

<https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-4-38-45>

# ОСОБЕННОСТИ БЛОКИРОВАНИЯ МЕМБРАННЫХ МОЛЕКУЛ HLA-DR И HLA-G ФРАКЦИЕЙ ИММУНОГЛОБУЛИНА G ЧЕЛОВЕКА, ПОЛУЧЕННОЙ ИЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ МНОГОРОЖАВШИХ ЖЕНЩИН

ШАБАЛДИН А.В.<sup>1,2\*</sup>, ДЕЕВА Н.С.<sup>1</sup>, СУХИХ А.С.<sup>2</sup>, ВАВИН Г.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Кемерово, Россия

## Резюме

**Цель.** Получить очищенный иммуноглобулиновый препарат из крови многорожавших женщин и оценить его функциональную активность в отношении молекул HLA-DR и HLA-G.

**Материалы и методы.** Для получения очищенного иммуноглобулинового препарата из крови многорожавших женщин была выполнена аффинная хроматография при помощи системы DEAE Affi-Gel Blue (BioRad, USA). Чистота выделенного препарата была оценена в иммуноэлектрофорезе. Оценка функциональной активности иммуноглобулинового препарата в отношении молекул HLA-DR и HLA-G была выполнена на лимфоцитах, полученных из периферической крови 14 условно-здоровых мужчин репродуктивного возраста. Для этого использовали проточную цитофлуориметрию.

**Результаты.** Было получено 30 мл иммуноглобулиновой фракции с концентрацией белка 4,3 г/л и остаточным альбумином менее 0,1 г/л (Architect C8000, Abbott, USA). Концентрация белка в полученной фракции соответствовала нижней границе концентрации иммуноглобулина G в сыворотке крови человека. Иммуноэлектрофорез показал, что в хроматографическом смысле имеется только фракция IgG.

Оценка функциональной активности фракции IgG показала, что под ее воздействием подавлялась экспрессия HLA-DR и HLA-G на донорских лимфоцитах. Это изменение видимой экспрессии могло быть результатом блокирования мембранных молекул HLA-DR и HLA-G антителами, входящими в состав IgG многорожавших женщин.

**Заключение.** Очищенная фракция иммуноглобулина G многорожавших женщин может оказать значимый иммунопрофилактический и лечебный эффект в отношении иммунных нарушений в системе «мать-эмбрион» и, через этот эффект, подавлять формирование спорадических несиндромальных врожденных пороков сердца. Данный эффект обусловлен наличием в иммуноглобулиновой фракции антител, блокирующих молекулы HLA-DR и HLA-G на лимфоцитах.

**Ключевые слова:** врожденный порок сердца, IgG, HLA-DR, HLA-G, иммунопрофилактика.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Источник финансирования

Данная работа не имела источников финансирования.

## Для цитирования:

Шабалдин А.В., Деева Н.С., Сухих А.С., Вавин Г.В. Особенности блокирования мембранных молекул HLA-DR и HLA-G фракцией иммуноглобулина G человека, полученной из плазмы крови многорожавших женщин. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2020; 5(4): 38-45. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-4-38-45>

## \*Корреспонденцию адресовать:

Шабалдин Андрей Владимирович, 650056, Кемерово, ул. Ворошилова, 22а, E-mail: weit2007@yandex.ru  
© Шабалдин А.В. и др.

## ORIGINAL RESEARCH

# FEATURES OF BLOCKING HLA-DR AND HLA-G BY THE HUMAN IgG FRACTION FROM THE PLASMA OF MULTIPAROUS WOMEN

ANDREY V. SHABALDIN<sup>1,2\*\*</sup>, NADEZHDA S. DEEVA<sup>1</sup>, ANDREY S. SUKHIKH<sup>2</sup>, GRIGORIY V. VAVIN<sup>2</sup><sup>1</sup>Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation<sup>2</sup>Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

## Abstract

**Aim.** To obtain a purified IgG preparation from the plasma of multiparous women and to evaluate its functional activity towards HLA-DR and HLA-G molecules.

