

РЕПЕРТУАРЫ АНТИ-ГЛИКАНОВЫХ АНТИТЕЛ ПРИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ И ОСЛОЖНЕННОЙ БЕРЕМЕННОСТИ

Зиганшина М.М.¹, Шилова Н.В.², Хасбиуллина Н.Р.², Ракитко А.С.³, Кан Н.Е.¹, Тютюнник В.Л.¹, Тютюнник Н.В.¹, Мантрова Д.А.¹, Бовин Н.В.², Сухих Г.Т.¹

¹ ФГБУ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова Минздрава России, Москва

² ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, механико-математический факультет, Москва

REPERTOIRES OF ANTI-GLYCAN ANTIBODIES IN NORMAL AND COMPLICATED PREGNANCY

Ziganshina M.M.¹, Shilova N.V.², Khasbiullina N.R.², Rakitko A.S.³, Kan N.E.¹, Tyutyunnik V.L.¹, Tyutyunnik N.V.¹, Mantrova D.A.¹, Bovin N.V.², Sukhikh G.T.¹

¹ Federal State Budget Institution «Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology» of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

² M.M. Shemyakin and Y.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Russian Federation, Moscow

³ M.V. Lomonosov Moscow State University, Department of Mechanics and Mathematics, Moscow

Одним из механизмов, которые обеспечивают формирование толерантности иммунной системы матери к фетальным аллоантигенам при беременности, является развитие противовоспалительного гуморального Th2-иммунного ответа, протективного в отношении плода [1]. Так, при беременности показана продукция протективных «блокирующих» антител, защищающих фетальные клетки от иммунного надзора материнской иммунной системы [2,3]. Также есть множество сообщений, что при патологии беременности наблюдается повышенный синтез антител, участвующих в иммунопатологических реакциях [4,5].

Все проводимые на сегодняшний день исследования гуморального иммунитета при беременности не учитывают исходно присутствующие в организме естественные антитела, которые выполняют регуляторную функцию в организме [6]. Известно, что значительное число естественных антител направлено к гликанам клетки и вне-

клеточного матрикса [7], что при беременности может оказывать существенное влияние на межклеточные контакты и плацентацию, т.к. гликаны являются ключевыми молекулами в этих процессах [8]. Известно, что нарушенные межклеточные контакты при формировании плаценты являются основным патогенетическим фактором развития преэклампсии (ПЭ) – одного из наиболее тяжёлых осложнений беременности, характеризующееся гиперактивацией иммунной системы, которое является одной из основных причин материнской и перинатальной заболеваемости и смертности во всем мире [9]. В этой связи, характеристика анти-гликановых антител (АгАТ) при ПЭ является приоритетной темой данного исследования. Наши исследования сфокусированы на антигликановых (IgG) антителах, поскольку антитела G класса являются наиболее распространёнными и стабильными молекулами в сыворотке крови и составляют основу защитного иммунитета [10]. Изучение профиля АгАТ

проводили с помощью гликанового микрочипа (гликочипа), лигандами которого являются природные и синтетические гликаны, входящие в состав большинства гликопротеинов и гликолипидов человека, в том числе антигенам групп крови ABO, Lewis и т.д. и их производным [11].

Материал и методы В одномоментное исследование были включены 66 пациентов. Основную группу составили 26 пациенток с ПЭ (группа 1), группу сравнения составили 30 здоровых беременных (группа 2), и 10 условно здоровых небеременных женщин (группа 3).

Критерии включения: для групп 1 и 2: одноплодная беременность, наступившая в естественном цикле, третий триместр беременности; для группы 1: беременность, осложненная ПЭ; для группы 3: 19-24 дни менструального цикла, отсутствие приема комплексных оральных контрацептивов. Критерии исключения: тяжелая акушерская и экстрагенитальная патология, острые воспалительные и аутоиммунные заболевания, гемотрансфузии и трансплантации органов в анамнезе, применение препаратов человеческих иммуноглобулинов, и препаратов, влияющих на выработку и биодоступность антител.

