. P. 1285–1294.
277. Jørgensen N., Persson G., Hviid T. V. F. The Tolerogenic Function of Regulatory T Cells in Pregnancy and Cancer // *Front. Immunol.* 2019. Vol. 10.
278. Jovanović Krivokuća M. et al. Galectins in Early Pregnancy and Pregnancy-Associated Pathologies // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 23. No 1. P. 69.
279. Jovanović M., Vićovac L. Interleukin-6 Stimulates Cell Migration, Invasion and Integrin Expression in HTR-8/SVneo Cell Line // *Placenta.* 2009. Vol. 30. No 4. P. 320–328.
280. Kanda N., Tamaki K. Estrogen enhances immunoglobulin production by human PBMCs // *J. Allergy Clin. Immunol.* 1999. Vol. 103. No 2. P. 282–288.
281. KARIUKI T. M. et al. Antibodies elicited by the secretions from schistosome cercariae and eggs are predominantly against glycan epitopes // *Parasite Immunol.* 2008. Vol. 30. No 10. P. 554–562.
282. Karlsson A. et al. Galectin-3 functions as an opsonin and enhances the macrophage clearance of apoptotic neutrophils // *Glycobiology.* 2008. Vol. 19. No 1. P. 16–20.
283. Kasture V. V., Sundrani D. P., Joshi S. R. Maternal one carbon metabolism through increased oxidative stress and disturbed angiogenesis can influence placental apoptosis in preeclampsia // *Life Sci.* 2018. Vol. 206. P. 61–69.
284. Kelemen K. et al. A Progesterone-Induced Protein Increases the Synthesis of Asymmetric Antibodies // *Cell. Immunol.* 1996. Vol. 167. No 1. P. 129–134.

285. Khasbiullina N. R. et al. The Repertoire of Human Antiglycan Antibodies and Its Dynamics in the First Year of Life // *Biochem. Mosc.* 2019. Vol. 84. No 6. P. 608–616.
286. King A. et al. HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94 / NKG2 receptors on decidual NK cells // *Eur. J. Immunol.* 2000. Vol. 30. No 6. P. 1623–1631.
287. Kiskova T. et al. Expression of the neonatal Fc-receptor in placental-fetal endothelium and in cells of the placental immune system // *Placenta.* 2019. Vol. 78. P. 36–43.
288. Kliman H. J. et al. Placental Protein 13 and Decidual Zones of Necrosis: An Immunologic Diversion That May be Linked to Preeclampsia // *Reprod. Sci.* 2012. Vol. 19. No 1. P. 16–30.
289. Kolundžić N. et al. Galectin-1 Is Part of Human Trophoblast Invasion Machinery - A Functional Study In Vitro // *PLoS ONE.* 2011a. Vol. 6. No 12. P. e28514.
290. Kolundžić N. et al. Galectin-8 is expressed by villous and extravillous trophoblast of the human placenta // *Placenta.* 2011b. Vol. 32. No 11. P. 909–911.
291. Kooyk Y. van. C-type lectins on dendritic cells: key modulators for the induction of immune responses // *Biochem. Soc. Trans.* 2008. Vol. 36. No 6. P. 1478–1481.
292. Kooyk Y. van, Rabinovich G. A. Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses // *Nat. Immunol.* 2008. Vol. 9. No 6. P. 593–601.
293. Kopcow H. D. et al. T cell apoptosis at the maternal–fetal interface in early human pregnancy, involvement of galectin-1 // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008. Vol. 105. No 47. P. 18472–18477.
294. Kopcow H. D. et al. Human Decidual NK Cells from Gravid Uteri and NK Cells from Cycling Endometrium are Distinct NK Cell Subsets // *Placenta.* 2010. Vol. 31. No 4. P. 334–338.
295. Kozma N. et al. Progesterone-Induced Blocking Factor Activates STAT6 via Binding to a Novel IL-4 Receptor // *J. Immunol.* 2006. Vol. 176. No 2. P. 819–826.
296. Kraus T. A. et al. Characterizing the Pregnancy Immune Phenotype: Results of the Viral Immunity and Pregnancy (VIP) Study // *J. Clin. Immunol.* 2012. Vol. 32. No 2. P. 300–311.
297. Krop J. et al. Regulatory T Cells in Pregnancy: It Is Not All About FoxP3 // *Front. Immunol.* 2020. Vol. 11. P. 1182.
298. Kui Wong N. et al. Characterization of the Oligosaccharides Associated with the Human Ovarian Tumor Marker CA125 // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278. No 31. P. 28619–28634.
299. Kusumi M. et al. Expression patterns of lectin-like natural killer receptors, inhibitory CD94/NKG2A, and activating CD94/NKG2C on decidual CD56bright natural killer cells differ from those on peripheral CD56dim natural killer cells // *J. Reprod. Immunol.* 2006. Vol. 70. No 1–2. P. 33–42.

300. Kwak J. Y. H. et al. Up-Regulated Expression of CD56+, CD56+/ CD16+, and CD19+ Cells in Peripheral Blood Lymphocytes in Pregnant Women With Recurrent Pregnancy Losses // *Am. J. Reprod. Immunol.* 1995. Vol. 34. No 2. P. 93–99.
301. Kwan M. et al. Dynamic changes in maternal decidual leukocyte populations from first to second trimester gestation // *Placenta.* 2014. Vol. 35. No 12. P. 1027–1034.
302. Labeta M. O. et al. Structure of asymmetric non-precipitating antibody: presence of a carbohydrate residue in only one Fab region of the molecule. // *Immunology.* 1986. Vol. 57. No 2. P. 311–7.
303. Laderach D. J. et al. Dissecting the signal transduction pathways triggered by galectin-glycan interactions in physiological and pathological settings // *IUBMB Life.* 2009. P. n/a-n/a.
304. Lam K. K. W. et al. Glycodelin-A as a modulator of trophoblast invasion // *Hum. Reprod.* 2009. Vol. 24. No 9. P. 2093–2103.
305. Lam K. K. W. et al. Glycodelin-A Protein Interacts with Siglec-6 Protein to Suppress Trophoblast Invasiveness by Down-regulating Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK)/c-Jun Signaling Pathway // *J. Biol. Chem.* 2011. Vol. 286. No 43. P. 37118–37127.
306. Laskarin G. et al. Progesterone Induced Blocking Factor (PIBF) Mediates Progesterone Induced Suppression of Decidual Lymphocyte Cytotoxicity // *Am. J. Reprod. Immunol.* 2002. Vol. 48. No 4. P. 201–209.
307. Laskarin G. et al. The presence of functional mannose receptor on macrophages at the maternal–fetal interface // *Hum. Reprod.* 2005. Vol. 20. No 4. P. 1057–1066.
308. Laskarin G. et al. Tumor-associated glycoprotein (TAG-72) is a natural ligand for the C-type lectin-like domain that induces anti-inflammatory orientation of early pregnancy decidual CD1a+ dendritic cells // *J. Reprod. Immunol.* 2011. Vol. 88. No 1. P. 12–23.
309. Lausman A. et al. Intrauterine Growth Restriction: Screening, Diagnosis, and Management // *J. Obstet. Gynaecol. Can.* 2013. Vol. 35. No 8. P. 741–748.
310. Lee C.-L. et al. Effects of Differential Glycosylation of Glycodelins on Lymphocyte Survival // *J. Biol. Chem.* 2009. Vol. 284. No 22. P. 15084–15096.
311. Lee C.-L. et al. Differential actions of glycodelin-A on Th-1 and Th-2 cells: a paracrine mechanism that could produce the Th-2 dominant environment during pregnancy // *Hum. Reprod.* 2011a. Vol. 26. No 3. P. 517–526.
312. Lee C.-L. et al. Glycodelin-A as a paracrine regulator in early pregnancy // *J. Reprod. Immunol.* 2011b. Vol. 90. No 1. P. 29–34.
313. Lee E. J., Park J. H. Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE), Its Ligands, and Soluble RAGE: Potential Biomarkers for Diagnosis and Therapeutic Targets for Human Renal Diseases // *Genomics Inform.* 2013. Vol. 11. No 4. P. 224.

314. Lees C. et al. Perinatal morbidity and mortality in early-onset fetal growth restriction: cohort outcomes of the trial of randomized umbilical and fetal flow in Europe (TRUFFLE) // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 2013. Vol. 42. No 4. P. 400–408.
315. Lees C. C. et al. ISUOG Practice Guidelines: diagnosis and management of small-for-gestational-age fetus and fetal growth restriction // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 2020. Vol. 56. No 2. P. 298–312.
316. Lei J. et al. The Prognostic Role of Angiotensin II Type 1 Receptor Autoantibody in Non-Gravid Hypertension and Pre-eclampsia // *Medicine.* 2016. Vol. 95. No 17. P. e3494.
317. Lekchnov E. A. et al. Human placenta: relative content of antibodies of different classes and subclasses (IgG1–IgG4) containing lambda- and kappa-light chains and chimeric lambda-kappa-immunoglobulins // *Int. Immunol.* 2015. Vol. 27. No 6. P. 297–306.
318. Lekchnov E. A. et al. The DNA-hydrolyzing activity of IgG antibodies from human placenta // *Placenta.* 2018. Vol. 68. P. 1–8.
319. Lennartz M. R. et al. Isolation and characterization of a mannose-specific endocytosis receptor from human placenta. // *J. Biol. Chem.* 1987. Vol. 262. No 21. P. 9942–4.
320. Lepenies B., Lee J., Sonkaria S. Targeting C-type lectin receptors with multivalent carbohydrate ligands // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013. Vol. 65. No 9. P. 1271–1281.
321. Lertkiatmongkol P. et al. The Role of Sialylated Glycans in Human Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1 (PECAM-1)-mediated Trans Homophilic Interactions and Endothelial Cell Barrier Function // *J. Biol. Chem.* 2016. Vol. 291. No 50. P. 26216–26225.
322. Li A. et al. IL-8 Directly Enhanced Endothelial Cell Survival, Proliferation, and Matrix Metalloproteinases Production and Regulated Angiogenesis // *J. Immunol.* 2003. Vol. 170. No 6. P. 3369–3376.
323. Li F. et al. Upregulation of Tim-3 expression at feto-maternal interface may explain embryo survival in the CBAXDBA/2 model of abortion // *Am. J. Reprod. Immunol.* 2018. Vol. 79. No 1. P. e12775.
324. Lif F.-F. et al. Lewis Y regulates signaling molecules of the transforming growth factor β pathway in ovarian carcinoma-derived RMG-I cells // *Int. J. Oncol.* 2012. Vol. 40. No 4. P. 1196–1202.
325. Li H. et al. Role of bone marrow-derived mesenchymal stem cell defects in CD8+CD28– suppressor T-lymphocyte induction in patients with immune thrombocytopenia and associated mechanisms // *Br. J. Haematol.* 2020a. Vol. 191. No 5. P. 852–862.
326. Li R. et al. Construction and Validation of Novel Diagnostic and Prognostic DNA Methylation Signatures for Hepatocellular Carcinoma // *Front. Genet.* 2020b. Vol. 11.

327. Li Y. et al. Tim-3 signaling in peripheral NK cells promotes maternal-fetal immune tolerance and alleviates pregnancy loss // *Sci. Signal.* 2017. Vol. 10. No 498.
328. Li Y.-H. et al. The Galectin-9/Tim-3 pathway is involved in the regulation of NK cell function at the maternal–fetal interface in early pregnancy // *Cell. Mol. Immunol.* 2016. Vol. 13. No 1. P. 73–81.
329. Liao A. H. et al. Functional changes of human peripheral B-lymphocytes in pre-eclampsia // *Am. J. Reprod. Immunol.* 2009. Vol. 61. No 5. P. 313–321.
330. Liao W.-C. et al. Expression of GALNT2 in human extravillous trophoblasts and its suppressive role in trophoblast invasion // *Placenta.* 2012. Vol. 33. No 12. P. 1005–1011.
331. Liao W.-C. et al. β -1,4-galactosyltransferase III suppresses extravillous trophoblast invasion through modifying β 1-integrin glycosylation // *Placenta.* 2015. Vol. 36. No 4. P. 357–364.
332. Lieberoth A. et al. Lewis x and α 2,3-Sialyl Glycans and Their Receptors TAG-1, Contactin, and L1 Mediate CD24-Dependent Neurite Outgrowth // *J. Neurosci.* 2009. Vol. 29. No 20. P. 6677–6690.
333. Lima J. et al. Characterization of B cells in healthy pregnant women from late pregnancy to post-partum: a prospective observational study // *BMC Pregnancy Childbirth.* 2016. Vol. 16. No 1. P. 139.
334. Lin S. J. et al. Umbilical cord blood immunology-relevance to stem cell transplantation // *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2012. Vol. 42. No 1. P. 45–57.
335. Lin W.-L. et al. Lewisy Promotes Migration of Oral Cancer Cells by Glycosylation of Epidermal Growth Factor Receptor // *PLOS ONE.* 2015. Vol. 10. No 3. P. e0120162.
336. Lissauer D. et al. Cytomegalovirus sero positivity dramatically alters the maternal CD8⁺ T cell repertoire and leads to the accumulation of highly differentiated memory cells during human pregnancy // *Hum. Reprod.* 2011. Vol. 26. No 12. P. 3355–3365.
337. Liu J. et al. Human chorionic gonadotropin and IL-35 contribute to the maintenance of peripheral immune tolerance during pregnancy through mediating the generation of IL-10⁺ or IL-35⁺ Breg cells // *Exp. Cell Res.* 2019. Vol. 383. No 2. P. 111513.
338. Liu J. J. et al. Lewis(y) antigen stimulates the growth of ovarian cancer cells via regulation of the epidermal growth factor receptor pathway // *Oncol. Rep.* 2010. Vol. 23. No 3. P. 833–841.
339. Liu M. et al. Nested case–control study of corin combined with sflt-1/plgf in predicting the risk of preeclampsia // *Int. J. Gen. Med.* 2021. Vol. 14. P. 2313–2320.
340. Liu S. et al. The role of decidual immune cells on human pregnancy // *J. Reprod. Immunol.* 2017. Vol. 124. P. 44–53.

341. Liu W. et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells // *J. Exp. Med.* 2006. Vol. 203. No 7. P. 1701–1711.
342. Liu Z. et al. ST6Gal-I regulates macrophage apoptosis via α 2-6 sialylation of the TNFR1 death receptor // *J. Biol. Chem.* 2011. Vol. 286. No 45. P. 39654–39662.
343. Liyan Y., Yongmei J., Jing F. A Rare Case of Hemolytic Disease of the Fetus and Newborn Caused by Anti-s Antibody in a Chinese Patient // *Clin. Lab.* 2023. Vol. 69. No 4. P. 798–801.
344. Loke I. et al. Emerging roles of protein mannosylation in inflammation and infection // *Mol. Aspects Med.* 2016. Vol. 51. P. 31–55.
345. Lowe J. B. 7 The blood group-specific human glycosyltransferases // *Baillières Clin. Haematol.* 1993. Vol. 6. No 2. P. 465–492.
346. Lu B. et al. Analysis of PD-L1 expression in trophoblastic tissues and tumors // *Hum. Pathol.* 2019. Vol. 84. P. 202–212.
347. Lu J. et al. β -Galactoside α 2,6-Sialyltransferase 1 Promotes Transforming Growth Factor- β -mediated Epithelial-Mesenchymal Transition // *J. Biol. Chem.* 2014. Vol. 289. No 50. P. 34627–34641.
348. Luo Z. et al. Galectin-7 promotes proliferation and Th1/2 cells polarization toward Th1 in activated CD4⁺ T cells by inhibiting The TGF β /Smad3 pathway // *Mol. Immunol.* 2018. Vol. 101. P. 80–85.
349. Ma Z. et al. Expression of the Carbohydrate Lewis Antigen, Sialyl Lewis A, Sialyl Lewis X, Lewis X, and Lewis Y in the Placental Villi of Patients With Unexplained Miscarriages // *Front. Immunol.* 2021. Vol. 12. P. 679424.
350. Macauley M. S., Crocker P. R., Paulson J. C. Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease // *Nat. Rev. Immunol.* 2014. Vol. 14. No 10. P. 653–666.
351. Madi A. et al. Organization of the autoantibody repertoire in healthy newborns and adults revealed by system level informatics of antigen microarray data // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2009. Vol. 106. No 34. P. 14484–14489.
352. Magatti M. et al. The Role of B Cells in PE Pathophysiology: A Potential Target for Perinatal Cell-Based Therapy? // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22. No 7. P. 3405.
353. Makrigiannakis A. et al. Fetomaternal Immunotolerance // *Am. J. Reprod. Immunol.* 2008. Vol. 60. No 6. P. 482–496.
354. Mao G. et al. Progesterone Increases Systemic and Local Uterine Proportions of CD4⁺CD25⁺ Treg Cells during Midterm Pregnancy in Mice // *Endocrinology.* 2010. Vol. 151. No 11. P. 5477–5488.
355. Maquoi E. et al. Changes in the distribution pattern of galectin-1 and galectin-3 in human placenta correlates with the differentiation pathways of trophoblasts // *Placenta.* 1997. Vol. 18. No 5–6. P. 433–439.

356. Margini R. A., Zenclussen A. C. During Pregnancy, in the Context of a Th2-Type Cytokine Profile, Serum IL-6 Levels Might Condition the Quality of the Synthesized Antibodies // *Am. J. Reprod. Immunol.* 2001. Vol. 46. No 3. P. 181–187.
357. Marini M. et al. Distribution of sugar residues in human placentas from pregnancies complicated by hypertensive disorders // *Acta Histochem.* 2011. Vol. 113. No 8. P. 815–825.
358. Marino F. et al. Extended O-GlcNAc on HLA Class-I-Bound Peptides // *J. Am. Chem. Soc.* 2015. Vol. 137. No 34. P. 10922–10925.
359. Marongiu L. et al. Below the surface: The inner lives of TLR4 and TLR9 // *J. Leukoc. Biol.* 2019. Vol. 106. No 1. P. 147–160.
360. Masnikosa R. et al. Characterisation of insulin-like growth factor receptors and insulin receptors in the human placenta using lectin affinity methods // *Growth Horm. IGF Res.* 2006. Vol. 16. No 3. P. 174–184.
361. Matsumoto-Takasaki A. et al. Surface plasmon resonance and NMR analyses of anti Tn-antigen MLS128 monoclonal antibody binding to two or three consecutive Tn-antigen clusters // *J. Biochem. (Tokyo).* 2012. Vol. 151. No 3. P. 273–282.
362. Matsuzwa M. et al. Helicobacter pylori Infection Up-regulates Gland Mucous Cell-Type Mucins in Gastric Pyloric Mucosa // *Helicobacter.* 2003. Vol. 8. No 6. P. 594–600.
363. Mauri C., Ehrenstein M. R. The ‘short’ history of regulatory B cells // *Trends Immunol.* 2008. Vol. 29. No 1. P. 34–40.
364. Maverakis E. et al. Glycans in the immune system and The Altered Glycan Theory of Autoimmunity: A critical review // *J. Autoimmun.* 2015. Vol. 57. P. 1–13.
365. McMaster M. et al. HLA-G isoforms produced by placental cytotrophoblasts and found in amniotic fluid are due to unusual glycosylation. // *J. Immunol. Baltim. Md* 1950. 1998. Vol. 160. No 12. P. 5922–8.
366. McMaster W. G. et al. Inflammation, Immunity, and Hypertensive End-Organ Damage // *Circ. Res.* 2015. Vol. 116. No 6. P. 1022–1033.
367. Medawar P. B. The immunology of transplantation. // *Harvey Lect. No Series 52.* P. 144–76.
368. Medina K. L., Smithson G., Kincade P. W. Suppression of B lymphopoiesis during normal pregnancy. // *J. Exp. Med.* 1993. Vol. 178. No 5. P. 1507–1515.
369. Medvinsky A., Rybtsov S., Taoudi S. Embryonic origin of the adult hematopoietic system: advances and questions // *Development.* 2011. Vol. 138. No 6. P. 1017–1031.
370. Meggyes M. et al. Peripheral Blood TIM-3 Positive NK and CD8+ T Cells throughout Pregnancy: TIM-3/Galectin-9 Interaction and Its Possible Role during Pregnancy // *PLoS ONE.* 2014. Vol. 9. No 3. P. e92371.

371. Melinte-Popescu A.-S. et al. Predictive Performance of Machine Learning-Based Methods for the Prediction of Preeclampsia—A Prospective Study // *J. Clin. Med.* 2023. Vol. 12. No 2. P. 418.
372. Mendonça L. L. F. et al. Natural immune response involving anti-endothelial cell antibodies in normal and lupus pregnancy // *Arthritis Rheum.* 2000. Vol. 43. No 7. P. 1511–1515.
373. Meng Q. et al. Expressions of VEGF-A and VEGFR-2 in placentae from GDM pregnancies // *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2016. Vol. 14. No 1. P. 61.
374. Menkhorst E. et al. Galectin-7 Impairs Placentation and Causes Preeclampsia Features in Mice // *Hypertension.* 2020. Vol. 76. No 4. P. 1185–1194.
375. Menkhorst E. et al. Medawar's PostEra: Galectins Emerged as Key Players During Fetal-Maternal Glycoimmune Adaptation // *Front. Immunol.* 2021. Vol. 12. P. 784473.
376. Merbl Y. et al. Newborn humans manifest autoantibodies to defined self molecules detected by antigen microarray informatics // *J. Clin. Invest.* 2007. Vol. 117. No 3. P. 712–718.
377. Mestecky J. et al. IgA Nephropathy: Molecular Mechanisms of the Disease // *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2013. Vol. 8. No 1. P. 217–240.
378. Mian M. O. R., Paradis P., Schiffrin E. L. Innate Immunity in Hypertension // *Curr. Hypertens. Rep.* 2014. Vol. 16. No 2. P. 413.
379. Michaud E. et al. Alteration of microbiota antibody-mediated immune selection contributes to dysbiosis in inflammatory bowel diseases // *EMBO Mol. Med.* 2022. Vol. 14. No 8. e15386.
380. Miko E. et al. Immunoactivation in preeclampsia: V δ 2⁺ and regulatory T cells during the inflammatory stage of disease // *J. Reprod. Immunol.* 2009. Vol. 80. No 1–2. P. 100–108.
381. Miko E. et al. Involvement of Galectin-9/TIM-3 Pathway in the Systemic Inflammatory Response in Early-Onset Preeclampsia // *PLoS ONE.* 2013. Vol. 8. No 8. P. e71811.
382. Mikolajczyk T. P., Guzik T. J. Adaptive Immunity in Hypertension // *Curr. Hypertens. Rep.* 2019. Vol. 21. No 9. P. 68.
383. Milosevic-Stevanovic J. et al. Number of decidual natural killer cells & macrophages in pre-eclampsia // *Indian J. Med. Res.* 2016. Vol. 144. No 12. P. 823–830.
384. Milovanov A. P. Cytotrophoblastic invasion is the most important mechanism of placentation and pregnancy progression // *Arkh. Patol.* 2019. Vol. 81. No 4. P. 5.
385. Mimoun A. et al. Relevance of the Materno-Fetal Interface for the Induction of Antigen-Specific Immune Tolerance // *Front. Immunol.* 2020. Vol. 11. P. 810.