**Materials and Methods.** IgG preparation was prepared by means of affinity chromatography using the DEAE Affi-Gel Blue system. The purity of the isolated preparation was assessed by immunoelectrophoresis. Functional activity of the IgG preparation against HLA-DR and HLA-G molecules was assessed in peripheral blood lymphocytes isolated from 14 apparently healthy men of reproductive age by flow cytometry.

**Results.** A 30 mL IgG fraction was obtained with a protein concentration of 4.3 g/l and a residual albumin less than 0.1 g/l. The protein concentration in the obtained fraction corresponded to the lower

limit of IgG concentration in human serum. Immunoelectrophoresis showed that the IgG was the only antibody fraction in the chromatographic washout. Purified IgG fraction suppressed the expression of HLA-DR and HLA-G in donor lymphocytes.

**Conclusion.** The purified IgG fraction from multiparous women can have a significant preventive and therapeutic effect against immune disorders in the mother-embryo system and therefore might halt the development of congenital heart defects by blocking HLA-DR and HLA-G in the lymphocytes.

**Keywords:** congenital heart disease, IgG, HLA-DR, HLA-G, immunoprevention.

Conflict of Interest

None declared.

**Funding**

There was no funding for this project.

◀ English

## For citation:

Andrey V. Shabaldin, Nadezhda S. Deeva, Andrey S. Sukhikh, Grigoriy V. Vavin. Features of blocking HLA-DR and HLA-G by the human IgG fraction from the plasma of multiparous women. *Fundamental and Clinical Medicine*. 2020; 5(4): 38-45. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-4-38-45>

## \*\*Corresponding author:

Andrey V. Shabaldin, 6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002, Russian Federation, E-mail: weit2007@yandex.ru

© Andrey V. Shabaldin et al.

## Введение

Высокий уровень рождения детей с врожденными пороками сердца (ВПС) и существенный вклад этой патологии в формирование перинатальной, младенческой и детской смертности, а также уровень инвалидизации детей, в том числе после радикального хирургического лечения [1, 2], определяют значимость поиска методов прогнозирования и профилактики риска формирования ВПС на этапе планирования беременности.

Необходимо отметить, что более 80% ВПС не имеют семейной истории, ведущего генетического дефекта и не являются синдромом хро-

мосомного заболевания [2]. Эти спорадические несиндромальные ВПС являются по своим этиологии и патогенезу мультифакториальными заболеваниями. В исследованиях, проведенных в 2019 году, было показано, что формирование спорадических несиндромальных ВПС связано с нарушениями иммунных взаимодействий по HLA в системе «мать-эмбрион», аналогичными развивающимся при репродуктивных потерях. В частности, было показано, что в семьях с ВПС и в семьях с репродуктивными потерями имеет место высокий уровень материнского иммунного ответа на аллогенные HLA (мужа/эмбриона) [3]. Именно на это основное звено

патогенеза ВПС и репродуктивных потерь может быть направлена прегравидарная иммунная коррекция.

Иммунная коррекция при репродуктивных потерях, связанных с аллоиммунными нарушениями, начинается на прегравидарном этапе, и одним из лечебных препаратов является иммуноглобулин для внутривенного введения [4]. Данный препарат может содержать антитела, блокирующие материнские лимфо- и моноцитарные молекулы презентации аллоантигенов (HLA-DR, HLA-G), а также аллогенные HLA эмбриона. Именно через этот механизм возможно ограничение воспаления в системе «мать-эмбрион». Доказано, что тератогенез в сердечно-сосудистой системе связан с высоким уровнем пироптоза. Иммуноглобулины для внутривенного введения применяются в профилактических целях до беременности и в лечебных во время беременности [5].

Соответственно, эти же иммуноглобулиновые препараты могут быть использованы как для иммунной профилактики несиндромальных спорадических ВПС на прегравидарном этапе, так и для лечения в ранние сроки беременности. Лечебный эффект будет заключаться в блокировании свободных для распознавания HLA молекул эмбриобласта. Тот факт, что наибольшее количество антител к антигенам HLA различных классов, больше всего выявляется у женщин репродуктивного периода, доказывает их физиологическую роль [6].