Для определения AgAT в периферической крови использовали микрочипы, содержащие 374 гликана, (ООО «Семиотик», Россия). Чипы инкубировали с исследуемыми сыворотками как описано в [11], после чего связавшиеся с гликанами антитела проявляли вторичными антителами против IgG флуоресцентно мечеными Alexa555 (Invitrogen, США). Сигналы считывали с помощью флуоресцентного сканера ScanArray Gx (Perkin Elmer, США). Полученные данные обрабатывали с помощью программного обеспечения ScanArrayExpress 4.0, используя метод фиксированных колец диаметром 70 мкм. Значимыми считались величины флуоресценции, превышающие фоновое значение (т.е. величину сигнала от поверхности, не содержащей лиганд) в 5 раз. Уровень AgAT (отражающий аффинность антител и их количество) характеризовали с помощью медианы интенсивностей флуоресценции повторов лигандов гликочипа.

Статистическая обработка полученных данных производилась с помощью электронных таблиц Microsoft Office Excel и программного обе-

спечения R (разработчик – The R Foundation for Statistical Computing). Процедура контроля качества была выполнена перед обработкой данных, как описано в [12]. Полученные массивы данных были исследованы с помощью непараметрического теста Крускала-Валлиса; для установления межгрупповых различий были использованы попарный тест Крамера и непараметрический тест Вилкоксона-Манна-Уитни (WMW-тест). В данном исследовании была применена поправка на множественность [13], с учётом которой рассматривались значения при $p < 0,00075$. Данные представлены как средняя величина сигналов интенсивности флуоресценции (среднее \pm ошибка среднего).

Результаты и обсуждение

1. Характеристика профилей антител в рассматриваемых группах

По результатам тестов на контроль качества данных из 374 были отобраны 134 AgAT. Анализ распределения сигналов в рассматриваемых группах показал, что профили антител больных с ПЭ (группа 1), в целом, занимают промежуточное положение, отличное от здоровых беременных и условно здоровых вне беременности. Средняя величина сигналов интенсивности флуоресценции имеет максимальные значения у здоровых вне беременности (группа 3), и минимальные значения – у здоровых беременных (группа 2).

2. Межгрупповое сравнение спектров антигликановых антител

А. Различия в спектрах антигликановых антител в рассматриваемых группах

Максимальные отличия в спектрах антигликановых антител наблюдаются при попарном сравнении групп 2 и 3 (WMW-тест). Значимые отличия выявлены по AgAT к изолактозамину - дисахариду LeC ($\text{Gal}\beta 1\text{-3GlcNAc}\beta$) и ряду его 3'-замещенных производных, а также по антителам к дисахаровой кислоте ($\text{Neu5Ac}\alpha 2\text{-8Neu5Ac}\alpha 2$).

Попарный WMW-тест выявил значимое отличие между группами 1 и 2 по антителам к сульфатированному ди-N-ацетиллактозамину $\text{GalNAc}\beta 1\text{-4(6-O-Su)GlcNAc}\beta\text{-sp}$ ($p < 0,000479$); однако между группами 1 и 3 значимых отличий обнаружено не было (с учетом поправки на множественность).

Согласно тройному тесту Крускала-Валлиса

достоверные отличия между всеми тремя группами были выявлены только по АгАТ к сульфатированному ди-N-ацетиллактозамину GalNAc β 1-4(6-O-Su)GlcNAc β -sp (p=0,00009).

Б. Сходство в спектрах антигликановых антител в рассматриваемых группах

Если смотреть на относительное отклонение средних в группах, то можно выделить гликаны, по сигналам антител к которым все группы демонстрируют сходство. Это антитела к мальтолигосахаридам (Glc α 1-4Glc β -; (Glc α 1-6) $_4\beta$ -; (Glc α 1-6) $_5\beta$ -), N-ацетиллактозамину- α (Gal β 1-4GlcNAc α -) и бензильному производному α -N-ацетиллактозамина (6-Bn-Gal α 1-4(6-Bn)GlcNAc β -).