386. Minas V. et al. Expression of the blood-group-related antigens Sialyl Lewis a, Sialyl Lewis x and Lewis y in term placentas of normal, preeclampsia, IUGR- and HELLP-complicated pregnancies // *Histochem. Cell Biol.* 2007. Vol. 128. No 1. P. 55–63.
387. Minning S. et al. Imbalance between CD8+CD28+ and CD8+CD28– T-cell subsets and its clinical significance in patients with systemic lupus erythematosus // *Lupus*. 2019. Vol. 28. No 10. P. 1214–1223.
388. Miranda S. et al. Interleukin-6 and dexamethasone modulate in vitro asymmetric antibody synthesis and UDP-Glc glycoprotein glycosyltransferase activity // *J. Reprod. Immunol.* 2005. Vol. 66. No 2. P. 141–150.
389. Mitchell R. E. et al. IL-4 enhances IL-10 production in Th1 cells: implications for Th1 and Th2 regulation // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7. No 1. P. 11315.
390. Miyagawa S. et al. Carbohydrate antigens // 2012. Vol. 17. No 2. P. 174-9.
391. Mjösberg J. et al. Systemic Reduction of Functionally Suppressive CD4dimCD25highFoxp3+ Tregs in Human Second Trimester Pregnancy Is Induced by Progesterone and 17 β -Estradiol // *J. Immunol.* 2009. Vol. 183. No 1. P. 759–769.
392. Moffett A., Chazara O., Colucci F. Maternal allo-recognition of the fetus // *Fertil. Steril.* 2017. Vol. 107. No 6. P. 1269–1272.
393. Molteni M., Gemma S., Rossetti C. The role of toll-like receptor 4 in infectious and noninfectious inflammation // *Mediators Inflamm.* 2016. Vol. 2016. P. 6978936.
394. Molvarec A. et al. Peripheral blood galectin-1-expressing T and natural killer cells in normal pregnancy and preeclampsia // *Clin. Immunol.* 2011. Vol. 139. No 1. P. 48–56.
395. Montecino-Rodriguez E., Dorshkind K. B-1 B Cell Development in the Fetus and Adult // *Immunity*. 2012. Vol. 36. No 1. P. 13–21.
396. Monteiro C. et al. Pregnancy favors the expansion of circulating functional follicular helper T Cells // *J. Reprod. Immunol.* 2017. Vol. 121. P. 1–10.
397. Morel N. et al. « Lupus néonatal » : revue de la littérature // *Rev. Médecine Interne*. 2015. Vol. 36. No 3. P. 159–166.
398. Morgan R. et al. N -Acetylglucosaminyltransferase V (Mgat5)-Mediated N -Glycosylation Negatively Regulates Th1 Cytokine Production by T Cells // *J. Immunol.* 2004. Vol. 173. No 12. P. 7200–7208.
399. Morrish D. W. et al. Epidermal Growth Factor Induces Differentiation and Secretion of Human Chorionic Gonadotropin and Placental Lactogen in Normal Human Placenta // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1987. Vol. 65. No 6. P. 1282–1290.
400. Moslehi R. et al. Integrative transcriptome analysis reveals dysregulation of canonical cancer molecular pathways in placenta leading to preeclampsia // *Sci. Rep.* 2013. Vol. 3. No 1. P. 2407.

401. Motwani K. et al. Human Regulatory T Cells From Umbilical Cord Blood Display Increased Repertoire Diversity and Lineage Stability Relative to Adult Peripheral Blood // *Front. Immunol.* 2020. Vol. 11. P. 611.
402. Muminova K. et al. 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.
403. Muzzio D. O. et al. B Cell Development Undergoes Profound Modifications and Adaptations During Pregnancy in Mice // *Biol. Reprod.* 2014. Vol. 91. No 5. P.115.
404. Muzzio D., Zenclussen A. C., Jensen F. The Role of B Cells in Pregnancy: the Good and the Bad // *Am. J. Reprod. Immunol.* 2013. Vol. 69. No 4. P. 408–412.
405. Nadeau-Vallée M. et al. Sterile inflammation and pregnancy complications: A review // 2016. Vol. 152. No 6. R277-R292.
406. Nagy B. et al. Key to Life: Physiological Role and Clinical Implications of Progesterone // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22. No 20. P. 11039.
407. Nevo O., Lee D. K., Caniggia I. Attenuation of VEGFR-2 Expression by sFlt-1 and Low Oxygen in Human Placenta // *PLoS ONE.* 2013. Vol. 8. No 11. P. e81176.
408. New J. S., King R. G., Kearney J. F. Manipulation of the glycan-specific natural antibody repertoire for immunotherapy // *Immunol. Rev.* 2016. Vol. 270. No 1. P. 32–50.
409. Nguyen T. G., Ward C. M., Morris J. M. To B or not to B cells-mediate a healthy start to life // *Clin. Exp. Immunol.* 2013. Vol. 171. No 2. P. 124–134.
410. Ni Y. et al. Specificity and Prevalence of Natural Bovine Anti-Alpha Galactosyl (Gal α 1-6Glc or Gal α 1-6Gal) Antibodies // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2000. Vol. 7. No 3. P. 490–496.
411. Nishi N. et al. Galectin-8 modulates neutrophil function via interaction with integrin M // *Glycobiology.* 2003. Vol. 13. No 11. P. 755–763.
412. Nishima W. et al. Effect of Bisecting GlcNAc and Core Fucosylation on Conformational Properties of Biantennary Complex-Type N-Glycans in Solution // *J. Phys. Chem. B.* 2012. Vol. 116. No 29. P. 8504–8512.
413. Nobumoto A. et al. Galectin-9 suppresses tumor metastasis by blocking adhesion to endothelium and extracellular matrices // *Glycobiology.* 2008. Vol. 18. No 9. P. 735–744.
414. Nores G. A. et al. Anti-GM1 antibodies as a model of the immune response to self-glycans // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 2008. Vol. 1780. No 3. P. 538–545.
415. Norling L. V., Perretti M., Cooper D. Endogenous galectins and the control of the host inflammatory response // *J. Endocrinol.* 2009. Vol. 201. No 2. P. 169–184.
416. Obukhova P., Rieben R., Bovin N. Normal human serum contains high levels of anti-Gal α 1-4GlcNAc antibodies // *Xenotransplantation.* 2007. Vol. 14. No 6. P. 627–635.

417. Ochola R. et al. The Level and Duration of RSV-Specific Maternal IgG in Infants in Kilifi Kenya // PLoS ONE. 2009. Vol. 4. No 12. P. e8088.
418. Ohl C. et al. N-glycosylation patterns of HSA/CD24 from different cell lines and brain homogenates: a comparison // Biochimie. 2003. Vol. 85. No 6. P. 565–573.
419. Olejnik J., Hume A. J., Mühlberger E. Toll-like receptor 4 in acute viral infection: Too much of a good thing // PLOS Pathog. 2018. Vol. 14. No 12. P. e1007390.
420. Omwandho C. A. et al. Elution and partial characterization of immunoglobulins bound to ovine placenta // Immunol. Cell Biol. 1997. Vol. 75. No 3. P. 231–237.
421. Oomizu S. et al. Galectin-9 suppresses Th17 cell development in an IL-2-dependent but Tim-3-independent manner // Clin. Immunol. 2012a. Vol. 143. No 1. P. 51–58.
422. Oomizu S. et al. Cell Surface Galectin-9 Expressing Th Cells Regulate Th17 and Foxp3⁺ Treg Development by Galectin-9 Secretion // PLoS ONE. 2012b. Vol. 7. No 11. P. e48574.
423. Oros D. et al. Longitudinal changes in uterine, umbilical and fetal cerebral Doppler indices in late-onset small-for-gestational age fetuses // Ultrasound Obstet. Gynecol. 2011. Vol. 37. No 2. P. 191–195.
424. Ortega M. A. et al. The Pivotal Role of the Placenta in Normal and Pathological Pregnancies: A Focus on Preeclampsia, Fetal Growth Restriction, and Maternal Chronic Venous Disease // Cells. 2022. Vol. 11. No 3. P. 568.
425. O'Sullivan J. A., Carroll D. J., Bochner B. S. Glycobiology of Eosinophilic Inflammation: Contributions of Siglecs, Glycans, and Other Glycan-Binding Proteins // Front. Med. 2017. Vol. 4.
426. Ouagari K. E., Teissié J., Benoist H. Glycophorin A Protects K562 Cells from Natural Killer Cell Attack // J. Biol. Chem. 1995. Vol. 270. No 45. P. 26970–26975.
427. Owen R. D. Immunogenetic consequences of vascular anastomoses between bovine twins // Science. 1945. Vol. 102. No 2651. P. 400–401.
428. Paclik D. et al. Galectins distinctively regulate central monocyte and macrophage function // Cell. Immunol. 2011. Vol. 271. No 1. P. 97–103.
429. Palmeira P. et al. IgG Placental Transfer in Healthy and Pathological Pregnancies // Clin. Dev. Immunol. 2012. Vol. 2012. P. 1–13.
430. Pang P.-C. et al. The human fetoembryonic defense system hypothesis: Twenty years on // Mol. Aspects Med. 2016. Vol. 51. P. 71–88.
431. Pangrazzi L. et al. CD28 and CD57 define four populations with distinct phenotypic properties within human CD8⁺ T cells // Eur. J. Immunol. 2020. Vol. 50. No 3. P. 363–379.
432. Park B. S., Lee J.-O. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes // Exp. Mol. Med. 2013. Vol. 45. No 12. P. e66–e66.

433. Park S. et al. Carbohydrate microarrays // *Chem Soc Rev.* 2013. Vol. 42. No 10. P. 4310–4326.
434. Passaponti S. et al. The expression and role of glycans at the feto-maternal interface in humans // *Tissue Cell.* 2021. Vol. 73. P. 101630.
435. Paulson J. C., Macauley M. S., Kawasaki N. Siglecs as sensors of self in innate and adaptive immune responses // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2012. Vol. 1253. No 1. P. 37–48.
436. Pazos M. et al. The influence of pregnancy on systemic immunity // *Immunol. Res.* 2012. Vol. 54. No 1–3. P. 254–261.
437. Peraçoli J. C. et al. Studies of natural killer cells in pregnancy-induced hypertension. // *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Medicas E Biol.* 1995. Vol. 28. No 6. P. 655–61.
438. Perdicchio M. et al. Sialic acid-modified antigens impose tolerance via inhibition of T-cell proliferation and de novo induction of regulatory T cells // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2016. Vol. 113. No 12. P. 3329–3334.
439. Petralia L. M. C. et al. Unraveling cross-reactivity of anti-glycan IgG responses in filarial nematode infections // *Front. Immunol.* 2023. Vol. 14.
440. Petroff M. G. et al. The Immunomodulatory Proteins B7-DC, B7-H2, and B7-H3 Are Differentially Expressed across Gestation in the Human Placenta // *Am. J. Pathol.* 2005. Vol. 167. No 2. P. 465–473.
441. Piccinni M. P. et al. Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. // *J. Immunol. Baltim. Md* 1950. 1995. Vol. 155. No 1. P. 128–33.
442. Piccinni M.-P. et al. T helper cell mediated-tolerance towards fetal allograft in successful pregnancy // *Clin. Mol. Allergy.* 2015. Vol. 13. No 1. P. 9.
443. Piccinni M.-P. et al. Cytokines, Hormones and Cellular Regulatory Mechanisms Favoring Successful Reproduction // *Front. Immunol.* 2021. Vol. 12. P. 717808.
444. Pieren D. K. J., Boer M. C., Wit J. de. The adaptive immune system in early life: The shift makes it count // *Front. Immunol.* 2022. Vol. 13. P. 1031924.
445. Pijnenborg R., Vercruysse L., Brosens I. Deep placentation // *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 2011. Vol. 25. No 3. P. 273–285.
446. Pillai S. et al. Siglecs and Immune Regulation // *Annu. Rev. Immunol.* 2012. Vol. 30. No 1. P. 357–392.
447. Pinho S. S., Reis C. A. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications // *Nat. Rev. Cancer.* 2015. Vol. 15. No 9. P. 540–555.

448. Pochechueva T. et al. Blood Plasma-Derived Anti-Glycan Antibodies to Sialylated and Sulfated Glycans Identify Ovarian Cancer Patients // PLOS ONE. 2016. Vol. 11. No 10. P. e0164230.
449. Polgar B. et al. Molecular Cloning and Immunologic Characterization of a Novel cDNA Coding for Progesterone-Induced Blocking Factor // J. Immunol. 2003. Vol. 171. No 11. P. 5956–5963.
450. Polonskaya Z. et al. High-affinity anti-glycan antibodies: challenges and strategies // Curr. Opin. Immunol. 2019. Vol. 59. P. 65–71.
451. Prados M. B. et al. Progesterone induces a switch in oligosaccharyltransferase isoform expression: Consequences on IgG N-glycosylation // Immunol. Lett. 2011. Vol. 137. No 1–2. P. 28–37.
452. Prah M. et al. Timing of in utero malaria exposure influences fetal CD4 T cell regulatory versus effector differentiation // Malar. J. 2016. Vol. 15. No 1. P. 497.
453. Prak E. T. L. et al. Age-Related Trends in Pediatric B-Cell Subsets // Pediatr. Dev. Pathol. 2011. Vol. 14. No 1. P. 45–52.
454. Prakobphol A. et al. A role for the L-selectin adhesion system in mediating cytotrophoblast emigration from the placenta // Dev. Biol. 2006. Vol. 298. No 1. P. 107–117.
455. Prieto J. M. B., Felipe M. J. B. Development, phenotype, and function of non-conventional B cells // Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 2017. Vol. 54. P. 38–44.
456. Pshezhetsky A. V., Ashmarina L. I. Desialylation of surface receptors as a new dimension in cell signaling // Biochem. Mosc. 2013. Vol. 78. No 7. P. 736–745.
457. Raghupathy R. et al. Modulation of cytokine production by dydrogesterone in lymphocytes from women with recurrent miscarriage // BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol. 2005. Vol. 112. No 8. P. 1096–1101.
458. Raghupathy R. et al. Progesterone-induced blocking factor (PIBF) modulates cytokine production by lymphocytes from women with recurrent miscarriage or preterm delivery // J. Reprod. Immunol. 2009. Vol. 80. No 1–2. P. 91–99.
459. Raguema N., Moustadraf S., Bertagnolli M. Immune and Apoptosis Mechanisms Regulating Placental Development and Vascularization in Preeclampsia // Front. Physiol. 2020. Vol. 11. P. 98.
460. Rajagopalan S. et al. Activation of NK Cells by an Endocytosed Receptor for Soluble HLA-G // PLoS Biol. 2005. Vol. 4. No 1. P. e9.
461. Rapaka R. R. et al. Conserved natural IgM antibodies mediate innate and adaptive immunity against the opportunistic fungus *Pneumocystis murina* // J. Exp. Med. 2010. Vol. 207. No 13. P. 2907–2919.
462. Ravikumar G. et al. CD15 as a marker of fetoplacental endothelial immaturity in IUGR placentas // J. Matern. Fetal Neonatal Med. 2019. Vol. 32. No 10. P. 1646–1653.

463. Redzovic A. et al. Mucins Help to Avoid Alloreactivity at the Maternal Fetal Interface // Clin. Dev. Immunol. 2013. Vol. 2013. P. 1–9.
464. Reiter J. L., Maihle N. J. Characterization and Expression of Novel 60-kDa and 110-kDa EGFR Isoforms in Human Placenta // Ann. N. Y. Acad. Sci. 2003. Vol. 995. No 1. P. 39–47.
465. Rendell V., Bath N. M., Brennan T. V. Medawar's Paradox and Immune Mechanisms of Fetomaternal Tolerance // OBM Transplant. 2020. Vol. 4. No 1. P. 1–26.
466. Rieger L. et al. Antigen-Presenting Cells in Human Endometrium During the Menstrual Cycle Compared to Early Pregnancy // J. Soc. Gynecol. Investig. 2004. Vol. 11. No 7. P. 488–493.
467. Rindsjö E. et al. Toll-like receptor-2 expression in normal and pathologic human placenta // Hum. Pathol. 2007. Vol. 38. No 3. P. 468–473.
468. Robajac D. et al. Gestation-associated changes in the glycosylation of placental insulin and insulin-like growth factor receptors // Placenta. 2016a. Vol. 39. P. 70–76.
469. Robajac D. et al. Preeclampsia transforms membrane N-glycome in human placenta // Exp. Mol. Pathol. 2016b. Vol. 100. No 1. P. 26–30.
470. Robajac D. et al. Glycoanalysis of the placental membrane glycoproteins throughout placental development // Mech. Ageing Dev. 2019. Vol. 183. P. 111151.
471. Robinson D. P., Klein S. L. Pregnancy and pregnancy-associated hormones alter immune responses and disease pathogenesis // Horm. Behav. 2012. Vol. 62. No 3. P. 263–271.
472. Rolle L. et al. Cutting Edge: IL-10-Producing Regulatory B Cells in Early Human Pregnancy // Am. J. Reprod. Immunol. 2013. Vol. 70. No 6. P. 448–453.
473. Ronda N. et al. Normal human IgG prevents endothelial cell activation induced by TNF α and oxidized low-density lipoprotein atherogenic stimuli // Clin. Exp. Immunol. 2003. Vol. 133. No 2. P. 219–226.
474. Roopenian D. C. et al. The MHC Class I-Like IgG Receptor Controls Perinatal IgG Transport, IgG Homeostasis, and Fate of IgG-Fc-Coupled Drugs // J. Immunol. 2003. Vol. 170. No 7. P. 3528–3533.
475. Rosenstock P., Kaufmann T. Sialic Acids and Their Influence on Human NK Cell Function // Cells. 2021. Vol. 10. No 2. P. 263.
476. Rosin D. L., Okusa M. D. Dangers within: DAMP responses to damage and cell death in kidney disease // J Am Soc Nephrol. 2011. Vol. 22. No 3. P. 416–25.
477. Rosser E. C. C., Mauri C. Regulatory B Cells: Origin, Phenotype, and Function // Immunity. 2015. Vol. 42. No 4. P. 607–612.
478. Rout N., Kaur A. Cellular Immune Responses in Natural and Non-natural Hosts of Simian Immunodeficiency Virus Infection // Natural Hosts of SIV. : Elsevier, 2014. P. 197–215.

479. Rumer K. K. et al. Siglec-6 Expression Is Increased in Placentas From Pregnancies Complicated by Preterm Preeclampsia // *Reprod. Sci.* 2013. Vol. 20. No 6. P. 646–653.
480. Sabatos C. A. et al. Interaction of Tim-3 and Tim-3 ligand regulates T helper type 1 responses and induction of peripheral tolerance // *Nat. Immunol.* 2003. Vol. 4. No 11. P. 1102–1110.
481. Saccone G. et al. Antiphospholipid antibody profile based obstetric outcomes of primary antiphospholipid syndrome: the Pregnant study // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2017. Vol. 216. No 5. P. 525.e1-525.e12.
482. Saeland E. et al. Central Role of Complement in Passive Protection by Human IgG1 and IgG2 Anti-pneumococcal Antibodies in Mice // *J. Immunol.* 2003. Vol. 170. No 12. P. 6158–6164.
483. Sahin H. et al. Expression of P-cadherin (cadherin-3) and E-selectin in the villous trophoblast of first trimester human placenta // *J. Turk. Ger. Gynecol. Assoc.* 2014. Vol. 15. No 1. P. 13–17.
484. Sammar M. et al. Expression of CD24 and Siglec-10 in first trimester placenta: implications for immune tolerance at the fetal–maternal interface // *Histochem. Cell Biol.* 2017. Vol. 147. No 5. P. 565–574.
485. Sano H. et al. Human Galectin-3 Is a Novel Chemoattractant for Monocytes and Macrophages // *J. Immunol.* 2000. Vol. 165. No 4. P. 2156–2164.
486. Sasaki N., Toyoda M. Glycoconjugates and Related Molecules in Human Vascular Endothelial Cells // *Int. J. Vasc. Med.* 2013. Vol. 2013. P. 1–10.
487. Sathe P. et al. Identification of Novel Human NK Cell Progenitor Subsets // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. Vol. 18. No 12. P. 2716.
488. Sazinsky S. L. et al. Aglycosylated immunoglobulin G₁ variants productively engage activating Fc receptors // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008. Vol. 105. No 51. P. 20167–20172.
489. Scaife P. J. et al. Increased Placental Cell Senescence and Oxidative Stress in Women with Pre-Eclampsia and Normotensive Post-Term Pregnancies // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22. No 14. P. 7295.
490. Schaefer L. Complexity of Danger: The Diverse Nature of Damage-associated Molecular Patterns // *J. Biol. Chem.* 2014. Vol. 289. No 51. P. 35237–35245.
491. Schauer R. Achievements and challenges of sialic acid research. // *Glycoconj. J.* 2000. Vol. 17. No 7–9. P. 485–99.
492. Schiffrin E. L. Immune mechanisms in hypertension and vascular injury // *Clin. Sci.* 2014. Vol. 126. No 4. P. 267–274.
493. Schoots M. H. et al. Oxidative stress in placental pathology // *Placenta.* 2018. Vol. 69. P. 153–161.