Исходя из этого была поставлена цель исследования – получение очищенного иммуноглобулинового препарата из крови многорожавших женщин и оценка его функциональной активности в отношении молекул HLA-DR и HLA-G.

## Материалы и методы

Для получения очищенного иммуноглобулинового препарата из крови многорожавших женщин был выполнен забор периферической крови в объеме 5 мл у 15 женщин, имеющих в анамнезе более четырех родов.

Сбор крови проводился в родильном доме областной детской клинической больницы г. Кемерово в пробирки, содержащие натриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА).

Выделение иммуноглобулиновой фракции (ИГФ) из плазмы крови многорожавших женщин выполняли с помощью аффинной хроматографии.

Чистоту полученного белка анализировали с помощью иммуноэлектрофореза.

Для оценки функциональной активности в отношении молекул HLA-DR и HLA-G была сформирована группа из 14 условно-здоровых мужчин репродуктивного возраста. У всех обследованных забиралась периферическая кровь для последующего выделения лимфоцитов. На выделенных донорских лимфоцитах оценивалась функциональная активность очищенного иммуноглобулинового препарата. Выбор группы мужчин был обусловлен тем, что функциональная оценка очищенного иммуноглобулина G проводилась по отношению к эффекту ауто-сыворотки. В мужской ауто-сыворотке отсутствуют антитела к алло-HLA.

## Результаты и обсуждение

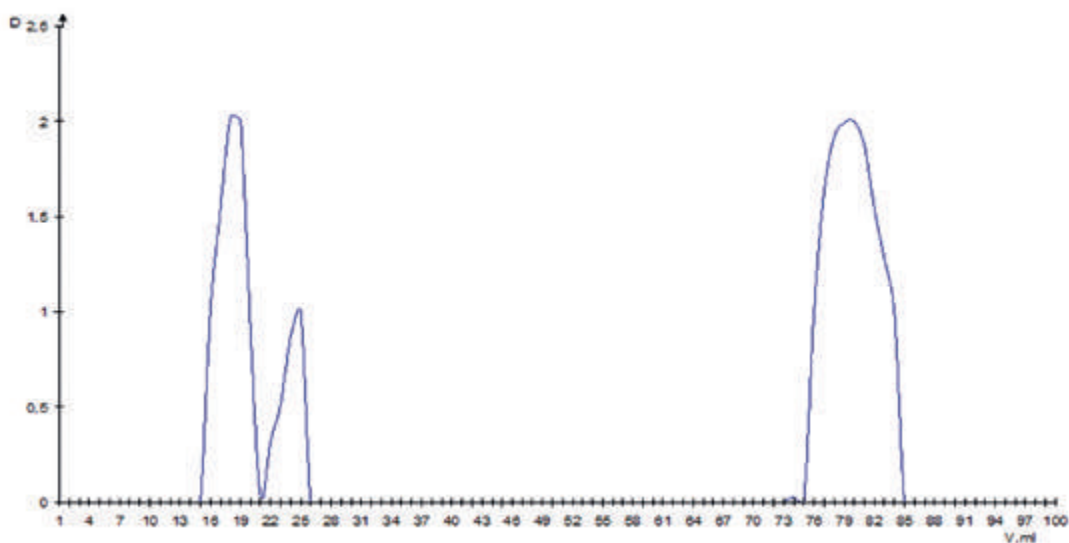
Выделение ИГФ (с высокой концентрацией IgG) осуществлялось при помощи системы DEAE Affi-Gel Blue (BioRad, USA).

Получение и десорбцию ИГФ осуществляли с применением подвижной фазы буферов (20 мм  $K_2HPO_4$  /  $KH_2PO_4$ , pH 8,0, 0,02%). Значение pH регулировали с помощью добавления 0,1M KOH. Работу осуществляли на хроматографе низкого давления BioLogic (BioRad, USA). Подготовка сорбента включала рекомендованные производителем этапы, в том числе предварительную отмывку сорбента от остаточного красителя на стеклянном фильтре с последующим перенесением сорбента в фосфатный буфер и упаковку сорбента.