Проведенные нами исследования спектров АгАТ-IgG у здоровых доноров, а также у пациенток с физиологической и осложненной ПЭ беременностью показал, что, во-первых, при физиологической беременности выявлен системный эффект уменьшения общего уровня АгАТ-IgG: пациентки с ПЭ по уровню АгАТ-IgG, занимают промежуточное положение между здоровыми беременными и небеременными донорами. Во-вторых, различия между группами наиболее ярко выражены у здоровых небеременных доноров и пациенток с физиологической беременностью. Лидерами в этом сравнении являются антитела к Le^C и его аналогам. Сигналы анти-Le^C-IgG значимо ниже при беременности, что может быть свидетельством их возможной роли в формировании толерантности к плоду в качестве «блокирующих антител». В-третьих, различия между всеми тремя группами выявлены по АгАТ-IgG против сульфатированного ди-N-ацетиллактозамина (GalNAc β 1-4(6-O-Su)GlcNAc β -), что, возможно, демонстрирует потенциальную роль этих антител в формировании иммунологической толерантности при беременности, и патогенезе ПЭ. В-четвертых, выявлены АгАТ-IgG (антитела против GlcNAc-терминированных гликанов, гликанов с коровой лактозой и мальтолигосахаридов), уровень которых остаётся неизменным у всех трех групп, что может указывать на их принадлежность к естественным антителам, а также на избирательность изменения антител при беременности, и, вероятно, регуляторную роль АгАТ-IgG.

Работа выполнена в рамках государственного

контракта «Изучение диагностической и прогностической роли молекулярно-генетических, иммунологических, эпигенетических факторов в развитии преэклампсии» № г.р.: 116082210002.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Dealtry G.B., O'Farrell M.K., Fernandez N. The Th2 cytokine environment of the placenta. *Int. Arch. Allergy. Immunol.*, 2000, v.123, p. 107-119.
2. Malan Borel I., Gentile T., Angelucci J. et al. IgG asymmetric molecules with antipaternal activity isolated from sera and placenta of pregnant human. *J. Rep. Immunol.*, 1991, v. 20, P. 129-140.
3. Barrientos G., Fuchs D., Schröcksnadel K. et al. Low levels of serum asymmetric antibodies as a marker of threatened pregnancy. *J. Rep. Immunol.*, 2009, v. 79, p. 201-210.
4. Dechend R., Müller D.N., Wallukat G. et al. Activating auto-antibodies against the AT1 receptor in preeclampsia. *Autoimmun. Rev.*, 2005, v. 4, p. 61-65.
5. Hanly, J.G. Antiphospholipid syndrome: an overview. *Can. Med. Assoc. J.*, 2003, v. 168, p. 1675-1682.
6. Lutz H.U. Homeostatic roles of naturally occurring antibodies: an overview. *J. Autoimmun.*, 2007, v. 29, p. 287-294.
7. Бовин Н.В. Естественные антитела к гликанам. *Биохимия*, 2013, т.78, №7. с. 1008-1022.
8. Gu J., Taniguchi N. Potential of N-glycan in cell adhesion and migration as either a positive or negative regulator. *Cell. Adh. Migr.*, 2008, v. 2, p. 243-245.
9. Kaufmann P., Black S., Huppertz B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol. Reprod.*, 2003, v. 69, p. 1-7.
10. van de Bovenkamp F.S., Hafkenscheid L., Rispen T., Rombouts Y. The emerging importance of IgG Fab glycosylation in immunity. *J. Immunol.*, 2016, v. 196, p. 1435-1441.
11. Huflejt M.E., Vuskovic M., Vasiliu D. et al. Anti-carbohydrate antibodies of normal sera: findings, surprises and challenges. *Mol. Immunol.*, 2009, v. 46, p. 3037-3049.
12. Vuskovic M., Xu H., Bovin N.V. et al. Processing and analysis of serum antibody binding signals from Printed Glycan Arrays for diagnostic and prognostic applications. *Int.J. Bioinf. Res.*, 2011, v. 7, p. 402-426.
13. McDonald J.H. *Handbook of Biological Statistics*. Sparky House Publishing, Baltimore, Maryland. 2014, p. 299.