494. Schrader S. et al. Overexpression of galectin-4 in placentas of women with gestational diabetes // *J. Reprod. Immunol.* 2022. Vol. 151. P. 103629.
495. Schur P. H. IgG subclasses. A historical perspective. // *Monogr. Allergy.* 1988. Vol. 23. P. 1–11.
496. Schust D. J. et al. The Immunology of Syncytialized Trophoblast // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22. No 4. P. 1767.
497. Scott D. W. et al. N-glycosylation controls the function of junctional adhesion molecule-A // *Mol. Biol. Cell.* 2015. Vol. 26. No 18. P. 3205–3214.
498. Scott D. W., Patel R. P. Endothelial heterogeneity and adhesion molecules N-glycosylation: Implications in leukocyte trafficking in inflammation // *Glycobiology.* 2013. Vol. 23. No 6. P. 622–633.
499. Seddiki N. et al. Persistence of naive CD45RA⁺ regulatory T cells in adult life // *Blood.* 2006a. Vol. 107. No 7. P. 2830–2838.
500. Seddiki N. et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells // *J. Exp. Med.* 2006b. Vol. 203. No 7. P. 1693–1700.
501. Sedlář A. et al. Interaction between Galectin-3 and Integrins Mediates Cell-Matrix Adhesion in Endothelial Cells and Mesenchymal Stem Cells // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22. No 10. P. 5144.
502. Sedney C. J., Harvill E. T. The Neonatal Immune System and Respiratory Pathogens // *Microorganisms.* 2023. Vol. 11. No 6. P. 1597.
503. Seetharaman J. et al. X-ray Crystal Structure of the Human Galectin-3 Carbohydrate Recognition Domain at 2.1-Å Resolution // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273. No 21. P. 13047–13052.
504. Seidmann L. et al. Transient CD15-positive endothelial phenotype in the human placenta correlates with physiological and pathological fetoplacental immaturity // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2014. Vol. 180. P. 172–179.
505. Seppälä M. et al. Glycosylation related actions of glycodeclin: gamete, cumulus cell, immune cell and clinical associations // *Hum. Reprod. Update.* 2007. Vol. 13. No 3. P. 275–287.
506. Servettaz A. et al. Identification of target antigens of antiendothelial cell antibodies in healthy individuals: A proteomic approach // *Proteomics.* 2008a. Vol. 8. No 5. P. 1000–1008.
507. Servettaz A. et al. Natural anti-endothelial cell antibodies // *Autoimmun. Rev.* 2008b. Vol. 7. No 6. P. 426–430.
508. Seyrek K., Richter M., Lavrik I. N. Decoding the sweet regulation of apoptosis: the role of glycosylation and galectins in apoptotic signaling pathways // *Cell Death Differ.* 2019. Vol. 26. No 6. P. 981–993.

509. Sgambati E. et al. Lectin Histochemistry in the Human Placenta of Pregnancies Complicated by Intrauterine Growth Retardation Based on Absent or Reversed Diastolic Flow // *Placenta*. 2002. Vol. 23. No 6. P. 503–515.
510. Sgambati E. et al. Distribution of the glycoconjugate oligosaccharides in the human placenta from pregnancies complicated by altered glycemia: lectin histochemistry // *Histochem. Cell Biol.* 2007. Vol. 128. No 3. P. 263–273.
511. Shah N. M. et al. Changes in T Cell and Dendritic Cell Phenotype from Mid to Late Pregnancy Are Indicative of a Shift from Immune Tolerance to Immune Activation // *Front. Immunol.* 2017. Vol. 8. P. 1138.
512. Shah N. M. et al. Progesterone-Related Immune Modulation of Pregnancy and Labor // *Front. Endocrinol.* 2019. Vol. 10. P. 198.
513. Sharp A. N. et al. Placental Apoptosis in Health and Disease // *Am. J. Reprod. Immunol.* 2010. Vol. 64. No 3. P. 159–169.
514. Sheikh K. A., Zhang G. An update on pathobiologic roles of anti-glycan antibodies in Guillain-Barré syndrome // *Biol. Rep.* 2010. Vol. 2. P. 21.
515. Shilova N. et al. Natural Antibodies Against Sialoglycans // *Top Curr Chem.* 2013. P. 169–181.
516. Shimada S. No difference in natural killer or natural killer T-cell population, but aberrant T-helper cell population in the endometrium of women with repeated miscarriage // *Hum. Reprod.* 2004. Vol. 19. No 4. P. 1018–1024.
517. Shimada S. et al. Increased IL-10-competent regulatory B cells in the decidua of early human pregnancy // *J. Reprod. Immunol.* 2023. Vol. 160. P. 104142.
518. Shimizu Y. et al. Expression and Localization of Galectin-9 in the Human Uterodome // *Endocr. J.* 2008. Vol. 55. No 5. P. 879–887.
519. Shyu M.-K. et al. MUC1 Expression Is Elevated in Severe Preeclamptic Placentas and Suppresses Trophoblast Cell Invasion via β 1-Integrin Signaling // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2011. Vol. 96. No 12. P. 3759–3767.
520. Si Y. et al. Human galectin-16 has a pseudo ligand binding site and plays a role in regulating c-Rel-mediated lymphocyte activity // *Biochim. Biophys. Acta.* 2021. Vol. 1865. No 1. P. 129755.
521. Silva M. C. et al. Glycans as Immune Checkpoints: Removal of Branched N-glycans Enhances Immune Recognition Preventing Cancer Progression // *Cancer Immunol. Res.* 2020. Vol. 8. No 11. P. 1407–1425.
522. Simchen M. J. et al. Factor V Leiden and Antiphospholipid Antibodies in Either Mothers or Infants Increase the Risk for Perinatal Arterial Ischemic Stroke // *Stroke.* 2009. Vol. 40. No 1. P. 65–70.
523. Simmi K. Cord blood as diagnostic window for preeclampsia // *Recent Pat. Biomark.* 2015. Vol. 5. No 1. P. 20–24.

524. Slowik M. et al. CD8+CD28-lymphocytes in peripheral blood and serum concentrations of soluble interleukin 6 receptor are increased in patients with graves' orbitopathy and correlate with disease activity // *Endocr. Res.* 2012. Vol. 37. No 2. P. 89–95.
525. Smith K. D. et al. Analysis of the Glycosylation Patterns of the Extracellular Domain of the Epidermal Growth Factor Receptor Expressed in Chinese Hamster Ovary Fibroblasts // *Growth Factors.* 1996. Vol. 13. No 1–2. P. 121–132.
526. Smith S., Baker P. N., Symonds E. M. Placental apoptosis in normal human pregnancy // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1997. Vol. 177. No 1. P. 57–65.
527. Smorodin E. et al. The Relation of the Level of Serum Anti-TF, -Tn and -Alpha-Gal IgG to Survival in Gastrointestinal Cancer Patients // *Int. J. Med. Sci.* 2013. Vol. 10. No 12. P. 1674–1682.
528. Smorodin E. et al. IgG Antibodies to GlcNAc β and Asialo-GM2 (GA2) Glycans as Potential Markers of Liver Damage in Chronic Hepatitis C and the Efficacy of Antiviral Treatment // *Dis. Markers.* 2018. Vol. 2018. P. 1–13.
529. Soares M. J., Varberg K. M., Iqbal K. Hemochorial placentation: development, function, and adaptations† // *Biol. Reprod.* 2018. Vol. 99. No 1. P. 196–211.
530. Söderström K. et al. CD94/NKG2 is the predominant inhibitory receptor involved in recognition of HLA-G by decidual and peripheral blood NK cells. // *J. Immunol. Baltim. Md* 1950. 1997. Vol. 159. No 3. P. 1072–5.
531. Somerset D. A. et al. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset // *Immunology.* 2004. Vol. 112. No 1. P. 38–43.
532. Soybilgic A., Avcin T. Pediatric APS: state of the art // *Curr Rheumatol Rep.* 2020. Vol. 22. No 3. P.9.
533. Squire J. M. et al. Quasi-periodic substructure in the microvessel endothelial glycocalyx: A possible explanation for molecular filtering? // *J. Struct. Biol.* 2001. Vol. 136. No 3. P. 239–255.
534. Stefanski A. L. et al. Siglec-6 Signaling Uses Src Kinase Tyrosine Phosphorylation and SHP-2 Recruitment // *Cells.* 2022. Vol. 11. No 21. P. 3427.
535. Stenqvist A.-C. et al. Exosomes Secreted by Human Placenta Carry Functional Fas Ligand and TRAIL Molecules and Convey Apoptosis in Activated Immune Cells, Suggesting Exosome-Mediated Immune Privilege of the Fetus // *J. Immunol.* 2013. Vol. 191. No 11. P. 5515–5523.
536. Stepan H. et al. Clinical utility of sFlt-1 and PlGF in screening, prediction, diagnosis and monitoring of pre-eclampsia and fetal growth restriction // *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2023. Vol. 61. No 2. P.168-180.
537. Stowell S. R. et al. Innate immune lectins kill bacteria expressing blood group antigen // *Nat. Med.* 2010. Vol. 16. No 3. P. 295–301.

538. Strioga M., Pasukoniene V., Characiejus D. CD8+CD28- and CD8+CD57+ T cells and their role in health and disease // 2011. Vol.134. No 1. P.17-32.
539. Stuchlová Horynová M. et al. Aberrant O-glycosylation and anti-glycan antibodies in an autoimmune disease IgA nephropathy and breast adenocarcinoma // Cell. Mol. Life Sci. 2013. Vol. 70. No 5. P. 829–839.
540. Sturm A. et al. Human Galectin-2: Novel Inducer of T Cell Apoptosis with Distinct Profile of Caspase Activation // J. Immunol. 2004. Vol. 173. No 6. P. 3825–3837.
541. Su J. et al. Galectin-13, a different prototype galectin, does not bind β -galactosides and forms dimers via intermolecular disulfide bridges between Cys-136 and Cys-138 // Sci. Rep. 2018a. Vol. 8. No 1. P. 980.
542. Su J. et al. Resetting the ligand binding site of placental protein 13/galectin-13 recovers its ability to bind lactose // Biosci. Rep. 2018b. Vol. 38. No 6. BSR20181787.
543. Suciu-Foca N., Manavalan J. S., Cortesini R. Generation and function of antigen-specific suppressor and regulatory T cells // Transpl. Immunol. 2003. Vol. 11. No 3–4. P. 235–244.
544. Sukhikh G. T. et al. Differences of glycocalyx composition in the structural elements of placenta in preeclampsia // Placenta. 2016. Vol. 43. P. 69–76.
545. Sulke A. N., Jones D. B., Wood P. J. Hormonal modulation of human natural killer cell activity in vitro // J. Reprod. Immunol. 1985. Vol. 7. No 2. P. 105–110.
546. Sultana Z. et al. Is there a role for placental senescence in the genesis of obstetric complications and fetal growth restriction? // Am. J. Obstet. Gynecol. 2018. Vol. 218. No 2. P. S762–S773.
547. Sun J. et al. Tim-3 Is Upregulated in NK Cells during Early Pregnancy and Inhibits NK Cytotoxicity toward Trophoblast in Galectin-9 Dependent Pathway // PLOS ONE. 2016. Vol. 11. No 1. P. e0147186.
548. Sun L., Yi S., O'Connell P. J. Foxp3 regulates human natural CD4+CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression of xenogeneic response // Xenotransplantation. 2010. Vol. 17. No 2. P. 121–130.
549. Sun X., Zhang W. Silencing of Gal-7 inhibits TGF- β 1-induced apoptosis of human airway epithelial cells through JNK signaling pathway // Exp. Cell Res. 2019. Vol. 375. No 2. P. 100–105.
550. Sun Z. et al. Mucin O-glycosylating enzyme GALNT2 facilitates the malignant character of glioma by activating the EGFR/PI3K/Akt/mTOR axis // Clin. Sci. 2019. Vol. 133. No 10. P. 1167–1184.
551. Suppo de Souza Rugolo L. M., Bentlin M. R., Petean Trindade C. E. Preeclampsia // NeoReviews. 2012. Vol. 13. No 9. P. e532–e541.

552. Svensson L. et al. Forssman expression on human erythrocytes: Biochemical and genetic evidence of a new histo-blood group system // *Blood*. 2013. Vol. 121. No 8. P. 1459–1468.
553. Svensson-Arvelund J. et al. The Human Fetal Placenta Promotes Tolerance against the Semiallogeneic Fetus by Inducing Regulatory T Cells and Homeostatic M2 Macrophages // *J. Immunol.* 2015. Vol. 194. No 4. P. 1534–1544.
554. Sweeney J. G. et al. Loss of GCNT2/I-branched glycans enhances melanoma growth and survival // *Nat. Commun.* 2018. Vol. 9. No 1. P. 3368.
555. Swindall A. F., Bellis S. L. Sialylation of the Fas death receptor by St6Gal-I provides protection against Fas-mediated apoptosis in colon carcinoma cells // *J. Biol. Chem.* 2011. Vol. 286. No 26. P. 22982–22990.
556. Szekeres-Bartho J., Halasz M., Palkovics T. Progesterone in pregnancy; receptor–ligand interaction and signaling pathways // *J. Reprod. Immunol.* 2009. Vol. 83. No 1–2. P. 60–64.
557. Tacke P. J. et al. Effective induction of naive and recall T-cell responses by targeting antigen to human dendritic cells via a humanized anti–DC–SIGN antibody // *Blood*. 2005. Vol. 106. No 4. P. 1278–1285.
558. Tanchot C. et al. Tumor-Infiltrating Regulatory T Cells: Phenotype, Role, Mechanism of Expansion In Situ and Clinical Significance // *Cancer Microenviron.* 2013. Vol. 6. No 2. P. 147–157.
559. Tang F. et al. Construction of a serum diagnostic signature based on m5C-related miRNAs for cancer detection // *Front. Endocrinol.* 2023. Vol. 14. P. 1099703.
560. Tang M. et al. Impact of Galectin-I on Trophoblast Stem Cell Differentiation and Invasion in In Vitro Implantation Model // *Reprod. Sci.* 2018. Vol. 25. No 5. P. 700–711.
561. Tanzer M. L. et al. Role of laminin carbohydrates on cellular interactions // *Kidney Int.* 1993. Vol. 43. No 1. P. 66–72.
562. Tatsuzuki A. et al. Characterization of the sugar chain expression of normal term human placental villi using lectin histochemistry combined with immunohistochemistry // *Arch. Histol. Cytol.* 2009. Vol. 72. No 1. P. 35–49.
563. Temme J. S. et al. Microarray-guided evaluation of the frequency, B-cell origins, and selectivity of human glycan-binding antibodies reveals new insights and novel antibodies // *J. Biol. Chem.* 2022. Vol. 298. No 10. P. 102468.
564. Than N. G. et al. Functional analyses of placental protein 13/galectin-13 // *Eur. J. Biochem.* 2004. Vol. 271. No 6. P. 1065–1078.
565. Than N. G. et al. Emergence of hormonal and redox regulation of galectin-1 in placental mammals: Implication in maternal–fetal immune tolerance // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008a. Vol. 105. No 41. P. 15819–15824.
566. Than N. G. et al. Placental protein 13 (galectin-13) has decreased placental expression but increased shedding and maternal serum concentrations in patients

- presenting with preterm pre-eclampsia and HELLP syndrome // *Virchows Arch.* 2008b. Vol. 453. No 4. P. 387–400.
567. Than N. G. et al. A primate subfamily of galectins expressed at the maternal–fetal interface that promote immune cell death // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2009. Vol. 106. No 24. P. 9731–9736.
 568. Than N. G. et al. Galectins: guardians of eutherian pregnancy at the maternal–fetal interface // *Trends Endocrinol. Metab.* 2012. Vol. 23. No 1. P. 23–31.
 569. Than N. G. et al. Galectins: Double-edged Swords in the Cross-roads of Pregnancy Complications and Female Reproductive Tract Inflammation and Neoplasia // *J. Pathol. Transl. Med.* 2015. Vol. 49. No 3. P. 181–208.
 570. Tikhonov A. et al. Glycan-specific antibodies as potential cancer biomarkers: a focus on microarray applications // *Clin. Chem. Lab. Med.* 2020. Vol. 58. No 10. P. 1611–1622.
 571. Tilburgs T. et al. Differential Distribution of CD4+CD25^{bright} and CD8+CD28– T-cells in Decidua and Maternal Blood During Human Pregnancy // *Placenta.* 2006. Vol. 27. P. 47–53.
 572. Tirado-Gonzalez I. et al. Galectin-1 influences trophoblast immune evasion and emerges as a predictive factor for the outcome of pregnancy // *Mol. Hum. Reprod.* 2013. Vol. 19. No 1. P. 43–53.
 573. Toftager-Larsen K. Carbohydrate heterogeneity of human alpha-fetoprotein in pregnancy. Methodological and clinical studies. // *Dan. Med. Bull.* 1990. Vol. 37. No 1. P. 41–57.
 574. Tomiie M. et al. Elevated expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in first trimester human placenta // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. Vol. 330. No 3. P. 999–1004.
 575. Toscano M. A. et al. Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death // *Nat. Immunol.* 2007. Vol. 8. No 8. P. 825–834.
 576. Tsai J.-T., Liu T.-K., Chou J.-H. Hybrid Taguchi-Genetic Algorithm for Global Numerical Optimization // *IEEE Trans. Evol. Comput.* 2004. Vol. 8. No 4. P. 365–377.
 577. Tsubata T. Role of inhibitory B cell co-receptors in B cell self-tolerance to non-protein antigens // *Immunol. Rev.* 2022. Vol. 307. No 1. P. 53–65.
 578. Tsuboi S. et al. A novel strategy for evasion of NK cell immunity by tumours expressing core2 O-glycans // *EMBO J.* 2011. Vol. 30. No 15. P. 3173–3185.
 579. Tsuboi S. MUC1 carrying core 2 O-glycans functions as a molecular shield against NK cell attack, promoting bladder tumor metastasis // *Int. J. Oncol.* 2012. Vol. 40. No 6. P. 1831–8.

580. Tung T.-C., Tung Y.-F. Experiments on the Developmental Potencies of Blastoderms and Fragments of Teleostean Eggs separated latitudinally // *Proc. Zool. Soc. Lond.* 1945. Vol. 115. No 1–2. P. 175–188.
581. Uchida H. et al. Glycodelin in reproduction // *Reprod. Med. Biol.* 2013. Vol. 12. No 3. P. 79–84.
582. Unger W. W. J. et al. Glycan-modified liposomes boost CD4⁺ and CD8⁺ T-cell responses by targeting DC-SIGN on dendritic cells // *J. Controlled Release.* 2012. Vol. 160. No 1. P. 88–95.
583. Unverdorben L. et al. Prototype and Chimera-Type Galectins in Placentas with Spontaneous and Recurrent Miscarriages // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. Vol. 17. No 5. P. 644.
584. Urlacher A., Tongio M. M., Pasquali J. L. IgM anti-idiotypes that block anti-HLA antibodies: naturally occurring or immune antibodies? // *Clin. Exp. Immunol.* 2008. Vol. 83. No 1. P. 116–120.
585. Uszyński M., Uszyński W., Żekanowska E. P-selectin in placenta and gestational myometrium: its measurements and hypothetical role in hemostasis of placental bed after labor // *J. Perinat. Med.* 2008. Vol. 36. No 3. P. 213–6.
586. Vankemmelbeke M., Chua J. X., Durrant L. G. Cancer cell associated glycans as targets for immunotherapy // *OncoImmunology.* 2016. Vol. 5. No 1. P. e1061177.
587. Vanoni F. et al. Neonatal Systemic Lupus Erythematosus Syndrome: a Comprehensive Review // *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2017. Vol. 53. No 3. P. 469–476.
588. Varki A. Letter to the Glyco-Forum: Since there are PAMPs and DAMPs, there must be SAMPs? Glycan «self-associated molecular patterns» dampen innate immunity, but pathogens can mimic them // *Glycobiology.* 2011. Vol. 21. No 9. P. 1121–1124.
589. Varki A., Gagneux P. Multifarious roles of sialic acids in immunity // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2012. Vol. 1253. No 1. P. 16–36.
590. Vas J., Grönwall C., Silverman G. J. Fundamental roles of the innate-like repertoire of natural antibodies in immune homeostasis // *Front. Immunol.* 2013. Vol. 4. P. 4.
591. Vasta G. R. et al. Functions of galectins as ‘self/non-self’-recognition and effector factors // *Pathog. Dis.* 2017. Vol. 75. No 5. tx046.
592. Verhelst X. et al. Protein Glycosylation as a Diagnostic and Prognostic Marker of Chronic Inflammatory Gastrointestinal and Liver Diseases // *Gastroenterology.* 2020. Vol. 158. No 1. P. 95–110.
593. Vianna P. et al. HLA-G and CD8⁺ regulatory T cells in the inflammatory environment of pre-eclampsia // *Reproduction.* 2016. Vol. 152. No 6. P. 741–751.
594. Vidarsson G., Dekkers G., Rispens T. IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions // *Front. Immunol.* 2014. Vol. 5. P. 520.

595. Vilotić A. et al. IL-6 and IL-8: An Overview of Their Roles in Healthy and Pathological Pregnancies // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. Vol. 23. No 23. P. 14574.
596. Vitharsson G. et al. Opsonization And Antibodies To Capsular And Cell Wall Polysaccharides Of *Streptococcus Pneumoniae* // *J. Infect. Dis.* 1994. Vol. 170. No 3. P. 592–599.
597. Vivier E. et al. Innate Lymphoid Cells: 10 Years On // *Cell*. 2018. Vol. 174. No 5. P. 1054–1066.
598. Vlassara H. et al. Identification of Galectin-3 As a High-Affinity Binding Protein for Advanced Glycation End Products (AGE): A New Member of the AGE-Receptor Complex // *Mol. Med.* 1995. Vol. 1. No 6. P. 634–646.
599. Vokalova L. et al. Placental Protein 13 (Galectin-13) Polarizes Neutrophils Toward an Immune Regulatory Phenotype // *Front. Immunol.* 2020. Vol. 11. P. 145.
600. Volarevic V. et al. Galectin-3 Regulates Indoleamine-2,3-dioxygenase-Dependent Cross-Talk between Colon-Infiltrating Dendritic Cells and T Regulatory Cells and May Represent a Valuable Biomarker for Monitoring the Progression of Ulcerative Colitis // *Cells*. 2019. Vol. 8. No 7. P. 709.
601. Vuskovic M. I. et al. Processing and analysis of serum antibody binding signals from Printed Glycan Arrays for diagnostic and prognostic applications // *Int. J. Bioinforma. Res. Appl.* 2011. Vol. 7. No 4. P. 402.
602. Wagner K. W. et al. Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL // *Nat. Med.* 2007. Vol. 13. No 9. P. 1070–1077.
603. Wang F. et al. Activation of Tim-3–Galectin-9 pathway improves survival of fully allogeneic skin grafts // *Transpl. Immunol.* 2008. Vol. 19. No 1. P. 12–19.
604. Wang F. et al. Tim-3-Galectin-9 pathway involves the suppression induced by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells // *Immunobiology*. 2009. Vol. 214. No 5. P. 342–349.
605. Wang M. et al. Galectin-14 Promotes Trophoblast Migration and Invasion by Upregulating the Expression of MMP-9 and N-Cadherin // *Front. Cell Dev. Biol.* 2021a. Vol. 9. P. 645658.
606. Wang W. et al. Tumor-released Galectin-3, a Soluble Inhibitory Ligand of Human NKp30, Plays an Important Role in Tumor Escape from NK Cell Attack // *J. Biol. Chem.* 2014. Vol. 289. No 48. P. 33311–33319.
607. Wang W. et al. T Helper (Th) Cell Profiles in Pregnancy and Recurrent Pregnancy Losses: Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Tfh Cells // *Front. Immunol.* 2020. Vol. 11. P. 2025.
608. Wang X., Athayde N., Trudinger B. Placental vascular disease and toll-like receptor 4 gene expression // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2005. Vol. 192. No 3. P. 961–966.
609. Wang Y. et al. Loss of α 2-6 sialylation promotes the transformation of synovial fibroblasts into a pro-inflammatory phenotype in arthritis // *Nat. Commun.* 2021b. Vol. 12. No 1. P. 2343.