Фракции (**рисунок 1**) собирались с помощью коллектора фракций BioFrac. Регенерацию сорбента после анализа осуществляли 0,5M раствором NaCl.

Было получено 30 мл ИГФ с концентрацией белка 4,3 г/л и остаточным альбумином менее 0,1 г/л. Анализ общего белка и альбумина проводился на анализаторе Architect C8000 (Abbott, USA). Концентрация белка в ИГФ соответствовала нижней границе концентрации иммуноглобулина G в сыворотке крови человека.

Далее был выполнен иммуноэлектрофорез белков хроматографического смыва в 1,5% агарозном геле на 0,05M веронал-мединаловом буфере (pH=8,6) в три этапа. Первый этап был связан с проведением электрофореза белков хроматографического смыва в агарозном геле. На втором этапе в агарозный гель была добавлена полиспецифическая сыворотка против белков крови человека (Поли-ИЭФ, МикроГен,

**Рисунок 1.**

Хроматограмма выделения иммуноглобулиновой фракции с объемом элюции 16-20 мл и десорбированного сывороточного белка с объемом элюции 75-85 мл.

**Figure 1.**

Chromatogram of the isolated IgG fraction with the elution volume of 16-20 mL and desorbed whey protein with the elution volume of 75-85 mL.

**Рисунок 2.**

Иммуноэлектрофорез хроматографического смыва в 1,5% агарозном геле, окраска суданом черным Б.

**Figure 2.**

Immunoelectrophoresis of chromatographic washout in 1.5% agarose gel. Sudan Black B staining.

Россия), антитела которой при диффузии в геле преципитировали со специфическими молекулами. Третий этап был связан с высушиванием и окрашиванием пластины с гелем для верификации линий преципитации.

Иммуноэлектрофорез показал, что в хроматографическом смыве имеется только фракция IgG (рисунок 2).

На данном этапе работы из плазмы крови многорожавших женщин была получена очищенная фракция иммуноглобулина G (ФИГГ), что документировано в иммуноэлектрофорезе.

Для определения специфичности антител, входящих в ФИГГ, был разработан протокол иммунологического тестирования с помощью проточной цитофлуориметрии. Протокол был разработан на основе методического подхода «cross-match».

Для тестирования ФИГГ были выделены донорские лимфоциты из периферической крови на градиенте плотности фиколл-верографина 1,077 г/см<sup>3</sup> по стандартной методике [7].

Полученные донорские отмывые лимфоциты разводились в полной среде RPMI-1640. Полная среда была получена добавлением в RPMI-1640 следующих компонентов: 15% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, Gibco, Thermo Fisher Scientific, США), 2 mM L-глутамин (Panreac, Испания), 10 mM Нерес-буфера (Sigma, США), 5\*10<sup>-5</sup> M 2-меркаптоэтанола (Biochem, Фран-

ция) и 50 мкг/мл раствора гентамицина-сульфата (Ветинтерфарм, Россия). Концентрация лимфоцитов в полной среде составляла 5000 клеток в мкл.

Для проведения cross-match донорские лимфоциты разносились по 200 мкл в четыре пробирки для проточного цитофлуориметра Beckman Coulter (USA). В первую и вторую пробирки добавлялась аутосыворотка донора в объеме 100 мкл, в третью и четвертую пробирки по 100 мкл ФИГГ. Пробирки инкубировались в термостате при 37 градусах Цельсия в течение 30 минут.

После инкубации проводилась однократная отмывка донорских лимфоцитов от несвязавшихся антител. Для этого в каждую пробирку вносилось по 1000 мкл среды RPMI-1640 и проводилось центрифугирование на 1500 оборотов в минуту в течение 5 минут, после чего надосадочная жидкость удалялась.