610. Watchko J. F. ABO hemolytic disease of the newborn: a need for clarity and consistency in diagnosis // *J. Perinatol.* 2023. Vol. 43. No 2. P. 242–247.
611. Wegmann T. G. et al. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? // *Immunol. Today.* 1993. Vol. 14. No 7. P. 353–356.
612. Wenzel U. O., Ehmke H., Bode M. Immune mechanisms in arterial hypertension. Recent advances // *Cell Tissue Res.* 2021. Vol. 385. No 2. P. 393–404.
613. Whiteside S. K. et al. Bystander T Cells: A Balancing Act of Friends and Foes // *Trends Immunol.* 2018. Vol. 39. No 12. P. 1021–1035.
614. Wieslander Jö. et al. Specificity of human antibodies against gal α 1-3gal carbohydrate epitope and distinction from natural antibodies reacting with gal α 1-2gal or gal α 1-4 gal // *Glycoconj. J.* 1990. Vol. 7. No 1. P. 85–100.
615. Wilczyński J. R. Immunological Analogy Between Allograft Rejection, Recurrent Abortion and Pre-Eclampsia – the Same Basic Mechanism? // *Hum. Immunol.* 2006. Vol. 67. No 7. P. 492–511.
616. Willhauck-Fleckenstein M. et al. Transcriptional regulation of the vascular endothelial glycome by angiogenic and inflammatory signalling // *Angiogenesis.* 2010. Vol. 13. No 1. P. 25–42.
617. Williams P. J. et al. Altered decidual leucocyte populations in the placental bed in pre-eclampsia and foetal growth restriction: a comparison with late normal pregnancy // *Reproduction.* 2009. Vol. 138. No 1. P. 177–184.
618. Winn V. D. et al. Severe Preeclampsia-Related Changes in Gene Expression at the Maternal-Fetal Interface Include Sialic Acid-Binding Immunoglobulin-Like Lectin-6 and Pappalysin-2 // *Endocrinology.* 2009. Vol. 150. No 1. P. 452–462.
619. Wolff M. von et al. Galectin fingerprinting in human endometrium and decidua during the menstrual cycle and in early gestation // *MHR Basic Sci. Reprod. Med.* 2004. Vol. 11. No 3. P. 189–194.
620. Wright R. D., Cooper D. Glycobiology of leukocyte trafficking in inflammation // *Glycobiology.* 2014. Vol. 24. No 12. P. 1242–1251.
621. Wu Q. et al. ppGalNAc-T4-catalyzed O-Glycosylation of TGF- β type II receptor regulates breast cancer cells metastasis potential // *J. Biol. Chem.* 2021. Vol. 296. P. 100119.
622. Wu Y.-C. B., Kipling D., Dunn-Walters D. K. The Relationship between CD27 Negative and Positive B Cell Populations in Human Peripheral Blood // *Front. Immunol.* 2011. Vol. 2. P. 81.
623. Xia L., Gildersleeve J. C. Anti-glycan IgM repertoires in newborn human cord blood // *PLOS ONE.* 2019. Vol. 14. No 7. P. e0218575.
624. Xiao L., Harrison D. G. Inflammation in Hypertension // *Can J Cardiol.* 2020. Vol. 36. No 5. P. 635–647.

625. Xu X., Zhou Y., Wei H. Roles of HLA-G in the Maternal-Fetal Immune Microenvironment // *Front. Immunol.* 2020. Vol. 11. P. 592010.
626. Yamaguchi T. et al. Galectin-7, induced by cis -urocanic acid and ultraviolet B irradiation, down-modulates cytokine production by T lymphocytes // *Exp. Dermatol.* 2013. Vol. 22. No 12. P. 840–842.
627. Yamamoto E. et al. N -Acetylglucosaminyltransferase V Regulates Extravillous Trophoblast Invasion through Glycosylation of $\alpha 5\beta 1$ Integrin // *Endocrinology.* 2009. Vol. 150. No 2. P. 990–999.
628. Yang H. et al. β -1,4-Galactosyltransferase I Promotes Tumor Necrosis Factor- α Autocrine via the Activation of MAP Kinase Signal Pathways in Schwann Cells // *J. Mol. Neurosci.* 2011. Vol. 45. No 2. P. 269–276.
629. Yang H.-M., Yu C., Yang Z. N-acetylglucosaminyltransferase V negatively regulates integrin $\alpha 5\beta 1$ -mediated monocyte adhesion and transmigration through vascular endothelium // *Int. J. Oncol.* 2012. Vol. 41. No 2. P. 589–598.
630. Yang S. W. et al. DC-SIGN expression in Hofbauer cells may play an important role in immune tolerance in fetal chorionic villi during the development of preeclampsia // *J. Reprod. Immunol.* 2017a. Vol. 124. P. 30–37.
631. Yang Y. Y. M. et al. Specific anti-glycan antibodies are sustained during and after parasite clearance in *Schistosoma japonicum*-infected rhesus macaques // *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2017b. Vol. 11. No 2. P. e0005339.
632. Yeh P. et al. Investigation of potential carbohydrate antigen targets for human and baboon antibodies // *Xenotransplantation.* 2010. Vol. 17. No 3. P. 197–206.
633. Yi H. J. et al. Elevated natural killer cell levels and autoimmunity synergistically decrease uterine blood flow during early pregnancy // *Obstet. Gynecol. Sci.* 2014. Vol. 57. No 3. P. 208.
634. Yu F. et al. Galectin-3 Translocates to the Perinuclear Membranes and Inhibits Cytochrome c Release from the Mitochondria // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277. No 18. P. 15819–15827.
635. Yu Y. et al. Recent advances in CD8⁺ regulatory T_H1/2 cell research // *Oncol. Lett.* 2018. Vol. 15. No 6. P. 8187-8194.
636. Yuan Q. et al. β -1,4-Galactosyltransferase I involved in Schwann cells proliferation and apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha via the activation of MAP kinases signal pathways // *Mol. Cell. Biochem.* 2012. Vol. 365. No 1–2. P. 149–158.
637. Zenclussen A. C. et al. Asymmetric antibodies and pregnancy // *Am. J. Reprod. Immunol.* 2001. Vol. 45. No 5. P. 289–294.
638. Zeng B. et al. Treg cells are negatively correlated with increased memory B cells in pre-eclampsia while maintaining suppressive function on autologous B-cell proliferation // *Am. J. Reprod. Immunol.* 2013. Vol. 70. No 6. P. 454–463.

639. Zeng F. et al. Effect of CD38 on B-cell function and its role in the diagnosis and treatment of B-cell-related diseases // *J. Cell. Physiol.* 2022. Vol. 237. No 7. P. 2796–2807.
640. Zhan Z. et al. Studies on activity of NK cells in preeclampsia patients // *J. Huazhong Univ. Sci. Technolog. Med. Sci.* 2004. Vol. 24. No 5. P. 473–475.
641. Zhang B. et al. Death receptor 5 is activated by fucosylation in colon cancer cells // *FEBS J.* 2019. Vol. 286. No 3. P. 555–571.
642. Zhang C., Zhang J., Tian Z. The regulatory effect of natural killer cells: do «NK-reg cells» exist? // *Cell. Mol. Immunol.* 2006. Vol. 3. No 4. P. 241–54.
643. Zhang J. et al. Role of glycosylation in TGF- β signaling and epithelial-to-mesenchymal transition in cancer // *Protein Cell.* 2021. Vol. 12. No 2. P. 89–106.
644. Zhang M. et al. Altered β 1,6-GlcNAc and bisecting GlcNAc-branched N-glycan on integrin β 1 are associated with early spontaneous miscarriage in humans // *Hum. Reprod.* 2015. Vol. 30. No 9. P. 2064–2075.
645. Zhang Z. et al. Suppression of FUT1/FUT4 expression by siRNA inhibits tumor growth // *Biochim. Biophys. Acta.* 2008. Vol. 1783. No 2. P. 287–296.
646. Zhao J. et al. Human Pregnancy Up-Regulates Tim-3 in Innate Immune Cells for Systemic Immunity // *J. Immunol.* 2009. Vol. 182. No 10. P. 6618–6624.
647. Zhao M. et al. Dual-cutoff of sFlt-1/PlGF ratio in the stratification of preeclampsia: a systematic review and meta-analysis // *Arch Gynecol Obstet.* 2017. Vol. 295. No 5. P. 1079–1087.
648. Zhao Y. et al. Branched N-glycans regulate the biological functions of integrins and cadherins // *FEBS J.* 2008. Vol. 275. No 9. P. 1939–1948.
649. Zhu C. et al. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity // *Nat. Immunol.* 2005. Vol. 6. No 12. P. 1245–1252.
650. Zhu F. et al. A ten-genes-based diagnostic signature for atherosclerosis // *BMC Cardiovasc. Disord.* 2021. Vol. 21. No 1. P. 513.
651. Zick Y. et al. Role of galectin-8 as a modulator of cell adhesion and cell growth // *Glycoconj. J.* 2002. Vol. 19. No 7–9. P. 517–526.
652. Ziganshina M. M. et al. Autoantibodies against endothelial antigens in preeclampsia // *Akusherstvo Ginekol. Russ. Fed.* 2016. No 3. P. 56–64.
653. Ziganshina M. M. et al. Endometrial glycome in the menstrual cycle and endometrial receptivity // *Akusherstvo Ginekol. Russ. Fed.* 2017. No 12. P. 17–24.
654. Ziganshina M. M. et al. Endothelial Dysfunction as a Consequence of Endothelial Glycocalyx Damage: A Role in the Pathogenesis of Preeclampsia // *Endothelial Dysfunction - Old Concepts and New Challenges. InTech*, 2018a. Ch. 6. P. 113–146.

655. Ziganshina M. M. et al. Expression of fucosylated glycans in endothelial glycocalyxes of placental villi at early and late fetal growth restriction // *Placenta*. 2020a. Vol. 90. P. 98–102.
656. Ziganshina M. M. et al. Can Endothelial Glycocalyx Be a Major Morphological Substrate in Pre-Eclampsia? // *Int. J. Mol. Sci.* 2020b. Vol. 21. No 9. P. 3048.
657. Ziganshina M. M. et al. Epithelial apical glycosylation changes associated with thin endometrium in women with infertility - a pilot observational study // *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2021. Vol. 19. No 1. P. 73.
658. Ziganshina M. M. et al. Repertoire of glycan-binding placenta-associated antibodies in healthy pregnancy and in pre-eclampsia // *Scand. J. Immunol.* 2022a. Vol. 95. No 6. e13157.
659. Ziganshina M. M. et al. Characterization of Vascular Patterns Associated with Endothelial Glycocalyx Damage in Early- and Late-Onset Preeclampsia // *Biomedicines*. 2022b. Vol. 10. No 11. P. 2790.
660. Ziganshina M. M. 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 // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. Vol. 24. No 21. P. 15611.
661. Ziganshina M. M. M. et al. Autoantibodies to endothelial cells in patients with hypertensive disorders during pregnancy // *Pregnancy Hypertens.* 2018b. Vol. 12. P. 65–70.
662. Zimmermann W., Kammerer R. The immune-modulating pregnancy-specific glycoproteins evolve rapidly and their presence correlates with hemochorial placentation in primates // *BMC Genomics*. 2021. Vol. 22. No 1. P. 128.
663. Practice Bulletin No. 134 // *Obstet. Gynecol.* 2013. Vol. 121. No 5. P. 1122–1133.
664. Committee Opinion No 700: Methods for Estimating the Due Date // *Obstet. Gynecol.* 2017. Vol. 129. No 5. P. e150–e154.

ПРИЛОЖЕНИЕ

ID гликан а, GID	Структура	Тривиальное название	Короткое название
001	Fuc α -sp3		aF
002	Gal α -sp3		aA
003	Gal β -sp3		bA
004	GalNAc α 1-OSer	T _n -Ser	TnSer
005	GalNAc α -sp3	T _n	Tn
006	GalNAc β -sp3		bAN
007	Glc α -sp3		aG
008	Glc β -sp2		bG-C2
009	Glc β -sp3		bG
010	GlcNAc β -sp3		GN
011	GlcNAc β -sp2		GN-C2
012	GlcNAc β -sp7		GN-Ph
013	GlcNAc β -sp8		GN-PEG
014	GlcN(Gc) β -sp4		bGN(Gc)
015	HOCH ₂ (HOCH) ₄ CH ₂ NH ₂	aminoglucitol	glucitol
016	Man α -sp3		aM
017	Man α -sp4		aM-Gly
018	Man β -sp4		bM
019	ManNAc β -sp4		bMN
020	Rha α -sp3		aR
021	Gal β -sp4		bA-Gly
022	GlcNAc β -sp4		GN-Gly
023	GalNAc β -sp4		bAN-Gly
024	GlcNAc α -sp3		GNa

025	GalNAc β -sp10		bAN-PEG2
026	Rha β -sp4		bR
027	3,6-O-Me ₂ -Glc β -sp3		3,6-Me ₂ Glc
028	Xyl β -sp4		bXyl
029	Fuc β -sp4		bF
030	Glc β -sp4		bG-Gly
031	L-Ara α -sp4		aAra
032	GalN(Gc) β -sp3		bANGc
033	Glc-2-NH ₂		GNH ₂
034	L-Glc β -sp4		L-bG-Gly
035	GlcNAc β -sp2		GN-C2
036	Man β -sp3		bM
037	3-O-Su-Gal β -sp3		bA3Su
038	3-O-Su-GalNAc β -sp3		bAN3Su
039	Xyl β -sp3		bXyl
040	Xyl α -sp3		aXyl
041	6-O-Su-GalNAc α -sp3		aAN6Su
042	ManNAc α -sp4		aMN
043	6-O-Su-GlcNAc β -sp3		GN6Su
044	GlcA α -sp3	α -glucuronic acid	aGU
045	GlcA β -sp3	β -glucuronic acid	bGU
046	6-H ₂ PO ₃ Glc β -sp4	Glc6P	G6P
047	6-H ₂ PO ₃ Man α -sp3	Man6P	M6P
048	Neu5Ac α -sp3		Sia
049	Neu5Ac α -sp9		Sia-Bn
050	Neu5Ac β -sp3		bSia
051	Neu5Ac β -sp9		bSia-Bn
052	Neu5Gc α -sp3		aNeu5Gc
053	Neu5Gc β -sp3		bSia5Gc

054	9-NAc-Neu5Ac α -sp3		9NAcSia
055	3-O-Su-GlcNAc β -sp3		GN3Su
056	Gal α -sp7		aA-Ph
057	D-Rib β -sp4		bRib
058	Fuc β -sp3		bF
059	α Kdo-5-phosphate-sp11		A173
060	6-O-Su-Gal β -sp3		bA6Su
061	3-O-Su-GalNAc α -sp3		Tn3Su
062	GlcA β -sp2		bGU-C2
063	4-O-Su-GlcNAc β -sp2		GN4Su
064	4-O-Su-Gal β -sp3		A4Su
065	4-O-Su-GalNAc α -sp3		Tn4Su
066	4-O-Su-GalNAc β -sp3	bAN4Su	4-suGalNAcb-C3
067	KDN α -sp3		KDN-C3
068	KDN β -sp3		KDNb-C3
071	Fuc α 1-2Gal β -sp3	H _{di}	Hdi
072	Fuc α 1-3GlcNAc β -sp3		Fa3GN
073	Fuc α 1-4GlcNAc β -sp3	Le	Le
074	Fuc β 1-3GlcNAc β -sp3		Fb3GN
075	Gal α 1-2Gal β -sp3		Aa2A
076	Gal α 1-3Gal β -sp3	B _{di}	Bdi
077	Gal α 1-3GalNAc β -sp3		Tab
078	Gal α 1-3GalNAc α -sp3	T _{aa}	Taa
079	Gal α 1-3GalNAc α -sp7		Taa-Ph
080	Gal α 1-3GlcNAc β -sp3		Aa3GN
081	Gal α 1-4GlcNAc β -sp3		aLN
082	Gal α 1-4GlcNAc β -sp8		aLN-PEG
083	Gal α 1-6Glc β -sp4	melibiose	Aa6G
084	Gal β 1-2Gal β -sp3		Ab2A

085	Gal β 1-3GlcNAc β -sp3	Le ^c	LeC
086	Gal β 1-3GlcNAc β -sp2	Le ^c	LeC-C2
087	Gal β 1-3Gal β -sp3		Ab3A
088	Gal β 1-3GalNAc β -sp3	T $_{\beta\beta}$	Tbb
089	Gal β 1-3GalNAc α -sp3	TF	TF
090	Gal β 1-3GalNAc α -sp7		TF-Ph
092	Gal β 1-4Glc β -sp2	Lactose, Lac	Lac-C2
093	Gal β 1-4Glc β -sp4	Lactose, Lac	Lac-Gly
094	Gal β 1-4Gal β -sp4		Ab4A
095	Gal β 1-4GlcNAc β -OCH ₂ CH ₂ NH(Et)		LN-C2Et
096	Gal β 1-4GlcNAc β -sp2	N-acetyllactosamine, LN	LN-C2
097	Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	N-acetyllactosamine, LN	LN
098	Gal β 1-4GlcNAc β -sp5	N-acetyllactosamine, LN	LN-C8
099	Gal β 1-4GlcNAc β -sp8	N-acetyllactosamine, LN	LN-PEG
100	Gal β 1-6Gal β -sp4		Ab6A
101	GalNAc α 1-3GalNAc β -sp3	Fs-2	Fs-2
102	GalNAc α 1-3Gal β -sp3	A _{di}	Adi
103	GalNAc α 1-3GalNAc α -sp3	core 5	core5
104	GalNAc β 1-3Gal β -sp3		ANb3A
105	GalNAc β 1-3GalNAc β -sp3	para-Fs	para-Fs
106	GalNAc β 1-4GlcNAc β -sp3	LacdiNAc	LacdiNAc
107	GalNAc β 1-4GlcNAc β -sp2	LacdiNAc	LacdiNAc-C2
109	GalNAc(fur) β 1-4GlcNAc β -sp2		AN(f)b4GN-C2
110	Glc α 1-4Glc β -sp3	maltose	Malt2
111	Glc β 1-4Glc β -sp4	cellobiose	cello
112	Glc β 1-6Glc β -sp4	gentiobiose	gent
113	GlcNAc β 1-3GalNAc α -sp3	core 3	core3
114	GlcNAc β 1-3Man β -sp4		GN3M
115	GlcNAc β 1-4GlcNAc β -Asn	chitobiose-Asn	Ch2-Asn

116	GlcNAc β 1-4GlcNAc β -sp3	chitobiose	Ch2
117	GlcNAc β 1-4GlcNAc β -sp4	chitobiose	Ch2-Gly
118	GlcNAc β 1-6GalNAc α -sp3	core 6	core6
119	Man α 1-2Man β -sp4		Ma2Mb
120	Man α 1-3Man β -sp4		Ma3M
121	Man α 1-4Man β -sp4		Ma4M
122	Man α 1-6Man β -sp4		Ma6M
123	Man β 1-4GlcNAc β -sp4		Mb4GN
124	Man α 1-2Man α -sp4		Ma2Ma
125	6-Bn-Gal β 1-4GlcNAc β -sp2		6'Bn-LN
126	6-Bn-Gal α 1-4(6-Bn)GlcNAc β -sp3		Bn2-aLN
127	Gal β 1-4Glc β -sp4-Phe		Lac-Phe
128	Gal β 1-4Glc β -sp4-Trp		Lac-Trp
129	Gal β 1-3(6-O-Bn)GlcNAc β -sp3		6BnLeC
130	(6-O-Bn-Gal β 1)-3GlcNAc β -sp2		6'BnLeC
131	(6-O-Bn-Gal β 1)-3(6-O-Bn)GlcNAc β -sp3		Bn2LeC
132	Gal β 1-3GalNAc α -sp5	TF	TF-C8
133	Gal β 1-4Glc β -sp4-Ala		Lac-Ala
134	Gal β 1-4Glc β -sp4-Arg		Lac-Arg
135	Gal β 1-4Glc β -sp4-Asn		Lac-Asn
136	Gal β 1-4Glc β -sp4-Ile		Lac-Ile
137	Gal β 1-4Glc β -sp4-Nle		Lac-Nle
138	Gal β 1-4Glc β -sp4-Val		Lac-Val
139	Gal β 1-4GlcNAc α -sp3		LNa
140	Gal α 1-3GalNAc(fur) β -sp3		Tab(f)
141	GlcNAc β 1-4GlcNAc β -sp3		Ch2-C3
142	GlcNAc α 1-3GalNAc β -sp3		GNa3AN
143	Fuc α 1-2(3-O-Su)Gal β -sp3		Hdi3Su
144	Gal β 1-3(6-O-Su)GlcNAc β -sp2		LeC6Su-C2

145	Gal β 1-3(6-O-Su)GlcNAc β -sp3		LeC6Su
146	Gal β 1-4(6-O-Su)Glc β -sp2		Lac6Su
147	Gal β 1-4(6-O-Su)GlcNAc β -sp3		LN6Su
149	GlcNAc β 1-4(6-O-Su)GlcNAc β -sp2		Ch2-6Su
150	3-O-Su-Gal β 1-3GalNAc α -sp3		TF3'Su
151	6-O-Su-Gal β 1-3GalNAc α -sp3		TF6'Su
152	3-O-Su-Gal β 1-4Glc β -sp2	SM3	Lac3'Su
153	6-O-Su-Gal β 1-4Glc β -sp2		Lac6'Su
154	3-O-Su-Gal β 1-3GlcNAc β -sp3		LeC3'Su
155	3-O-Su-Gal β 1-3GlcNAc β -sp2		LeC3'Su
156	3-O-Su-Gal β 1-4GlcNAc β -sp2		LN3'Su-C2
157	3-O-Su-Gal β 1-4GlcNAc β -sp3		LN3'Su
158	4-O-Su-Gal β 1-4GlcNAc β -sp2		LN4'Su-C2
159	4-O-Su-Gal β 1-4GlcNAc β -sp3		LN4'Su
160	6-O-Su-Gal β 1-3GlcNAc β -sp2		LeC6'Su-C2
161	6-O-Su-Gal β 1-3GlcNAc β -sp3		LeC6'Su
162	6-O-Su-Gal β 1-4GlcNAc β -sp2		LN6'Su-C2
163	6-O-Su-Gal β 1-4GlcNAc β -sp3		LN6'Su
164	GlcA β 1-3GlcNAc β -sp3		GUb3GN
165	GlcA β 1-3Gal β -sp3		GUb3A
166	GlcA β 1-6Gal β -sp3		GUb6A
167	GlcNAc β 1-4-[HOOC(CH ₃)CH]-3-O-GlcNAc β -sp4	GlcNAc-Mur	GN-Mur
168	GlcNAc β 1-4Mur-L-Ala-D-i-Gln-Lys	GMDP-Lys	GMDPLys
169	Neu5Ac α 2-3Gal β -sp3	GM4	GM4
170	Neu5Ac α 2-6Gal β -sp3		Sia6A
171	Neu5Ac α 2-3GalNAc α -sp3		3-SiaTn
172	Neu5Ac α 2-6GalNAc α -sp3	SiaT _n	SiaTn
173	Neu5Ac β 2-6GalNAc α -sp3		bSiaTn
174	Neu5Gc α 2-6GalNAc α -sp3		Neu5GcTn

175	Neu5Gc β 2-6GalNAc α -sp3		bNeu5GcTn
176	3-O-Su-Gal β 1-4(6-O-Su)Glc β -sp2		Lac3',6Su2
177	3-O-Su-Gal β 1-4(6-O-Su)GlcNAc β -sp3		LN3'6Su2
178	6-O-Su-Gal β 1-4(6-O-Su)Glc β -sp2		Lac6,6'Su2
179	6-O-Su-Gal β 1-3(6-O-Su)GlcNAc β -sp2		LeC6,6'Su2
180	6-O-Su-Gal β 1-4(6-O-Su)GlcNAc β -sp2		LN66'Su2
181	3,4-O-Su ₂ -Gal β 1-4GlcNAc β -sp3		LN3'4'Su2
182	3,6-O-Su ₂ -Gal β 1-4GlcNAc β -sp2		LN3'6'Su2
183	4,6-O-Su ₂ -Gal β 1-4GlcNAc β -sp2		LN4'6'Su2-C2
184	4,6-O-Su ₂ -Gal β 1-4GlcNAc β -sp3		LN4'6'Su2
186	Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-sp3	(Sia) ₂	(Sia) ₂
187	Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-sp9	(Sia) ₂	(Sia) ₂ Bn
188	Neu5Ac α 2-8Neu5Ac β -sp9		(Sia) ₂ -bBn
189	3,6-O-Su ₂ -Gal β 1-4(6-O-Su)GlcNAc β -sp2		LN3'66'Su3
190	Gal β 1-4-(6-P)GlcNAc β -sp2		LN6P
191	6-P-Gal β 1-4GlcNAc β -sp2		LN6'P
192	GalNAc β 1-4(6-O-Su)GlcNAc β -sp3		LacdiNAc6Su
193	3-O-Su-GalNAc β 1-4GlcNAc β -sp3		LacdiNAc3'Su
194	6-O-Su-GalNAc β 1-4GlcNAc β -sp3		LacdiNAc6'Su
195	6-O-Su-GalNAc β 1-4(3-O-Ac)GlcNAc β -sp3		3Ac-LacdiNAc6'Su
196	3-O-Su-GalNAc β 1-4(3-O-Su)GlcNAc β -sp3		LacdiNAc3,3'Su2
197	3,6-O-Su ₂ -GalNAc β 1-4GlcNAc β -sp3		LacdiNAc3',6'Su2
198	4,6-O-Su ₂ -GalNAc β 1-4GlcNAc β -sp3		LacdiNAc4',6'Su2
199	4,6-O-Su ₂ -GalNAc β 1-4-(3-O-Ac)GlcNAc β -sp3		3Ac-LacdiNAc4',6'Su2
200	4-O-Su-GalNAc β 1-4GlcNAc β -sp3		LacdiNAc4'Su
201	3,4-O-Su ₂ -GalNAc β 1-4GlcNAc β -sp3		LacdiNAc3',4'Su2
202	6-O-Su-GalNAc β 1-4(6-O-Su)GlcNAc β -sp3		LacdiNAc6,6'Su2
203	Gal β 1-4(6-O-Su)GlcNAc β -sp2		LN6Su

204	4-O-Su-GalNAc β 1-4GlcNAc β -sp2		LacdiNAc4'Su-C2
205	Neu5Ac α 2-6GalNAc β -sp3		6SiaANb
206	Neu5Gc α 2-3Gal β -sp3		Neu5Gc3A
207	Neu5Ac β 2-6GalNAc β -sp3		bSiaANb
208	Gal β 1-3GlcNAc β -sp4	Le ^c	LeC-Gly
209	α Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)- α Kdo-sp11		A58
210	L,D-Hep-(1 $\rightarrow$ 5)- α Kdo-4-phosphate-sp11		JN
211	α Kdo-(2 $\rightarrow$ 8)- α Kdo-sp11		A78
212	D-glycero- α -D-talo-octulosonic acid (Ko)-(2 $\rightarrow$ 4)- α Kdo-sp11		NW61S
213	Neu5Ac β 2-6Gal β -sp3		6bSiaA
214	Δ GlcA β 1-3Gal β -sp3	Δ GlcA $\square$ 3Gal	deltaGUb3A
215	Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β -sp3	Le ^d , H (type 1)	LeD
216	Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	H (type 2)	Htype2
217	Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc α -sp3	H (type 3)	Htype3
218	GlcNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β -sp3		glucoAtri
219	Fuc α 1-2Gal β 1-4Glc β -sp4	H (type 6)	Htype6
220	Gal α 1-3Gal β 1-4Glc β -sp2		Aa3'Lac-C2
221	Gal α 1-3Gal β 1-4Glc β -sp4		Aa3'Lac-Gly
222	Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	Galili (tri)	Galili3
223	Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β -sp2	P ^k , Gb3, GbOse ₃	Pk-C2
224	Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β -sp3		Pk
225	Gal α 1-4Gal β 1-4GlcNAc β -sp2	P ₁	P1
226	Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β -sp3	B _{tri}	Btri
227	Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β -sp5	B _{tri}	Btri-C8
228	Gal β 1-2Gal α 1-3GlcNAc β -sp3		Ab2Aa3GN
229	Gal β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp4		Ab3'LN-Gly
230	Fuc β 1-2Gal β 1-3GlcNAc β -sp3		Fb2'LeC
231	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3GalNAc α -sp3		LN3Tn
232	Gal β 1-4GlcNAc β 1-6GalNAc α -sp3		LN6Tn

233	Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β -sp3	Le ^a	LeA
234	Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β -sp3	Le ^x	LeX
235	GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β -sp3	A _{tri}	Atri
236	GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β -sp5	A _{tri}	Atri-C8
237	GalNH α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β -OCH ₂ CH ₂ CH ₂ NHAc		ABtri
238	GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β -sp3		GA2
239	GalNAc β 1-3(Fuc α 1-2)Gal β -sp3		Fa2(ANb3)A
240	(Glc α 1-4) ₃ β -sp4	maltotriose	(Ga4)3b
241	(Glc α 1-6) ₃ β -sp4	isomaltotriose	(Ga6)3b
242	GlcNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp2		GNa3'LN-C2
243	GlcNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp3		GNa3'LN
244	GlcNPro α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β -sp3		GN(Pro)a3(Fa2)Ab
245	GlcNAc α 1-6Gal β 1-4GlcNAc β -sp2		GNa6'LN
246	GlcNAc β 1-2Gal β 1-3GalNAc α -sp3		GN2'TF
247	GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GalNAc α -sp3		GN3'TF
248	GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β -sp2		GN3'Lac
249	GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp2		GN3'LN-C2
250	GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp3		GN3'LN
251	GlcNAc β 1-4Gal β 1-4GlcNAc β -sp2		GN4'LN
252	GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β -sp4	chitotriose	Ch3
253	GlcNAc β 1-6Gal β 1-4GlcNAc β -sp2		GN6'LN
254	GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3)GalNAc α -sp3	core 2	core2
255	GlcNAc β 1-6(GlcNAc β 1-3)GalNAc α -sp3	core 4	core4
256	GlcNAc β 1-6(GlcNAc β 1-4)GalNAc α -sp3		GN2-4,6Tn
257	GlcNGc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β -sp3		GN(Gc)a3(Fa2)Ab
258	Man α 1-6(Man α 1-3)Man β -sp4	Man ₃	(Ma)3b
259	Gal β 1-4(Gal β 1-3)GlcNAc β -sp3		(Ab)2-3,4GN
260	Gal β 1-3(Fuc β 1-4)GlcNAc β -sp3		bLeA
261	Gal β 1-4(Fuc β 1-3)GlcNAc β -sp3		bLeX

262	Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal β -sp4		Tbb-A
263	(GalNAc β -PEG ₂) ₃ - β -DD		ANb-cluster
264	Gal β 1-4Gal β 1-4GlcNAc β -sp3		Ab4'LN
265	Gal β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp3		Ab3'LN
266	Gal α 1-4Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	P ₁	P1
267	GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GlcNAc β -sp3		GlcNAc3'Le ^c
268	GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-6)GlcNAc β -sp3		Fa6Ch2
269	Gal β 1-3Gal β 1-4Glc β -sp4		Gal3Lac
270	Gal β 1-4Gal β 1-4Glc β -sp4		Gal4Lac
271	Gal β 1-6Gal β 1-4Glc β -sp4		Gal6Lac
272	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β -sp4-Cit		3'SL-Cit
273	Fuc β 1-2Gal β 1-4GlcNAc β -sp3		Fb2LN
274	GalNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	linear A	ANa3'LN
275	GalNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp3		ANb3'LN
276	GlcNAc β 1-4Gal β 1-4GlcNAc β -sp3		GN4'LN-C3
277	GalN(Gc) α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β -sp3		NGcAtri
278	GalNAc α 1-3GalNAc β 1-3Gal β -sp3	Fs-3	Fs-3
279	Gal β 1-3GlcNAc α 1-3GalNAc α -sp3		LeCa3Tn
280	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3GalNAc α -sp3		LeC3Tn
281	Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc β -sp3	H type4	Fuca2Galb3GalNAcb-C3
282	Galb1-3Galb1-4GlcNAcb-sp3		Ab3'LN
283	GlcNAc α 1-4Gal β 1-4GlcNAc β -sp3		GN4LN
287	3-O-Su-Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β -sp3	3'-O-Su-Le ^a	3'SuLeA
288	3-O-Su-Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β -sp3	3'-O-Su-Le ^x	3'SuLeX
289	Neu5Ac α 2-6(Gal β 1-3)GalNAc α -sp3		6SiaTF
290	Neu5Ac α 2-6(Gal α 1-3)GalNAc α -sp3		A3a(Sia)Tn
291	Neu5Ac β 2-6(Gal β 1-3)GalNAc α -sp3		b6SiaTF
292	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc α -sp3		Sia3'TF

293	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β -sp3	3'SL	3'SL
294	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β -sp4	3'SL	3'SL-Gly
295	Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4Glc β -sp2	6'SL	6'SL-C2
296	Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4Glc β -sp4	6'SL	6'SL-Gly
297	Neu5Ac β 2-6Gal β 1-4Glc β -sp2		b6'SL
298	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	3'SLN	3'SLN
299	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β -sp3	3'SiaLeC	3'SiaLeC
300	Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	6'SLN	6'SLN
301	Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β -sp8		6'SLN-PEG
302	Neu5Ac β 2-6Gal β 1-4GlcNAc β -sp3		b6'SLN
303	Neu5Gc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp3		3'SLN(Gc)
304	Neu5Gc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β -sp3		6'SLN(Gc)
305	Neu5Gc β 2-6Gal β 1-4GlcNAc β -sp3		b6'SLN(Gc)
306	9-Nac-Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β -sp3		9Nac-6'SLN
307	KDN α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β -sp2		KDN-LeC
308	KDN α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp2		KDN-LN
309	Neu5Ac α 2-6(Neu5Ac α 2-3)GalNAc α -sp3		Sia2-3,6Tn
310	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β -O(CH ₂) ₃ NH-amide-Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp3		(3'SLN) ₂
313	4-O-Su-Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp3		3'SLN4"Su
314	9-O-Su-Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp3		3'SLN9"Su
315	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4-(6-O-Su)GlcNAc β -sp3		3'SLN6Su
316	Fuc α 1-2(6-O-Su)Gal β 1-4GlcNAc β -sp3		6'SuHtype2
317	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3-(6-O-Su)GalNAc α -sp3		3'SiaTF6Su
318	Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4(6-O-Su)GlcNAc β -sp3		6'SLN6Su
319	Neu5Ac α 2-3(6-O-Su)Gal β 1-4GlcNAc β -sp3		3'SLN6'Su
320	4-O-Su-Neu5Ac α 2-3(6-O-Su)Gal β 1-4GlcNAc β -sp3		3'SLN6',4"Su ₂
321	(Neu5Ac α 2-8) ₃ -sp3	(Sia) ₃	(Sia) ₃
322	(Neu5Ac α 2-8) ₃ β -sp3		(Sia) ₃ b

323	Neu5Ac α 2-6Gal β 1-3GlcNAc β -sp3	6'-SiaLe ^c	6'SiaLeC
324	Neu5Ac α 2-6Gal β 1-3(6-O-Su)GlcNAc β -sp3		6'SiaLeC6Su
325	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β -sp4-Ala		3'SL-Ala
326	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β -sp4-Ile		3'SL-Ile
327	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β -sp4-Nle		3'SL-Nle
328	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β -sp4-Phe		3'SL-Phe
329	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β -sp4-Trp		3'SL-Trp
330	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β -sp4-Val		3'SL-Val
331	Neu5Gc α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β -sp3		3'SiaLeC(Gc)
332	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β -sp4-Asn		3'SL-Asn
333	Neu5Gc α 2-3Gal β 1-3(6-O-Su)GlcNAc β -sp3		3'SiaLeC(Gc)6Su
334	Neu5Gc α 2-3Gal β 1-4(6-O-Su)GlcNAc β -sp3		3'SLN(Gc)6Su
335	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3(6-O-Su)GlcNAc β -sp3		3'SiaLeC6Su
336	α Kdo-(2 $\rightarrow$ 8)- α Kdo-(2 $\rightarrow$ 4)- α Kdo-sp11		A128
337	GalNAc α 1-4Gal β 1-4GlcNAc β -sp3		ANa4'LN
338	Neu5Ac α 2-6Gal β 1-3GalNAc α -sp3	6'-sialyl-TF	6'SiaTF
339	Neu5Ac β 2-6Gal β 1-3GalNAc α -sp3		6'bSiaTF
340	Gal α 1-3(Neu5Ac β 2-6)GalNAc β -sp3		b6SiaTab
341	Neu5Ac α 2-3-(6-O-Su)Gal β 1-4GlcNAc β -sp2		6'Su3'SLN
342	Neu5Ac α 2-3(6-O-Su)Gal β 1-3GalNAc α -sp3		6'Su3'SiaTF
343	Neu5Gc α 2-3Gal β 1-4Glc β -sp2		3'SL(Gc)
344	Neu5Ac β 2-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp3		b3'SLN
345	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3(6-O-Su)GalNAc α -sp3		6Su3'SiaTF
346	Neu5Ac α 2-3-(6-O-Su)Gal β 1-4(6-O-Su)GlcNAc β -sp3	6,6'Su2-3'SLN	Neu5Ac3'(6,6'-su2)LN-C3
347	Gal β 1-4(Neu5Ac α 2-6)GlcNAc β -sp2		6SLN
348	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc α -sp3		3'SLa
349	Neu5Ac α 2-3(Neu5Ac α 2-2)Gal β -sp3		Sia2-2,3A
350	Neu5Gc α 2-3Gal β 1-4Glc β -sp3		3'SL(Gc)

351	KDN α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β -sp3		KDN6'LN-C3
352	KDN β 2-6Gal β 1-4GlcNAc β -sp3		KDNb6'LN-C3
353	KDN α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp3		KDN3'LN-C3
354	KDN β 2-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp3		KDNb3'LN-C3
355	GalNPro α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β -sp3		AN(Pro)a3(Fa2)Ab
359	Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GlcNAc β -sp3	B (type 1)	Btype1
360	Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	B (type 2)	Btype2
361	Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GlcNAc β -sp2	B (type 2)	Btype2-C2
362	Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GalNAc α -sp3	B (type 3)	Btype3
363	Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GalNAc β -sp3	B (type 4)	Btype4
364	Gal α 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β -sp3	α GalLe ^x	aGalLeX
365	Gal α 1-4(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GlcNAc β -sp3		Aa4'(Fa2')LN
366	GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GlcNAc β -sp3	A (type 1)	Atype1
367	GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GlcNAc β -sp2		Atype2-C2
368	GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	A (type 2)	Atype2
369	GalNAc α 1-4(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GlcNAc β -sp3		ANa4'(Fa2')LN
370	GalNAc β 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GlcNAc β -sp3		ANb3'(Fa2')LN
371	Fuc α 1-2Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β -sp3	Le ^b	LeB
372	Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β -sp3	Le ^y	LeY
373	Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β -sp3	Galili (tetra)	Galili4
374	Gal α 1-3(Gal α 1-4)Gal β 1-4GlcNAc β -sp3		Aa2-3',4'LN
375	Gal α 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp3		aLN3'LN
376	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β -sp4	N-acetyllacto-N-tetraose, LNT	LNT
377	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GlcNAc β -sp2		LeCb3'LeC
378	Gal β 1-3GlcNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp3		LeCa3'LN
379	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp3		LeCb3'LN
380	Gal β 1-3GlcNAc α 1-6Gal β 1-4GlcNAc β -sp2		LeCa6'LN
381	Gal β 1-3GlcNAc β 1-6Gal β 1-4GlcNAc β -sp2		LeCb6'LN
382	Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β -sp3	GA1, asialo-GM1	aGM1

383	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β -sp4	N-acetyllacto-neo-tetraose, LNnT	LNnT
384	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp2	i	LNb3'LN-C2
385	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	LN3LN-C3; i	LNb3'LN
386	Gal β 1-4GlcNAc α 1-6Gal β 1-4GlcNAc β -sp2		LNa6'LN
387	Gal β 1-4GlcNAc β 1-6Gal β 1-4GlcNAc β -sp2		LNb6'LN
388	Gal β 1-4GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3)GalNAc α -sp3		LNb6TF
389	GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β -sp3	Gb4, P	Gb4
390	(Glc α 1-4) ₄ β -sp4	maltotetraose	(Ga4)4b
392	GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GalNAc α -sp3	A (type 3)	A(type 3)
394	GlcNAc β 1-4(GlcNAc β 1-3)Gal β 1-4GlcNAc β -sp2		GN2-3',4'LN
395	GlcNAc β 1-6(GlcNAc β 1-3)Gal β 1-4GlcNAc β -sp2	T _k	Tk
396	(GlcNAc β 1) ₃ -3,4,6-GalNAc α -sp3		GN3-3,4,6Tn
397	Gal β 1-3GlcN(Fm) β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp3		LeC(Fm)b3'LN
398	Gal β 1-3GlcN(Fm) β 1-3Gal β 1-3GlcNAc β -sp3		LeC(Fm)3'LeC
399	Gal β 1-3GlcNAc α 1-3Gal β 1-3GlcNAc β -sp2		LeCa3LeC-C2
400	Gal β 1-3GlcNAc α 1-3Gal β 1-3GlcNAc β -sp3		LeCa3'LeC-C3
401	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GlcNAc β -sp3		Le ^C 3Le ^C
402	GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal α 1-4GlcNAc β -sp3		Atria4GN
403	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp2		LeC3'LN
404	GalNAc α 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β -sp3	α GalNAcLe ^x	ANaLeX
405	Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal α 1-4GlcNAc β -sp3		Btria4GN
406	GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal α 1-3GalNAc β -sp3		Atria3AN
407	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc α -sp4	LNnT α	LNnTa
408	GlcNAc β 1-4(GlcNAc β 1-3)Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	GlcNAc _{2-3,4} LacNAc	GN2-3',4'LN-C3
409	GlcNAc β 1-3(GlcNAc α 1-6)Gal β 1-4GlcNAc β -sp2		GN3'(GNa6')LN
410	Gal β 1-3GlcNAc α 1-3Gal β 1-3GlcNAc β -sp3		LeCa3'LeC
411	Gal β 1-4GlcNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	LNa3'LN	LNa3'LN-C3
412	Glc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GlcNAc β -sp3		glucoBtype2
413	GalNH ₂ α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GlcNAc β -OMe		ABtetra-bOMe