Далее в первую и третью пробирки вносилась смесь конъюгированных моноклональных антител к следующим мембранным молекулам: CD45 с перидинином-хлорофиллом 7 (PC-7), HLA-DR с перидинином-хлорофиллом 5 (PC-5) и CD3 с флуорисцеином изотиоцианатом (FITC). Эти пробирки использовались для выявления антител к HLA-DR. Для выявления антител к HLA-G использовались вторая и четвертая пробирки. В эти пробирки вноси-

лась следующая смесь конъюгированных моноклональных антител к мембранным молекулам: CD45 с PC-7, HLA-G с аллофикиоцианином (APC) и CD3 с FITC. Конъюгированные моноклональные антитела были получены от производителя Biolegend (USA). Инкубация проводилась при комнатной температуре в течение 20 минут в полной темноте. Далее проводилась однократная отмывка по указанной выше методике.

Проточная цитофлуориметрия выполнялась на приборе Cytomics FC 500 с программным обеспечением CXP (Beckman Coulter, USA).

Особенности изменения экспрессии HLA-DR и HLA-G на донорских лимфоцитах под воздействием ФИГГ были оценены с помощью протокола проточной цитофлуориметрии.

Протокол был сформирован по детекции следующих значимых показателей, отраженных в гистограммах. В первой гистограмме (рисунок 3) выделяли популяцию лимфоцитов по их

размерным характеристикам (прямое (малоугловое) светорассеяние - forward scatter - FSL) и по внутриклеточной плотности (боковое светорассеяние - side scatter - SSL). В следующей гистограмме (рисунок 4) выделяли лимфоциты по SSL и маркеру CD45-PC7. Именно это выделение лимфоцитов было основным для следующих гистограмм, в которых лимфоциты были разделены на фенотипы по экспрессии CD3, HLA-DR (первая и третья пробирки) и CD3, HLA-G (вторая и четвертая пробирки). Анализ этих фенотипов проводился как в пробирках с аутоусывороткой (контрольные пробирки), так и с добавлением ФИГГ (опытные пробирки).

Основным показателем был коэффициент изменения экспрессии (КИЭ) HLA-DR и HLA-G в опытных пробирках по отношению к контролю.

$$1. \text{КИЭ}_{\text{HLA-DR, CD3}^+} = ((\text{CD3}^+, \text{HLA-DR}^+_{\text{опыт}} - \text{CD3}^+, \text{HLA-DR}^+_{\text{контр}}) / \text{CD3}^+, \text{HLA-DR}^+_{\text{контр}}) * 100\%;$$

$$2. \text{КИЭ}_{\text{HLA-DR, CD3}^-} = ((\text{CD3}^-, \text{HLA-DR}^+_{\text{опыт}} - \text{CD3}^-, \text{HLA-DR}^+_{\text{контр}}) / \text{CD3}^-, \text{HLA-DR}^+_{\text{контр}}) * 100\%;$$

$$3. \text{КИЭ}_{\text{HLA-DR}^+} = ((\text{HLA-DR}^+_{\text{опыт}} - \text{HLA-DR}^+_{\text{контр}}) / \text{HLA-DR}^+_{\text{контр}}) * 100\%;$$

$$4. \text{КИЭ}_{\text{HLA-G, CD3}^+} = ((\text{CD3}^+, \text{HLA-G}^+_{\text{опыт}} - \text{CD3}^+, \text{HLA-G}^+_{\text{контр}}) / \text{CD3}^+, \text{HLA-G}^+_{\text{контр}}) * 100\%;$$

$$5. \text{КИЭ}_{\text{HLA-G, CD3}^-} = ((\text{CD3}^-, \text{HLA-G}^+_{\text{опыт}} - \text{CD3}^-, \text{HLA-G}^+_{\text{контр}}) / \text{CD3}^-, \text{HLA-G}^+_{\text{контр}}) * 100\%;$$

$$6. \text{КИЭ}_{\text{HLA-G}^+} = ((\text{HLA-G}^+_{\text{опыт}} - \text{HLA-G}^+_{\text{контр}}) / \text{HLA-G}^+_{\text{контр}}) * 100\%, \text{ где } \text{CD3}^+, \text{HLA-DR}^+; \text{CD3}^-, \text{HLA-DR}^+; \text{HLA-DR}^+; \text{CD3}^+, \text{HLA-G}^+; \text{CD3}^-, \text{HLA-G}^+; \text{HLA-G}^+ - \text{являются показателями относительного содержания данной субпопуляции в опытной или контрольной постановке.}$$