419	3-O-SuGal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp3		(3'SuLN)3'LN
420	4-O-SuGal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp3		(4'SuLN)3'LN
421	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc α -sp4	LNTa	Le ^c 3'Lac□-Gly
422	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β -sp3		3'SLNb3A
423	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β -sp3	SiaLe ^x	SiaLeX
425	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4(Fuc β 1-3)GlcNAc β -sp3		bF-SiaLeX
426	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β -sp3	SiaLe ^a	SiaLeA
427	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β -sp4		SiaLeA-Gly
428	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)(6-O-Su)GlcNAc β -sp3	6-O-Su-SiaLe ^x	SiaLeX6Su
429	Neu5Ac α 2-3(6-O-Su)Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β -sp3	6'-O-Su-SiaLe ^x	SiaLeX6'Su
430	(4-O-Su)Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β -sp3		SiaLeX4"Su
431	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4(2-O-Su-Fuc α 1-3)GlcNAc β -sp3		SiaLeX2"Su
432	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4(3-O-Su-Fuc α 1-3)GlcNAc β -sp3		SiaLeX3"Su
433	Neu5Ac α 2-6(Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3)GalNAc α -sp3		Sia2-3',6TF
434	Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β -sp4	GD3	GD3
435	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4(2-O-Su-Fuc α 1-3)(6-O-Su)GlcNAc β -sp3		SiaLeX6,2"Su2
436	4-O-Su-Neu5Ac α 2-3(6-O-Su)Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β -sp3		SiaLeX6,4"Su2
437	GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GalNAc β -sp3	A(type 4)	A(type 4)
438	Fuc β 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β -sp3		LeYbF
439	Kdo α 2-4Kdo α 2-4Kdo α 2-6GlcNAc β -sp11		A247
440	Neu5Ac β 2-6(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GlcNAc β -sp3		bSia6Htype2
441	Neu5Ac α 2-6(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GlcNAc β -sp3		Sia6Htype2
442	Neu5Ac α 2-3(GalNAc β 1-4)Gal β 1-4Glc β -sp4	GM2	GM2
479	Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β -sp4	LNFP I	Htype1Lac
480	Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp2	H(type 1) penta	Htype1LN
481	Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β -sp4	Galili (penta)	Galili5
482	Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β -sp3	BLe ^b	BLeB
483	Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β -sp3	BLe ^y	BLeY
484	GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β -sp3	ALe ^b	ALeB

485	Gal β 1-4GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GlcNAc β -sp3		Ab4ANa3'(Fa2')LN
486	Gal β 1-4GalNAc β 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GlcNAc β -sp3		Ab4ANb3'(Fa2')LN
488	Gal β 1-4GlcNAc β 1-6(Gal β 1-4GlcNAc β 1-3)GalNAc α -sp3		LN2-3,6Tn
489	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3(GlcNAc β 1-6)Gal β 1-4GlcNAc β -sp2		LN3'(GN6')LN
490	Gal β 1-4GlcNAc β 1-6(GlcNAc β 1-3)Gal β 1-4GlcNAc β -sp2		LN6'(GN3')LN
491	GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β -sp3	ALe ^y	ALeY
492	(Glc α 1-6) ₅ β -sp4	isomaltopentaose	(Ga6)5b
493	(GlcNAc β 1-4) ₅ β -sp4	chitopentaose	Ch5
495	Man α 1-6(Man α 1-3)Man α 1-6(Man α 1-3)Man β -sp4	Man ₅	(Ma)5b
496	Fuc α 1-2Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β -sp4		LeBLac
497	Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β -sp4		LeYLac
498	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	(LN) ₃	(LNb3')3
499	Gal β 1-4GlcNAc β 1-6(Gal β 1-4GlcNAc β 1-3)Gal β 1-4GlcNAc β -sp2	I	LN2-3',6'LN
501	Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β -sp4	Gb5	Gb5
502	(Glc α 1-6) ₆ β -sp4	maltohexaose	(Ga6)6b
503	(GlcNAc β 1-4) ₆ -sp4	chitohexaose	Ch6
504	(A β 1-4GN β 1-2M α 1) _{2-3,6} -M β 1-4GN β 1-4GN β -sp4		9-OS
505	(GN β 1-2M α 1) _{2-3,6} -M β 1-4GN β 1-4GN β -sp4		7-OS
506	Ara β 1-2Ara α 1-5(Ara β 1-2Ara α 1-3)Ara α 1-5Ara α -O(CH ₂) ₂ NHCOCH ₂ (OCH ₂ CH ₂) ₆ NH ₂		Araf6
507	GalNAc α 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β -sp2	Fs-5	Fs-5
508	GalNAc β 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β -sp3		ALeYb
509	Gal β 1-3GalNAc β 1-4(Neu5Ac α 2-3)Gal β 1-4Glc β -sp4	GM1	GM1
510	Man α 1-6(Man α 1-3)Man α 1-6(Man α 1-3)Man α -sp4		Man5a
511	GalNAc α 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β -sp4	Fs-5-Gly	Fs-5-Gly
512	GalNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	ANa3'LN3'LN	GalNAca3'LN3'LN-C3
513	Glc α 1-4Glc α 1-4Glc α 1-4Glc α 1-4Glc α 1-4Glc β -sp4	maltohexaose	(Ga4)6b
514	GalNAc α 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β -sp3	Fs-5	Fs-5

527	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp2		3'SLN-LN
528	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β -sp3		SiaLeX3A
529	Neu5Ac α 2-6(Gal β 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β -sp4	LSTb	LSTb
530	(Neu5Ac α 2-3Gal β 1) ₂ -3,4-GlcNAc β -sp3		(Sia3A)2-3,4GN
531	Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-3(GalNAc β 1-4)Gal β 1-4Glc β -sp2	GD2	GD2
532	Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β -sp2		GT3
533	(Neu5Ac α 2-8) ₂ Neu5Ac α 2-3(GalNAc β 1-4)Gal β 1-4Glc β -sp2		GT2
534	Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp3		6'SLN-LN
535	Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-3(GalNAc β 1-4)Gal β 1-4Glc β -sp4	GD2	GD2-Gly
536	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β -sp4	LSTa	LSTa
537	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β -sp4	LSTd	LSTd
538	Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3GlcNAc β 1-3)Gal β 1-4Glc β -sp4	MFLNH III	MFLNH III
539	Gal β 1-4GlcNAc β 1-6(Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-3)Gal β 1-4Glc β -sp4	MFLNH I	MFLNH I
540	Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-6(Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-3)Gal β 1-4Glc β -sp4	MSMFLNnH	MSMFLNnH
541	Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-6(Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-3)Gal β 1-4Glc β -sp4	DFLNH (a)	DFLNH (a)
542	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3GlcNAc β 1-3)Gal β 1-4Glc β -sp4	MF(1-3)iLNO	MF(1-3)iLNO
543	Fuc α 1-2Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-3[Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-6]Gal β 1-4Glc β -sp4	TFLNH	TFLNH
545	Kdo α 2-8Kdo α 2-4Kdo α 2GlcNAc β 1-6GlcNAc α -sp11		A218
546	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc α -sp4	LSTd α	LSTda
547	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc α -sp4	LSTa	LSTaa
548	Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp2	Sia6'LN-LN	6'SLN-LN-C2
549	Gal β 1-3GalNAc β 1-4(Neu5Ac α 2-3)Gal β 1-4Glc β -sp3	GM1-C3	Galb3GalNAcb4'(Neu5Aca3')Lac-C3
550	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc β 1-4(Neu5Ac α 2-3)Gal β 1-4Glc β -sp3	GD1a, sp3	GD1a, sp3

551	Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β -sp3	Globo-H, sp3	Globo-H, sp3
552	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β -sp3	SSEA-4 hexaose, sp3	SSEA-4 hexaose, sp3
553	Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-3(Gal β 1-3GalNAc β 1-4)Gal β 1-4Glc β -sp3		GD1b
554	Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-3(Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc β 1-4)Gal β 1-4Glc β -sp3		GT1b
555	Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-3(GalNAc β 1-4)Gal β 1-4Glc β -sp3	GD2	GD2
625	(GlcA β 1-3GlcNAc β 1-4) ₁₁₋₁₂ -NH ₂ -ol	hyaluronic acid	HyalU(11-12)-ol
626	(Sia2-6A-GN-M) _{2-3,6} -M-GN-GN-NH ₂ -ol		11-OS-ol
627	(Sia α 2-6A β 1-4GN β 1-2M α 1)2-3,6-M β 1-4GN β 1-4GN β -sp4	YDS	11-OS
628	(Sia2-3A-GN-M) _{2-3,6} -M-GN-GN β -sp4		11-OS(a2-3)
629	Trehalose-ethanolamine		Treh
630	(GlcA β 1-3GlcNAc β 1-4) ₂₀ -NH(<i>p</i> -C ₆ H ₄)CH ₂ CH ₂ NH ₂	hyaluronic acid	HyalU20-ol
631	(GlcA β 1-3GlcNAc β 1-4) ₃₈ -NH(<i>p</i> -C ₆ H ₄)CH ₂ CH ₂ NH ₂	hyaluronic acid	HyalU38-ol
632	(GlcA β 1-3GlcNAc β 1-4) ₁₃ -NH(<i>p</i> -C ₆ H ₄)CH ₂ CH ₂ NH ₂	hyaluronic acid	HyalU13-ol
633	(Neu5Ac α 2-8) _n -NH(<i>p</i> -C ₆ H ₄)CH ₂ CH ₂ NH ₂	colominic acid	(Neu5Ac α 2-8) _n -sp6
800	GlcNAc α 1-4GlcNAc β -sp3		GN α 4GN
801	GalNAc α 1-3GalNAc(fur) β -sp3		Fs(f)-2
802	Gal β 1-3GalNAc(fur) β -sp3		Tbb(f)
804	[Gal β 1-4GlcNAc β -OCH ₂ CH ₂] ₂ NH		LN_dimer
805	GalNAc β 1-4(6-O-Bn)GlcNAc β -sp3		6Bn-LacdiNAc
806	Gal α 1-6Glc α -sp3		Aa6Ga
807	GlcNAc β 1-4GlcNAc α -sp4		Ch2a
808	Gal α 1-6Glc β -sp3	melibiose	Aa6G-C3
809	GalNAc β 1-3GalNAc α -sp3		ANb3ANa
810	GalNGc α 1-3GalNAc α -sp3		core5Gc
811	3,6-O-Me ₂ -Glc β 1-4(2,3-O-Me ₂)Rha β -O(<i>p</i> -C ₆ H ₄)-OCH ₂ CH ₂ NH ₂		KN05097
812	Gal β 1-4Glc α -sp4		Laca
813	Gal β 1-3GalNGc α -sp3		TFGc
814	Man α 1-6Man α -sp4		Ma6Ma
815	Gal α 1-4GalNAc α -sp3		Aa4ANa

816	Gal β 1-4GalNAc α -sp3		Ab4ANa
817	GalNAc β 1-4GalNAc α -sp3		ANb4ANa
818	GalNAc α 1-4GalNAc α -sp3		ANa4ANa
819	Glc β 1-4GalNAc α -sp3		G4ANa
820	GlcNAc β 1-4GalNAc α -sp3		GN4ANa
821	Gal α 1-4Gal β -sp3	Aa4A	Gala4Gal-C3
822	GalNAc α 1-4Gal β -sp3	ANa4A	GalNAcaGal-C3
823	GalNAc β 1-4Gal β -sp3	ANb4A	GalNAcbGal-C3
824	Gal β 1-4Gal β -sp3	Ab4A	Galb4Gal-C3
825	Glc β 1-3GlcNAc β -sp3	Gb3GN	Glc3GlcNAc-C3
826	Glc β 1-3GalNAc α -sp3	Gb3Tn	Glc3GalNAca-C3
827	Glc β 1-3GalNAc β -sp3	Gb3ANb	Glc3GalNAcb-C3
828	GlcNAc β 1-2Gal β -sp3		GNb2A
829	GlcNAc β 1-4Gal β -sp3		GNb4A
830	Glc α 1-4GalNAc α -sp3		Ga4Tn
831	Gal β 1-4Glc β -sp3		Lac-C3
832	Gal β 1-4Glc β -sp4-Leu		Lac-Leu
833	Gal β 1-4Glc β -sp4-Leu-Leu		Lac-Leu-Leu
834	Gal β 1-4Glc β -sp4-Leu-Tyr		Lac-Leu-Tyr
835	Gal β 1-4Glc β -sp4-Leu-Phe		Lac-Leu-Phe
836	GlcNAc α 1-3Gal β -sp3		GNa3A
837	Glc β 1-3Gal β -sp3		Ab3A
838	Glc β 1-6Gal β -sp3		Gb6A
839	GlcNAc β 1-3Gal β -sp3		GNb3A
840	Gal β 1-4Glc α -sp3		Laca
841	Gal α 1-4Glc β -sp3		aLac
842	Gal α 1-4Glc α -sp3		Aa4G
843	Gal β 1-3GlcNAc α -sp3		LeCa
844	Xyl β 1-2Man α -sp3	Xylb2Mana	Xylb2Mana-C3
845	Xyl β 1-2Man β -sp3	Xylb2Manb	Xylb2Manb-C3

846	Neu5Ac β 2-3GalNAc α -sp3		Neu5Ac β 3GalNAc α -C3
847	Gal β 1-4Glc β -sp4-Leu-Pro		Lac-Leu-Pro
848	Gal β 1-4Glc β -sp4-Leu-Glu		Lac-Leu-Glu
849	Gal β 1-3GalNAc α -Ser	TF, core 1	TF
850	Gal β 1-3(6-O-Su)GalNAc α -sp3	6-suTF	6SuTF
851	Gal α 1-3(6-O-Su)GalNAc α -sp3		6SuTaa
852	GlcNAc β 1-4-[HOOC(CH ₃)CH]-3-O-GlcNAc α -sp4		GN-aMur
853	6-Su-O-Gal α 1-3GalNAc α -sp3		6'SuTaa
854	Neu5Ac α 2-3(6-O-Su)Gal β -sp3		Sia3A6Su
855	Формула скрыта		MaltSu7
856	Δ GlcA β 1-6Gal β -sp3		deltaGUb6A
857	Neu5Ac α 2-8Neu5Ac β -sp3		(Sia)2b-C3
858	Gal β 1-4(6-O-Su)Glc β -sp3		Lac6Su-C3
1001	<i>Salmonella enterica</i> O28-deAc		<i>S. enterica</i> O28deAc
1001	-4Qui3NA1-3Rha α 1-4Gal β 1-3(Glc β 1-4)GalNA1-	<i>Salmonella enterica</i> O28-deAc	<i>S. enterica</i> O28deAc
1002	-2Rib-ol5-P-6Gal α 1-3FucNAma1-3GlcN β 1-	<i>Salmonella enterica</i> O47-deAc	<i>S. enterica</i> O47deAc
1003	-4(Fuca1-3)GalNA1-6ManNA1-3Fuca1-3(Glc β 1-4)Gal β 1-	<i>Salmonella enterica</i> O16-deAc	<i>S. enterica</i> O16deAc
1004	-2Fuca1-2Gal β 1-3GalNAc α 1-3GlcNAc α 1-	<i>Salmonella enterica</i> O13	<i>S. enterica</i> O13
1005	-4Qui3NAc α 1-3Rha α 1-4Gal β 1-3(Glc β 1-4)GalNAc α 1-	<i>Salmonella enterica</i> O28	<i>S. enterica</i> O28
1006	-4(Fuca1-3)GalNAc α 1-6Man2(20%)Ac3(40%)Ac4(20%)Ac α 1-3Fuca1-3(Glc β 1-4)Gal β 1-	<i>Salmonella enterica</i> O16	<i>S. enterica</i> O16
1007	-2(Galf(80%)Ac α 1-4)Gal α 1-3ManNAc β 1-6Galf β 1-3GlcNAc β 1-	<i>Salmonella enterica</i> O17	<i>S. enterica</i> O17
1008	-3Galf2(30%)Ac β 1-3Gal α 1-	<i>Salmonella enterica</i> O67	<i>S. enterica</i> O67
1009	-3(S-3HOBu1-2Ala1-4)Qui4N β 1-6GlcNAc α 1-3QuiNAc α 1-3GlcNAc α 1-	<i>Salmonella enterica</i> O58	<i>S. enterica</i> O58
1010	-2Man β 1-4Glc α 1-3QuiNAc α 1-3GlcNAc α 1-	<i>Salmonella enterica</i> O41	<i>S. enterica</i> O41
1011	-3(GalNAcA6NH ₂ α 1-2)Rha α 1-2Rha α 1-3Rha α 1-2Rha α 1-3GlcNAc β 1-	<i>Salmonella enterica</i> O62	<i>S. enterica</i> O62

1012	-2(Fuc3NF α 1-3)Man β 1-3Glc β 1-3GlcNAc β 1-	<i>Salmonella enterica</i> O60	<i>S. enterica</i> O60
1013	-4Man α 1-2Man α 1-2Man β 1-3GalNAc α 1-	<i>Salmonella enterica</i> O18	<i>S. enterica</i> O18
1014	-2Gal β 1-3GlcNAc α 1-4Rha α 1-3GlcNAc β 1-	<i>Salmonella enterica</i> O59	<i>S. enterica</i> O59
1015	-3(ManNAc β 1-2)Rha α 1-2Rha α 1-2Gal α 1-3GlcNAc β 1-	<i>Salmonella enterica</i> O42	<i>S. enterica</i> O42
1016	-2Rib β 1-4Gal β 1-4GlcNAc α 1-4Gal β 1-3GlcNAc α 1-	<i>Salmonella enterica</i> O52	<i>S. enterica</i> O52
1017	-3GlcNAc β 1-3(Man β 1-4)Gal α 1-4Rha α 1-	<i>Salmonella enterica</i> O11	<i>S. enterica</i> O11
1018	-6Glc α 1-4(GlcNAc β 1-3)Gal β 1-3GalNAc α 1-3GlcNAc β 1-	<i>Salmonella enterica</i> O51	<i>S. enterica</i> O51
1019	-2Glc α 1-6Glc α 1-4(GlcNAc β 1-3)Gal α 1-3GlcNAc β 1-	<i>Salmonella enterica</i> O44	<i>S. enterica</i> O44
1020	-7Neu5Ac α 2-3FucNAc α 1-3GlcNAc6Ac β 1-	<i>Salmonella enterica</i> O21	<i>S. enterica</i> O21
1021	-3(GlcNAc β 1-2)Rha α 1-2Rha α 1-4Glc α 1-3GalNAc β 1-	<i>Salmonella enterica</i> O57	<i>S. enterica</i> O57
1022	-3(Ser2Ac1-4)Qui4N β 1-3Rib β 1-4GalNAc α 1-3GlcNAc α 1-	<i>Salmonella enterica</i> O56	<i>S. enterica</i> O56
1023	-3(Gal β 1-4)Gal β 1-4(GlcNAc β 1-2)Glc β 1-3GalNAc β 1-	<i>Salmonella enterica</i> O38	<i>S. enterica</i> O38
1024	-3(Rha2(%))Ac3(%))Ac4(%))Ac α 1-4GalA α 1-2)Rha α 1-4Glc α 1-2Rha α 1-3GlcNAc β 1-	<i>Cronobacter sakazakii</i> G2356 O2	<i>C. sakazakii</i> G2356 O2
1025	-3FucNAc α 1-4(GlcNAc β 1-2)GalA α 1-3FucNAc α 1-3GlcNAc β 1-	<i>Cronobacter sakazakii</i> G2592 O7	<i>C. sakazakii</i> G2592 O7
1026	-2(Glc α 1-4)Glc β 1-2Fuc3NRHb β 1-6GlcNAc α 1-4GalNAc α 1-3(Glc α 1-6)GlcNAc β 1-	<i>Cronobacter sakazakii</i> G2594 O4	<i>C. sakazakii</i> G2594 O4
1027	-4Qui3NAc α 1-3Rha α 1-6GlcNAc α 1-4GlcA β 1-3(Glc β 1-4)GalNAc α 1-	<i>Cronobacter sakazakii</i> G2726 O3	<i>C. sakazakii</i> G2726 O3
1201	-4(Col α 1-3)(Col α 1-6)Glc α 1-4Gal α 1-3GlcNAc β 1-	<i>Escherichia coli</i> O11	<i>E. coli</i> O11
1202	-2Gal β 1-3FucNAc α 1-3GlcNAc β 1-	<i>Escherichia coli</i> O15	<i>E. coli</i> O15
1203	-2Man α 1-2(Glc α 1-4)Man β 1-3GlcNAc α 1-6Man α 1-	<i>Escherichia coli</i> O44	<i>E. coli</i> O44
1204	-2(S-3HOBu1-4)Qui4N α 1-4GalNAc β 1-4Rha α 1-3GlcNAc6(30%)Ac β 1-	<i>Escherichia coli</i> O49	<i>E. coli</i> O49
1205	-3(GlcNAc β 1-2)Rha α 1-2Rha α 1-4Glc α 1-3GalNAc β 1-	<i>Escherichia coli</i> O51	<i>E. coli</i> O51
1206	-3Fucf2(50%)Ac β 1-3-6dmanHep β 1-	<i>Escherichia coli</i> O52	<i>E. coli</i> O52
1207	-2-DRha4NAc α 1-3Fuc α 1-4Glc β 1-3GalNAc α 1-	<i>Escherichia coli</i> O57	<i>E. coli</i> O57
1208	-4(R-Lac2-3Rhap2Ac α 1-3)Man β 1-4Man α 1-3GalNAc β 1-	<i>Escherichia coli</i> O58	<i>E. coli</i> O58

1209	-4Qui3NAc α 1-3Rha α 1-4Gal β 1-3GalNAc α 1-	<i>Escherichia coli</i> O71	<i>E. coli</i> O71
1210	-6Man α 1-2(Glc α 1-4)Man α 1-2(Glc α 1-3)Man β 1-3GlcNAc α 1-	<i>Escherichia coli</i> O73	<i>E. coli</i> O73
1211	-2(Gal α 1-4)Gal α 1-3ManNAc β 1-6Gal β 1-3GlcNAc β 1-	<i>Escherichia coli</i> O85	<i>E. coli</i> O85
1212	-3)Fuc α 1-3Xlu β 1-	<i>Escherichia coli</i> O95	<i>E. coli</i> O95
1213	-3(Glc α 1-2)Rha α 1-2Rha α 1-2Rha α 1-3(Glc α 1-2)Rha α 1-	<i>Escherichia coli</i> O99	<i>E. coli</i> O99
1214	-4-8eLeg5Ac7Ac α 2-6Gal α 1-3FucNAc α 1-3GlcNAc α 1-	<i>Escherichia coli</i> O108	<i>E. coli</i> O108
1215	-4(GlcNAc β 1-3)GalNAc α 1-2Glc α 1-4L-IdoA α 1-3GalNAc β 1-	<i>Escherichia coli</i> O112ab	<i>E. coli</i> O112ab
1216	-3Rib-ol5-P-6Gal α 1-3FucNAc α 1-3GlcNAc β 1-	<i>Escherichia coli</i> O118	<i>E. coli</i> O118
1217	-2(RhaNAc3NFo β 1-3)Man β 1-3Gal α 1-4Rha α 1-3GlcNAc α 1-	<i>Escherichia coli</i> O119	<i>E. coli</i> O119
1218	-3(S-3HOBu1-2DAla1-4)Qui4N β 1-6GlcNAc α 1-3LQuiNAc α 1-3GlcNAc6(30%)Ac α 1-	<i>Escherichia coli</i> O123	<i>E. coli</i> O123
1219	-2(Glc α 1-3)Man α 1-3Fuc α 1-3GalNAc α 1-4(Gal β 1-3)GalNAc β 1-	<i>Escherichia coli</i> O125	<i>E. coli</i> O125
1220	-2Fuc3(65%)Ac4(35%)Ac α 1-2Gal β 1-3GalNAc α 1-3GalNAc α 1-	<i>Escherichia coli</i> O127	<i>E. coli</i> O127
1221	-3(Gro(2-P-4)GalNAc β 1-4)Gal α 1-6Glc β 1-3GalNAc β 1-	<i>Escherichia coli</i> O130	<i>E. coli</i> O130
1222	-3Rha α 1-3Rha α 1-2Glc α 1-3GlcNAc α 1-	<i>Escherichia coli</i> O148	<i>E. coli</i> O148
1223	-3(S-Lac2-4)GlcNAc β 1-2Rha α 1-2Rha α 1-3(Glc β 1-2)Rha α 1-3GlcNAc β 1-	<i>Escherichia coli</i> O150	<i>E. coli</i> O150
1224	-2Rib-ol5-P-6Gal α 1-3FucNAc α 1-3(GlcNAc β 1-4)GlcNAc β 1-	<i>Escherichia coli</i> O151	<i>E. coli</i> O151
1225	-8(D-Ala1-7)Leg5Ac α 2-4GlcA β 1-3GlcNAc β 1-	<i>Escherichia coli</i> O161	<i>E. coli</i> O161
1226	-4(Fuc α 1-3)GlcNAc6(30%)Ac α 1-4GlcA α 1-3Fuc α 1-3GlcNAc β 1-	<i>Escherichia coli</i> O168	<i>E. coli</i> O168
1227	-2Gal β 1-4Man β 1-4Gal α 1-3GlcNAc β 1-	<i>Escherichia coli</i> O40	<i>E. coli</i> O40
1228	-2)Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GalNAc α 1-3GalNAc α (1-	<i>Escherichia coli</i> O86:B7	<i>E. coli</i> O86_B7
1230	<i>Escherichia coli</i> O10a10b	<i>Escherichia coli</i> O10a10b	<i>E. coli</i> O10a10b
1231	-2Glc β 1-6GlcNAc α 1-3FucNAc α 1-3GlcNAc β 1-	<i>Escherichia coli</i> O12	<i>E. coli</i> O12
1232	Gal α 1-2Gal α 1-2(Gal β 1-4)Glc α 1-3Glc α 1-	<i>Escherichia coli</i> O14	<i>E. coli</i> O14
1233	-2Rha α 1-2Rha α 1-2Rha α 1-2Glc α 1-3GlcNAc6Ac α 1-	<i>Escherichia coli</i> O19ab	<i>E. coli</i> O19ab
1234	-4(GlcA3(22%)Ac4(37%)Ac β 1-3)(Glc β 1-2)Gal α 1-6Glc β 1-3(Glc β 1-6)GalNAc β 1-	<i>Escherichia coli</i> O27	<i>E. coli</i> O27
1235	-4(Rha α 1-2Fuc α 1-3)Man α 1-3Fuc α 1-3GlcNAc β 1-	<i>Escherichia coli</i> O36	<i>E. coli</i> O36

1236	-4(D-Gro1-P-O-3)GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc β 1-	<i>Escherichia coli</i> O37	<i>E. coli</i> O37
1237	-3(R-3HOBu1-4)Qui4N β 1-4(Gal α 1-3)Man α 1-4Rha α 1-3GlcNAc α -	<i>Escherichia coli</i> O39	<i>E. coli</i> O39
1238	-3Gal α 1-3(GlcA β 1-4)Fuc α 1-4GlcNAc β 1-3Fuc α 1-3GlcNAc β 1-	<i>Escherichia coli</i> O41	<i>E. coli</i> O41
1239	-4GalA α 1-2Rha α 1-2Ribf β 1-4Gal β 1-3GlcNAc β 1-	<i>Escherichia coli</i> O54	<i>E. coli</i> O54
1240	-5(Glc α 1-2)Galf β 1-5(Glc α 1-2)Galf β 1-3Galf β 1-	<i>Escherichia coli</i> O62	<i>E. coli</i> O62
1241	-6GalNAc β 1-4(DGro1-P-3)GalNAc β 1-4(Gal α 1-6)Glc β 1-3GalNAc β 1-	<i>Escherichia coli</i> O81	<i>E. coli</i> O81
1242	-4GlcA β 1-4(GlcNAc β 1-2)GlcA β 1-3GlcNAc α 1-	<i>Escherichia coli</i> O30	<i>E. coli</i> O30
1243	-4(Rha α 1-2Fuc α 1-3)Man α 1-3Fuc α 1-3GlcNAc β 1-	<i>Escherichia coli</i> O36	<i>E. coli</i> O36
1244	-4(DGro1-P-3)GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc β 1-	<i>Escherichia coli</i> O37	<i>E. coli</i> O37
1245	-2Gal β 1-4Man β 1-4Gal α 1-3GlcNAc β 1-	<i>Escherichia coli</i> O40	<i>E. coli</i> O40
1246	-4(D-aThr3(70%)Ac2-6)GlcA β 1-6Gal β 1-6Glc β 1-3GalNAc6(15%)Ac β 1-	<i>Escherichia coli</i> O46	<i>E. coli</i> O46
1247	-6(Rha α 1-3)Man α 1-2(Glc α 1-3)Man α 1-2Man α 1-2Man β 1-3GlcNAc α 1-	<i>Escherichia coli</i> O68	<i>E. coli</i> O68
1248	GlcNAc α 1-2Glc α 1-2Glc α 1-3(Gal α 1-6)Glc α 1-/inner core-lipid A/	<i>Escherichia coli</i> O100	<i>E. coli</i> O100
1249	-4(Rha α 1-4GalNAc β 1-3)Gal α 1-6Glc β 1-3GalNAc β 1-	<i>Escherichia coli</i> O102	<i>E. coli</i> O102
1250	-3(Rha α 1-4)GlcA α 1-2Rha α 1-2Rha α 1-2Gal α 1-3GalNAc β 1-	<i>Escherichia coli</i> O120	<i>E. coli</i> O120
1251	-2Rha α 1-2Rha α 1-3Rha2Ac α 1-3(Glc α 1-6)GlcNAc β 1-	<i>Escherichia coli</i> O135	<i>E. coli</i> O135
1252	-3(Galf α 1-2Rha α 1-4)Gal β 1-4Glc α 1-4GlcA α 1-3GalNAc β 1-	<i>Escherichia coli</i> O140	<i>E. coli</i> O140
1253	-2Ribf β 1-4Gal β 1-4GlcNAc α 1-4Gal β 1-3GlcNAc α 1-	<i>Escherichia coli</i> O153	<i>E. coli</i> O153
1254	-2(ManNAc α 1-3)Rha α 1-3Rha α 1-3Rha α 1-3GalNAc α 1-	<i>Escherichia coli</i> O154	<i>E. coli</i> O154
1255	-2Rha4NAc α 1-3Fuc α 1-4Glc β 1-3GalNAc α 1-	<i>Escherichia coli</i> O157	<i>E. coli</i> O157
1256	-4(Rha α 1-3)(Glc α 1-6)Glc α 1-3GalNAc α 1-3GalNAc β 1-	<i>Escherichia coli</i> O158	<i>E. coli</i> O158
1257	-2Man β 1-4GlcA β 1-3LQuiNAc α 1-3GlcNAc α 1-	<i>Escherichia coli</i> O163	<i>E. coli</i> O163
1258	-4ManNAc3NAcA β 1-2Rha α 1-3Rha β 1-4GlcNAc α 1-	<i>Escherichia coli</i> O180	<i>E. coli</i> O180
1259	-2(D6dTal α 1-3)Fuc β 1-P-4Glc α 1-3Fuc α 1-3GlcNAc β 1-	<i>Escherichia coli</i> O84-deAc	<i>E. coli</i> O84deAc
1301	-3(Qui3NFoc α 1-4)GalA6NH2 α 1-4GalNAc α 1-4Gal α 1-3GalNAc β 1-	<i>Providencia alcalifaciens</i> O3	<i>P. alcalifaciens</i> O3

1302	<i>Providencia alcalifaciens</i> O3_2 capsular polysaccharide	<i>Providencia alcalifaciens</i> O3_2 capsular polysaccharide	<i>P. alcalifaciens</i> O3 CPS
1303	-4GlcNAc β 1-3GlcA α 1-4GlcNAc α 1-3Rha2Ac β 1-	<i>Providencia alcalifaciens</i> O7	<i>P. alcalifaciens</i> O7
1304	-2Glc β 1-6Gal α 1-6GalNAc α 1-4(Glc β 1-3)GalNAc α 1-3GalNAc α 1-	<i>Providencia alcalifaciens</i> O9	<i>P. alcalifaciens</i> O9
1305	<i>Providencia rustigianii</i> O11 capsular polysaccharide	<i>Providencia rustigianii</i> O11 capsular polysaccharide	<i>P. rustigianii</i> O11 CPS
1306	-4(GlcNAc β 1-2Glc β 1-2)(GlcNAc β 1-3)Gal β 1-3GalNAc α 1-4Gal β 1-3GalNAc β 1-	<i>Providencia alcalifaciens</i> O12	<i>P. alcalifaciens</i> O12
1307	-4(D-GroA1NH2(2-P-3))GalNAc β 1-4Gal β 1-3FucNAc4N β 1-	<i>Providencia alcalifaciens</i> O22	<i>P. alcalifaciens</i> O22
1308	-3(Dhpa2-4Man β 1-4)Gal α 1-4GalNAc β 1-3GalNAc β 1-	<i>Providencia alcalifaciens</i> O31	<i>P. alcalifaciens</i> O31
1309	-4Qui3NFo β 1-3Gal α 1-3GlcA β 1-3GalNAc β 1-	<i>Providencia alcalifaciens</i> O40	<i>P. alcalifaciens</i> O40
1310	-3GlcA β 1-4(Glc α 1-3)Fuc α 1-4Fuc α 1-2Glc β 1-3GlcNAc α 1-	<i>Providencia alcalifaciens</i> O46-deAc	<i>P. alcalifaciens</i> O46deAc
1311	-3Man α 1-2Fuc α 1-2GlcA4Ac β 1-3GalNAc α 1-	<i>Providencia alcalifaciens</i> O48	<i>P. alcalifaciens</i> O48
1312	-4Glc β 1-3Gal α 1-4GalNAc β 1-4(L-Ser2-6)GlcA β 1-3GalNAc β 1-	<i>Providencia alcalifaciens</i> O60	<i>P. alcalifaciens</i> O60
1401	GalNAc α 1-4GlcNAc3NAcA β 1-3DFucNAc α 1-3QuiNAc β 1-3Rha α 1-3(Glc α 1-6)Glc β 1-3(Glc α 1-4)(L-Ala1-2)GalNAc(P-6)1-3L-gro-manHepp7Cm α 1-3(P-2)(P-4)L-gro-manHep α 1-5Kdo α	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> O1(F4)	<i>P. aeruginosa</i> O1(F4)
1402	-3Rha α 1-4LGalNAcA α 1-3QuiNAc α 1-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> O10ac(F5)	<i>P. aeruginosa</i> O10ac(F5)
1403	-2LGlc β 1-3FucNAc α 1-3DFucNAc β 1-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> O11ab	<i>P. aeruginosa</i> O11ab
1404	-2Rha α 1-3Rha α 1-4GalNAcA3Ac α 1-3QuiNAc β 1-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> O13ab	<i>P. aeruginosa</i> O13ab
1405	Rha α 1-3Rha α 1-4GalNAcA α 1-3QuiNAc β 1-3Rha α 1-3(Glc α 1-6)Glc β 1-3(Glc α 1-4)(L-Ala1-2GalNAc1-3(P-6)L-gro-manHep7Cm α 1-3(P-2)(P-4)L-gro-manHep α 1-5Kdo α	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> O13ac	<i>P. aeruginosa</i> O13ac
1406	Glc α 1-6Glc β 1-3(Rha α 1-6Glc α 1-4)GalNAc1-3(P-6)L-gro-manHep α 1-3(P-2)(P-4)L-gro-manHep α 1-5(Kdo α 2-4)Kdo α 2-6(P-4)GlcN β 1-6GlcNAc1-P	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> O14	<i>P. aeruginosa</i> O14
1407	-2Ribf β 1-3GalNAc α 1-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> O15	<i>P. aeruginosa</i> O15
1408	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> O2abc	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> O2abc	<i>P. aeruginosa</i> O2abc

1409	-4ManNAc3NAmAβ1-4LGulNAc3NAcAα1-3DFucNAc4Nβ1-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> O2ac	<i>P. aeruginosa</i> O2ac
1410	-4ManNAc3NAmAβ1-4LGulNAc3NAcAα1-3DFucNAcβ1-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> O2ac(F3)	<i>P. aeruginosa</i> O2ac(F3)
1411	-4ManNAc3NAmAβ1-4ManNAc3NAcAβ1-3DFucNAcα1-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> O2ad(F7)	<i>P. aeruginosa</i> O2ad(F7)
1412	-4LGulNAc3NAmAα1-4ManNAc3NAcAβ1-3DFucNAc4Aα1-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> O2adf	<i>P. aeruginosa</i> O2adf
1413	-2Rha3Aα1-6GlcNAcα1-4GalNAcA3Aα1-3(S-3HOBu1-4)QuiNAc4Nβ1-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> O3(Habs 3)	<i>P. aeruginosa</i> O3(Habs 3)
1414	-2Rha3Aα1-6GlcNAcα1-4GalNAcAα1-3QuiNAc4NSHbβ1-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> O3ab	<i>P. aeruginosa</i> O3ab
1415	-2Rhaα1-3FucNAcα1-3FucNAcα1-3QuiNAcα1-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> O4ab	<i>P. aeruginosa</i> O4ab
1416	-2Rhaα1-3FucNAcα1-3FucNAcα1-3DFucNAcα1-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> O4ac	<i>P. aeruginosa</i> O4ac
1417	-2Rhaα1-4GalNAcA3Aα1-4GalNFoAα1-3QuiNAcα1-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> O6(F1)	<i>P. aeruginosa</i> O6(F1)
1418	-3R-3HOBu1-7Pse4Ac5Acβ2-4DFucNAcα1-3QuiNAcβ1-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> O9ad	<i>P. aeruginosa</i> O9ad
1419	-4LGalNAcAα1-3QuiNAcα1-3Rha2Aα1-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> O10a10b	<i>P. aeruginosa</i> O10a10b
1501	<i>Proteus genomospecies</i> 5/6 O79	<i>Proteus genomospecies</i> 5/6 O79	<i>P. genomospecies</i> 5/6 O79
1502	-3GalNAcβ1-4(L6dTalα1-3)Manα1-3L6dTalα1-	<i>Aeromonas hydrophila</i> O34-deAc	<i>A. hydrophila</i> O34deAc
1503	-2Rhaα1-2Rhaα1-2Rhaα1-4GalAα1-3GlcNAcα1-	<i>Enterobacter cloacae</i> G2277	<i>E. cloacae</i> G2277
1504	-3Rhaβ1-4(Glcα1-3)Rhaα1-2Rhaα1-3Galα1-3DFucNAcα1-	<i>Enterobacter cloacae</i> G3421	<i>E. cloacae</i> G3421
1601	-3GlcAβ1-4(Galα1-3)FucNAcα1-3(EtN1-P-6)GlcNAcα1-	<i>Proteus mirabilis</i> 12B-r	<i>P. mirabilis</i> 12B-r
1602	-3(Rib1(50%)Ac-ol5-P-6)Galβ1-4(GlcNAcβ1-2)Glcβ1-3GlcNAcβ1-	<i>Proteus mirabilis</i> 1B-m	<i>P. mirabilis</i> 1B-m
1603	-2Glcβ1-3L6dTal2(85%)Aα1-3GlcNAcβ1-	<i>Proteus mirabilis</i> 3B-m	<i>P. mirabilis</i> 3B-m
1604	-4(LAltAα1-3)GalNAcα1-3GalAα1-3GlcNAcα1-	<i>Proteus mirabilis</i> HJ 4320	<i>P. mirabilis</i> HJ 4320
1605	-3(Glcα1-6)GlcNAcβ1-4(GlcNAcβ1-2)GlcAβ1-3(L-Thr2-6)GalAβ1-	<i>Proteus mirabilis</i> O11	<i>P. mirabilis</i> O11
1606	-3GlcNAcβ1-3(S,R-CetLys2-6GalAα1-4)Galα1-	<i>Proteus mirabilis</i> O13	<i>P. mirabilis</i> O13
1607	GalNAcβ1-4GalNAcα1-3GlcNAcα1-2Rib-ol	<i>Proteus mirabilis</i> O16	<i>P. mirabilis</i> O16
1608	-3GlcAβ1-4(Galα1-3)FucNAcα1-3GlcNAcα1-	<i>Proteus mirabilis</i> O23	<i>P. mirabilis</i> O23

1609	-4(Lys2-6)GalA α 1-4Gal α 1-3(Ser-(2-6)GalA4Ac α 1-3GlcNAc β 1-	<i>Proteus mirabilis</i> O28	<i>P. mirabilis</i> O28
1610	-3LQuiNAc α 1-3GlcNAc α 1-6(S-Lac-1-3)GlcNAc α 1-	<i>Proteus mirabilis</i> O31	<i>P. mirabilis</i> O31
1611	-2(Rib-ol5-P-3)Gal β 1-3GlcNAc α 1-3(EtN1-75%P-6)Glc β 1-3GlcNAc β 1-	<i>Proteus mirabilis</i> O33	<i>P. mirabilis</i> O33
1612	-2Fuc3N(R-3HOBu)4Ac β 1-6Glc3Ac α 1-4GlcA β 1-3GlcNAc α 1-	<i>Proteus mirabilis</i> O35	<i>P. mirabilis</i> O35
1613	-3(EtNAc1-P-6)GlcNAc α 1-3D-Asp2Ac4-4)Qui4N β 1-6Glc α 1-4GalA α 1-	<i>Proteus mirabilis</i> O38	<i>P. mirabilis</i> O38
1614	-6(GalA6(L-Lys) α 1-4)GalNAc β 1-4(Glc α 1-2)GlcA β 1-3GalNAc β 1-	<i>Proteus mirabilis</i> O3ab	<i>P. mirabilis</i> O3ab
1615	-4(GalA6(L-Thr)3Ac α 1-3)GalNAc β 1-3Rha β 1-4GlcNAc6Ac β 1-	<i>Proteus mirabilis</i> O58	<i>P. mirabilis</i> O58
1616	-4(GlcA α 1-3)FucNAc α 1-3GlcNAc β 1-	<i>Proteus mirabilis</i> O6	<i>P. mirabilis</i> O6
1617	-4(S,R-CetLys2-6)GlcA β 1-6GalNAc α 1-6GlcNAc β 1-3GlcNAc β 1-	<i>Proteus mirabilis</i> O60	<i>P. mirabilis</i> O60
1618	-6GlcNAc α 1-3Gal β 1-3GalNAc α 1-	<i>Proteus mirabilis</i> OE	<i>P. mirabilis</i> OE
1701	-3GlcA β 1-4(Gal α 1-3)FucNAc α 1-3GlcNAc α 1-	<i>Proteus penneri</i> 107	<i>P. penneri</i> 107
1702	-3(Glc β 1-3GlcNAc4(S-Lac) β 1-2)Rha α 1-2Rha α 1-2Gal6Ac α 1-3GlcNAc β 1-	<i>Proteus penneri</i> 113	<i>P. penneri</i> 113
1703	-4(Glc α 1-2)GlcA3Ac β 1-3GlcNAc α 1-2(R-3HOBu1-3)Fuc3N β 1-6Glc4Ac α 1-	<i>Proteus penneri</i> 17	<i>P. penneri</i> 17
1704	-6GlcNAc3(S-Lac) α 1-3LQuiNAc α 1-3GlcNAc α 1-	<i>Proteus penneri</i> 28	<i>P. penneri</i> 28
1705	-3Gal α 1-4GalNAc α 1-3FucNAc α 1-3(EtN1-P-6)GlcAc β 1-	<i>Proteus penneri</i> 31	<i>P. penneri</i> 31
1706	-6(S-Lac2-3)GlcNAc β 1-3Gal α 1-3GlcNAc6Ac β 1-	<i>Proteus penneri</i> 40	<i>P. penneri</i> 40
1707	-4(Glc α 1-3)Glc β 1-3Gal β 1-3GalNAc β 1-4Rib-ol5-P-	<i>Proteus penneri</i> 75	<i>P. penneri</i> 75
1801	-3(EtN1-P-6)GlcNAc α 1-2(R-3HOBu1-3)Fuc3N β 1-6Glc α 1-4GlcA β 1-	<i>Proteus vulgaris</i> 32/57 O17	<i>P. vulgaris</i> 32/57 O17
1802	-4(L-Ala2-6)GlcA β 1-3GalNAc β 1-4Glc β 1-3Gal α 1-4GalNAc β 1-	<i>Proteus vulgaris</i> 70/57 O44	<i>P. vulgaris</i> 70/57 O44
1803	-4GalN6Ac α 1-3DFuc2Ac α 1-3(EtN1-P-6)GlcNAc β 1-3Gal α 1-	<i>Proteus vulgaris</i> O19ab	<i>P. vulgaris</i> O19ab
1804	-3GlcNAc β 1-3(Qui3NAc2(65%)Ac4Ac α 1-2)Rha β 1-4Rha α 1-4GlcA β 1-	<i>Proteus vulgaris</i> O22	<i>P. vulgaris</i> O22
1805	-4GalNAc β 1-3GlcNAc β 1-2(R-Lac1-3Glc α 1-3)Rha α 1-2Rib β 1-	<i>Proteus vulgaris</i> O25	<i>P. vulgaris</i> O25
1806	-4GlcA β 1-3GlcNAc β 1-2(R-3HOBu1-2L-Ala1-4)Qui4N β 1-3Gal α 1-	<i>Proteus vulgaris</i> O4	<i>P. vulgaris</i> O4