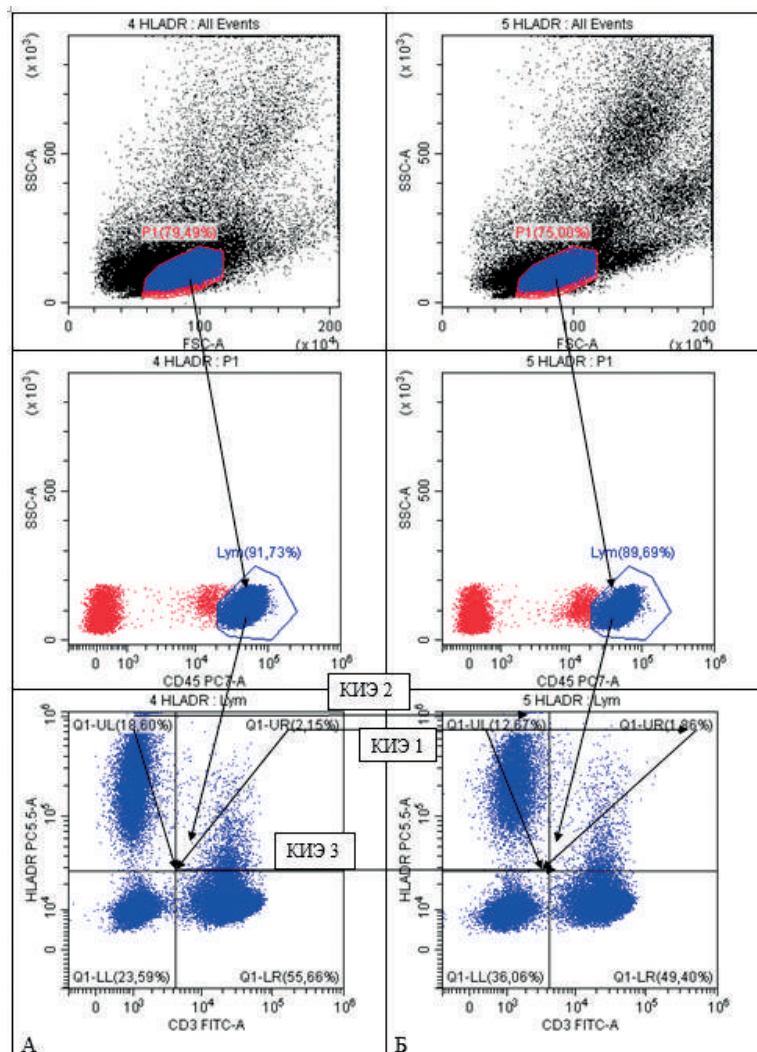
Оценка функциональной активности ФИГГ на 14 донорских лимфоцитах показала, что в 85,7% случаев КИЭ для всех субпопуляций были отрицательными. То есть под воздействием ФИГГ подавлялась экспрессия HLA-DR и HLA-G на лимфоцитах в опытных постановках по отношению к контрольным. Это изменение видимой экспрессии могло быть результатом блокирования мембранных молекул HLA-DR и HLA-G антителами, входящими в состав ФИГГ. В двух случаях разница по экспрессии HLA-DR и HLA-G в опытной и контрольной постановках для всех субпопуляций лимфоцитов отсутствовала. Средние показатели подавления экспрессии HLA-DR и HLA-G на донорских лимфоцитах, отраженные в значениях КИЭ, представлены на рисунке 5.

Рисунок 3.

Гистограммы и анализ изменений коэффициента экспрессии HLA-DR на различных субпопуляциях лимфоцитов в контрольной (А) и опытной (Б) группах.

Figure 3.