1807	-4Glc6(65%)Acα1-3GlcA4Acβ1-3GlcNAcα1-3GlcA4(87%)Acβ1-	<i>Proteus vulgaris</i> O46	<i>P. vulgaris</i> O46
1808	-4Glcβ1-3GalNAcβ1-4GalNAcβ1-4Galβ1-	<i>Proteus vulgaris</i> O65	<i>P. vulgaris</i> O65
1809	-4LQuiNAcα1-3GlcNAcα1-4(LQuiNAcα1-3)GalNAcα1-4Galα1-P	<i>Proteus vulgaris</i> OX19	<i>P. vulgaris</i> OX19
1810	-4Glcβ1-3GalNAcβ1-4GalNAcβ1-4Galβ1-	<i>Proteus vulgaris</i> TG251	<i>P. vulgaris</i> TG251
2001	-3(Ribfβ1-4GlcAβ1-4)Galα1-6Manα1-2Manα1-3GalNAcβ1-	<i>Shigella boydii</i> type 10	<i>Sh. boydii</i> type 10
2002	-3GlcNAcβ1-4GlcA3Acβ1-2(Rha3Acα1-3)Manα1-4Galβ1-	<i>Shigella boydii</i> type 12	<i>Sh. boydii</i> type 12
2003	-6Galα1-4GlcAβ1-6Galβ1-4Galβ1-4GlcNAcβ1-	<i>Shigella boydii</i> type 14	<i>Sh. boydii</i> type 14
2004	-4(GlcNAcβ1-3)GalNAcα1-4Glcα1-4L-IdoAα1-3GalNAcβ1-	<i>Shigella boydii</i> type 15	<i>Sh. boydii</i> type 15
2005	-4GlcAβ1-2(Galα1-3)Man6(50%)Acβ1-4Manβ1-3GlcNAcβ1-	<i>Shigella boydii</i> type 16	<i>Sh. boydii</i> type 16
2006	-6(R-Lac2-4)Glcβ1-4GalNAcα1-3GalNAcβ1-	<i>Shigella boydii</i> type 17	<i>Sh. boydii</i> type 17
2007	-3Rhaβ1-4Rhaα1-2Rhaα1-2GalAα1-3GalNAcα1-	<i>Shigella boydii</i> type 18	<i>Sh. boydii</i> type 18
2008	-2Ribfβ1-4GalAα1-3GlcNAcα1-2(Galfβ1-3)Rhaα1-2Rhaα1-2Ribfβ1-4GalAα1-	<i>Shigella boydii</i> type 2	<i>Sh. boydii</i> type 2
2009	-3(GlcAβ1-4)Galα1-6Manα1-2Manα1-3GalNAcβ1-	<i>Shigella boydii</i> type 6	<i>Sh. boydii</i> type 6
2010	-2Galfβ1-3GlcNAcα1-8(3HOBu1-7)Pse5Ac2-6Galα1-6Glcα1-	<i>Shigella boydii</i> type 7	<i>Sh. boydii</i> type 7
2011	-3GalNAcα1-4GlcAβ1-3GlcNAcβ1-2GalAβ1-	<i>Shigella boydii</i> type 8	<i>Sh. boydii</i> type 8
2012	-4Glcα1-4GlcAβ1-3GlcNAcα1-3Rhaα1-	<i>Shigella boydii</i> type 9	<i>Sh. boydii</i> type 9
2013	<i>Shigella boydii</i> type X	<i>Shigella boydii</i> type X	<i>Sh. boydii</i> type X
2014	-2(Galfα1-4)(L-Ala2-6)Galβ1-3GlcNAcα1-2Galfβ1-5Galfβ1-3GlcNAcβ1-	<i>Shigella boydii</i> type 3	<i>S. boydii</i> type3
2015	-3Manβ1-4GlcAβ1-3GlcNAcα1-2Galβ1-4(Rhaα1-3)Man6Acβ1-	<i>Shigella boydii</i> type 5	<i>S. boydii</i> type5
2016	-4GlcA2Ac3Acα1-2(Ribfβ1-3)Rha4Acα1-3Rhaβ1-4Rhaβ1-3GlcNAc6Acβ1-	<i>Shigella boydii</i> type 11	<i>S. boydii</i> type11
2101	-3Rhaα1-3Rhaα1-2Galα1-3GlcNAcα1-	<i>Shigella dysenteriae</i> type 1	<i>Sh. dysenteriae</i> type 1
2102	-1D-Gro3-P-6Glcβ1-4(Glcα1-6Gal2(25%)Acα1-3)FucNAcα1-3GlcNAcβ1-	<i>Shigella dysenteriae</i> type 11	<i>Sh. dysenteriae</i> type 11
2103	-3(R-Lac2-4Glcβ1-6Glcα1-4)Galβ1-6Galfβ1-3GalNAcβ1-	<i>Shigella dysenteriae</i> type 3	<i>Sh. dysenteriae</i> type 3
2104	-3GlcNAcα1-3(Fuc3Ac4Acα1-4)GlcNAcα1-4GlcAα1-3Fucα1-	<i>Shigella dysenteriae</i> type 4	<i>Sh. dysenteriae</i> type 4
2105	GalNAcA3Ac6NH2α1-4GalNAcAα1-3GlcNAc	<i>Shigella dysenteriae</i> type 7	<i>Sh. dysenteriae</i> type 7

2106	-4GlcA β 1-3GalNAc β 1-3(GlcNAc β 1-4Glc β 1-4)GalNAc β 1-	<i>Shigella dysenteriae</i> type 8	<i>Sh. dysenteriae</i> type 8
2107	-2Gal3,4(RPyr) β 1-4Man β 1-4Gal α 1-3GlcNAc β 1-	<i>Shigella dysenteriae</i> type 9	<i>Sh. dysenteriae</i> type 9
2108	-4(R-Lac2-3Rha2Ac α 1-3)Man β 1-4Man α 1-3GlcNAc β 1-	<i>Shigella dysenteriae</i> type 5	<i>Sh. dysenteriae</i> type 5
2109	-3GalNAc β 1-3(Ald2-4)Gal α 1-6Glc α 1-	<i>Shigella dysenteriae</i> type 6 SR-strain	<i>Sh. dysenteriae</i> type 9
2201	-3GlcNAc β 1-2Rha α 1-2Rha α 1-3(Glc α 1-4)Rha α 1-	<i>Shigella flexneri</i> type 2a	<i>Sh. flexneri</i> type 2a
2202	-3GlcNAc β 1-2(Glc α 1-3)Rha α 1-2Rha α 1-3(Glc α 1-4)Rha α 1-	<i>Shigella flexneri</i> type 2b (F 2b1)	<i>Sh. flexneri</i> type 2b
2203	-3GlcNAc β 1-2(Glc α 1-3)Rha α 1-2Rha α 1-3Rha2Ac α 1-	<i>Shigella flexneri</i> type 3a (F 3a)	<i>Sh. flexneri</i> type 3a
2204	-2Rha α 1-2Rha α 1-3Rha2Ac α 1-3GlcNAc β 1-	<i>Shigella flexneri</i> type 3b	<i>Sh. flexneri</i> type 3b
2205	-3(Glc α 1-6)GlcNAc β 1-2Rha α 1-2Rha α 1-3Rha α 1-	<i>Shigella flexneri</i> type 4a (9725 4a)	<i>Sh. flexneri</i> type 4a
2206	-3(Glc α 1-6)GlcNAc β 1-2Rha α 1-2Rha α 1-3Rha2Ac α 1-	<i>Shigella flexneri</i> type 4b (F 4b)	<i>Sh. flexneri</i> type 4b
2207	-3GlcNAc β 1-2Rha α 1-2(Glc α 1-3)Rha α 1-3Rha α 1-	<i>Shigella flexneri</i> type 5a (M9OT 5a)	<i>Sh. flexneri</i> type 5a
2208	-3GlcNAc β 1-2(Glc α 1-3)Rha α 1-2(Glc α 1-3)Rha α 1-3Rha α 1-	<i>Shigella flexneri</i> type 5b	<i>Sh. flexneri</i> type 5b
2209	-2Rha3Ac α 1-2Rha α 1-4GalA β 1-3GalNAc β 1-	<i>Shigella flexneri</i> type 6 (5-F6 51579)	<i>Sh. flexneri</i> type 6
2210	-2Rha3(60%)Ac4(30%)Ac α 1-2Rha α 1-4GalA β 1-3GalNAc β 1-	<i>Shigella flexneri</i> type 6b	<i>Sh. flexneri</i> type 6b
2211	-3GlcNAc β 1-2(Glc α 1-3)Rha α 1-2Rha α 1-3Rha α 1-	<i>Shigella flexneri</i> type X (51580 FX)	<i>Sh. flexneri</i> type X
2212	-2Rha α 1-2Rha α 1-3Rha α 1-3GlcNAc β 1-	<i>Shigella flexneri</i> type Y	<i>Sh. flexneri</i> type Y
2213	-3Rha α 1-3(Glc α 1-4)GlcNAc β 1-2Rha α 1-2Rha α 1-	<i>Shigella flexneri</i> type 1a (2205135 1a)	<i>Sh. flexneri</i> type 1a
2214	<i>Shigella flexneri</i> type 2c	<i>Shigella flexneri</i> type 2c	<i>Sh. flexneri</i> type 2c
2215	-2(EtN1-P-3)Rha α 1-2Rha α 1-3Rha α 1-3(Glc α 1-6)GlcNAc β 1-	<i>Shigella flexneri</i> 4av (9725 4av)	<i>Sh. flexneri</i> 4av
2216	<i>Shigella flexneri</i> type 5c	<i>Shigella flexneri</i> type 5c	<i>Sh. flexneri</i> type 5c
2217	-2(Glc α 1-3)Rha α 1-2Rha α 1-3Rha α 1-3(Glc α 1-4)GlcNAc β 1-	<i>Shigella flexneri</i> type 1d	<i>Sh. flexneri</i> type 1d
2218	-2Rha α 1-2Rha α 1-3Rha α 1-3GlcNAc β 1-	<i>Shigella flexneri</i> type Y (51581 Y)	<i>Sh. flexneri</i> type Y
2219	-2Rha3(%)Ac α 1-2Rha α 1-3Rha α 1-3GlcNAc6(%)Ac β 1-	<i>Shigella flexneri</i> Y_2	<i>Sh. flexneri</i> type Y_2
2220	-2(EtN1-P-3)Rha α 1-2(EtN1-P-3)Rha α 1-3Rha α 1-3GlcNAc β 1-	<i>Shigella flexneri</i> Yv (Yv)	<i>Sh. flexneri</i> type Yv
2221	-2(Glc α 1-3)Rha α 1-2(EtN1-P-3)Rha α 1-3Rha α 1-3GlcNAc β 1-	<i>Shigella flexneri</i> Xv	<i>Sh. flexneri</i> type Xv

2222	-3Rha α 1-3(Glc α 1-4)GlcN β 1-2Rha α 1-2Rha α 1-	<i>Shigella flexneri</i> 1a-deac (1-F 1a)	<i>Sh. flexneri</i> 1a-deac
2223	-3Rha α 1-3(Glc α 1-4)GlcN β 1-2Rha α 1-2Rha α 1-	<i>Shigella flexneri</i> 1b-deac (3-F 1b)	<i>Sh. flexneri</i> 1b-deac
2224	-2(Glc α 1-3)Rha α 1-2Rha α 1-3Rha α 1-3(Glc α 1-4)GlcNAc β 1-	<i>Shigella flexneri</i> type 1d-1 (16-153 1d)	<i>Sh. flexneri</i> type 1d-1
2225	-2(Glc α 1-3)Rha α 1-2Rha α 1-3Rha α 1-3(Glc α 1-4)GlcNAc β 1-	<i>Shigella flexneri</i> type 1d-2 (18-036 1d)	<i>Sh. flexneri</i> type 1d-2
2226	-2Rha α 1-2Rha α 1-3(Glc α 1-4)Rha α 1-3GlcNAc6Ac β 1-	<i>Shigella flexneri</i> 2a ₁ (2a 07HN194)	<i>Sh. flexneri</i> 2a ₁
2227	-2Rha3Ac α 1-2Rha α 1-3(Glc α 1-4)Rha α 1-3GlcNAc6Ac β 1-	<i>Shigella flexneri</i> 2a ₂ -1 (5F 2a)	<i>Sh. flexneri</i> 2a ₂ -1
2228	-2Rha3Ac α 1-2Rha α 1-3(Glc α 1-4)Rha α 1-3GlcNAc6Ac β 1-	<i>Shigella flexneri</i> 2a ₂ -2 (2a)	<i>Sh. flexneri</i> 2a ₂ -2
2229	-3GlcNAc β 1-2Rha3Ac α 1-2(Glc α 1-3)Rha α 1-3Rha α 1-	<i>Shigella flexneri</i> type 5a ₁ (F-5a)	<i>Sh. flexneri</i> type 5a ₁
2230	-2(Glc α 1-3)Rha α 1-2(EtN1-P-3)Rha α 1-3Rha α 1-3GlcNAc β 1-	<i>Shigella flexneri</i> Xv-1 (Xv)	<i>Sh. flexneri</i> type Xv-1
2231	-2(Glc α 1-3)Rha α 1-2(EtN1-P-3)Rha α 1-3Rha α 1-3GlcNAc β 1-	<i>Shigella flexneri</i> Xv-2 (2002017Xv)	<i>Sh. flexneri</i> type Xv-2
2232	-2(EtN1-P-3)Rha α 1-2(EtN1-P-3)Rha α 1-3Rha α 1-3GlcNAc6(%)Ac β 1-	<i>Shigella flexneri</i> Yv-1	<i>Sh. flexneri</i> type Yv-1
2501	<i>Streptococcus equi</i> sp. hyaluronic acid sodium salt	<i>Streptococcus equi</i> sp. hyaluronic acid sodium salt	<i>S. equi</i> sp. hyaluronic acid
2502	-4(2-O-Su)IdoA α 1-4(6-O-Su)GlcNSu α 1-; -4GlcA β 1-4GlcNAc α 1-	Heparin, MW7400	Heparin
2601	Acetobacter methanolicus LPS	<i>Acetobacter methanolicus</i> LPS	<i>A. methanolicus</i> LPS
2701	GalAb1-7manHep α 1-7(GlcNAc1-4GalA α 1-3)manHep α 1-3(GalA β 1-6Glc β 1-4)manHep α 1-5Kdo	<i>Klebsiella pneumoniae</i> O8	<i>K. pneumoniae</i> O8
2702	GlcNAc1-4GalA α 1-3(GalA β 1-7manHep α 1-7)manHep α 1-3(GalA β 1-6Glc β 1-4)manHep α 1-5Kdo	<i>Klebsiella pneumoniae</i> O12	<i>K. pneumoniae</i> O12
3001	-3Glc β 1-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> zymozan A	<i>S. cerevisiae</i> zymozan A
3002	-6Man α 1-	Yeast mannan (a)	Mannan
3301	-3Glc β 1-6Glc β 1-	Laminaria hyperborea laminarin	Laminarin
3302	-3Glc β 1-	B5-2 Laminaran	Laminaran
3401	-4Glc β 1-4Glc β 1-3Glc β 1-	Barley β -Glucan	bGlucan
3501	Rha:Ara:Gal:GalA 9:3:79:9, MW 900-2000 kDa	Galactan-1 from flax bast fibre	Galactan-1
3502	Rha:Ara:Gal:GalA 17:3:62:18, MW 100-400kDa	Galactan-2 from flax bast fibre	Galactan-2

8001	-2)Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GalNAc β 1-3GalNAc β (1-LPS	<i>Escherichia coli</i> O86:B7 LPS	<i>E. coli</i> O86_B7 LPS
8002	-3Rha α 1-3Rha α 1-2Glc α 1-3GlcNAc α 1- LPS	<i>Escherichia coli</i> O148 LPS	<i>E. coli</i> O148 LPS
8003	-4(Fuc α 1-3)GlcNAc6(30%)Ac α 1-4GlcA α 1-3Fuc α 1-3GlcNAc β 1-LPS	<i>Escherichia coli</i> O168 LPS	<i>E. coli</i> O168 LPS
8004	-4(GalNAc β 1-3)Gal α 1-6Glc β 1-3GalNAc β 1- LPS	<i>Escherichia coli</i> O130 LPS	<i>E. coli</i> O130 LPS
8005	-2Rib-ol5-P-6Gal α 1-3FucNA α 1-3(GlcNAc β 1-4)GlcNAc β 1- LPS	<i>Escherichia coli</i> O151 LPS	<i>E. coli</i> O151 LPS
8006	-3(Glc α 1-2)Rha α 1-2Rha α 1-2Rha α 1-3(Glc α 1-2)Rha α 1- LPS	<i>Escherichia coli</i> O99 LPS	<i>E. coli</i> O99 LPS
8007	-6Man α 1-2(Glc α 1-4)Man α 1-2(Glc α 1-3)Man β 1-3GlcNAc α 1- LPS	<i>Escherichia coli</i> O73 LPS	<i>E. coli</i> O73 LPS
8008	-3Rib-ol5-P-6Gal α 1-3FucNA α 1-3GlcNAc β 1- LPS	<i>Escherichia coli</i> O118 LPS	<i>E. coli</i> O118 LPS
8009	-4(R-Lac2-3Rha2Ac α 1-3)Man β 1-4Man α 1-3GalNAc β 1- LPS	<i>Escherichia coli</i> O58 LPS	<i>E. coli</i> O58 LPS
8010	-4(GlcNAc β 1-3)GalNAc α 1-2Glc α 1-4L-IdoA α 1-3GalNAc β 1- LPS	<i>Escherichia coli</i> O112ab LPS	<i>E. coli</i> O112ab LPS
8011	-3(S-Lac2-4)GlcNAc β 1-2Rha α 1-2Rha α 1-3(Glc β 1-2)Rha α 1-3GlcNAc β 1- LPS	<i>Escherichia coli</i> O150 LPS	<i>E. coli</i> O150 LPS
8012	-2Gal β 1-4Man β 1-4Gal α 1-3GlcNAc β 1-LPS	<i>Escherichia coli</i> O40 LPS	<i>E.coli</i> O40 LPS
8013	-2(S-3HOBu1-4)Qui4N α 1-4GalNAc β 1-4Rha α 1-3GlcNAc6(30%)Ac β 1-LPS	<i>Escherichia coli</i> O49 LPS	<i>E.coli</i> O49 LPS
8014	-6GalNAc β 1-4(DGro1-P-3)GalNAc β 1-4(Gal α 1-6)Glc β 1-3GalNAc β 1-LPS	<i>Escherichia coli</i> O81 LPS	<i>E.coli</i> O81 LPS
8015	-3Fucf2(50%)Ac β 1-3-6dmanHep β 1-LPS	<i>Escherichia coli</i> O52 LPS	<i>E.coli</i> O52 LPS
9001	-3Glc β 1-3Glc β 1-3(Glc β 1-6)Glc β 1-	Scleroglucan	Scleroglucan
9002	-3Glc β 1-	Curdlan	Curdlan
9003	-4GlcN(%)Ac β 1-	Chitosan, high MW	Chitosan
9004	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> mannan SIGMA		Mannan
9005	Bakers yeast glucan SIGMA		Glucan
9006	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> zymosan A SIGMA		Zymosan A
9007	Hyaluronic acid E77-2 KBL6413 17kDa		HyalU(E77-2)
9008	-4GlcA β 1-3(6-O-Su)GalNAc β 1-	Hondroitin-6-Sulfate Sodium salt, MW 60000	Hondroitin-6-Sulfate

Примечание**Сокращения:**

sp1 = ol = aminoalditol

sp2 = C2 = $-\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$ sp3 = C3 = $-\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ sp4 = Gly = $-\text{NHCOCH}_2\text{NH}_2$ sp5 = C8 = $-\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{NH}-\text{CO}(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$ sp6 = NH(*p*-C₆H₄)CH₂CH₂NH₂ (as-aminoalditol)sp7 = Ph = $-\text{OC}_6\text{H}_4\text{-p-NH}_2$ sp8 = PEG = $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{NH}_2$ sp9 = Bn = $-\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{-p-NHCOCH}_2\text{NH}_2$ sp10 = PEG2 = $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$ sp11 = $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ sp12 = PEG3 = $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$

LPS - lipopolysaccharide

CPS - capsular polysaccharide

sp0 = other spacers: Asn, Ser, C2Et (see details in the column "Spacered form of saccharide")

Ala = alanine

Arg = arginine

Asn = asparagine, $\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2\text{CH}(\text{COOH})\text{NH}_2$

Ile = iso-leucine

Nle = norleucine

Ser = serine, $-\text{OCH}_2\text{CH}(\text{COOH})\text{NH}_2$

Trp = tryptophan

Phe = phenylalanine, $-\text{COCH}(\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5)\text{NH}_2$ C2Et = $-\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$

Cit = citrullin

A = Gal

AN = GalNAc

Ch = chito

F = L-Fuc

G = Glc

Gc = glycolyl

GN = GlcNAc β

R = Rha

i = iso

(fur, f) = furanose cycle

Fm = formyl

Lac = lactose

LN = N-acetyllactosamine

M = Man

MN = ManNAc

Malt = maltose

OS = oligosaccharide

LPS = lipopolysaccharide

P = phosphate

S = Sia = Neu5Ac α

Su = sulfate

Tn = GalNAc α

U = uronic acid

D-Fuc3NRHb = 3,6-dideoxy-3-((*R*)-3-hydroxybutanoyl)-D-galactose

D-Xlu = D-*threo*-pent-2-ulose (D-xylulose)

8eLeg = 8-epilegionaminic acid

8-Leg = 8-legionaminic acid

L-Ido = L-iduronic acid

D-aThr = D-allothreonine

Dhpa = (2R,4R)-2,4-dihydroxypentanoic acid

L-6dTal = 6-deoxy-L-talose

D-QuiNAc – N-acetyl-D-quinovosamine

Pse - pseudaminic acid

KDO - 3-deoxy- d-manno-oct-2-ulosonic acid or keto-deoxyoctulosonate

6dmanHep - 6-deoxy-D-manno-heptose

Aci - acinetaminic acid