Histograms and analysis of HLA-DR expression in various lymphocyte populations in control (A) and experimental (B) groups.



На **рисунке 5** заметно, что ФИГГ оказывала блокирующее действие в отношении молекул HLA-DR и HLA-G на всех субпопуляциях донорских лимфоцитов. Наиболее выраженным был блокирующий эффект в отношении молекулы HLA-G на мембране CD3 отрицательных лимфоцитов. В данную субпопуляцию входят В-лимфоциты, естественные киллеры и незначительное количество моноцитов. Экспрессия молекулы HLA-G максимально выражена на клетках эмбриобласта и минимально на лимфоцитах в постнатальном периоде. Как видно на **рисунке 4**, относительное содержание таких клеток (CD3-, HLA-G+) было меньше 0,5%. В то же время ФИГГ подавляла в среднем на 67% экспрессию HLA-G именно на этом незначительном количестве клеток. Стоит отметить, что ФИГГ максимально проявляла блокирующий эффект и в отношении HLA-DR на субпопуляции CD3 отрицательных лимфоцитов.

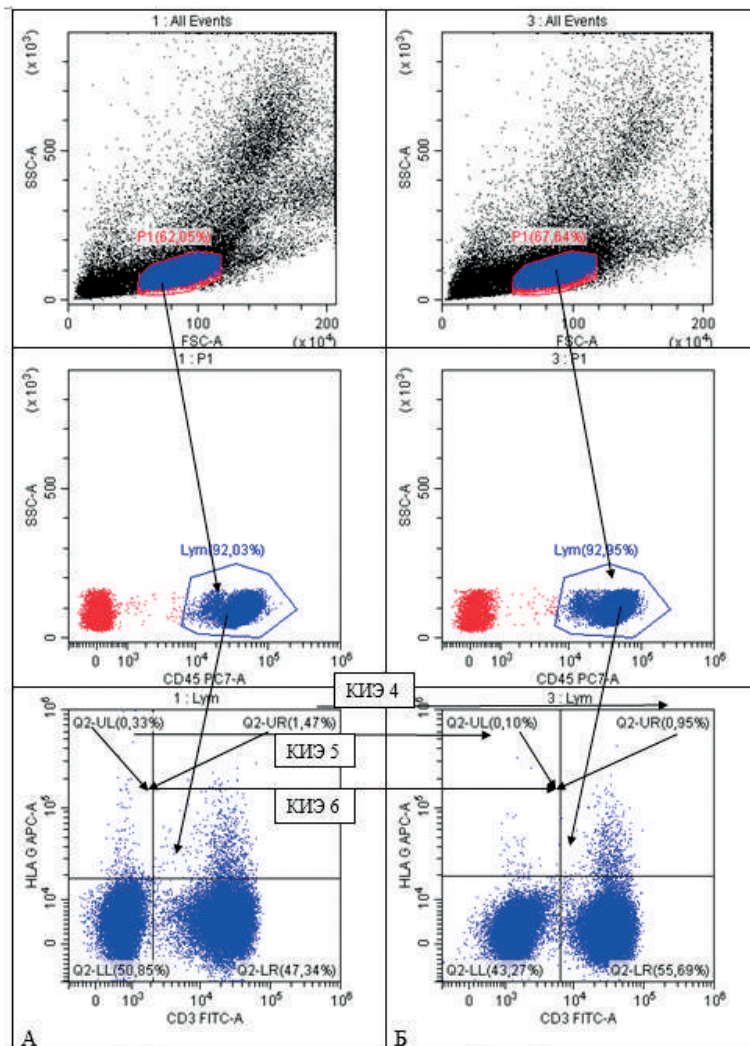
Таким образом, можно говорить о выраженном блокирующем эффекте ФИГГ в отноше-

**Рисунок 5.**

Гистограммы и анализ изменений коэффициента экспрессии HLA-G на различных субпопуляциях лимфоцитов в контрольной (А) и опытной (Б) группах.

**Figure 5.**

Histograms and analysis of HLA-G expression in various lymphocyte populations in control (A) and experimental (B) groups.

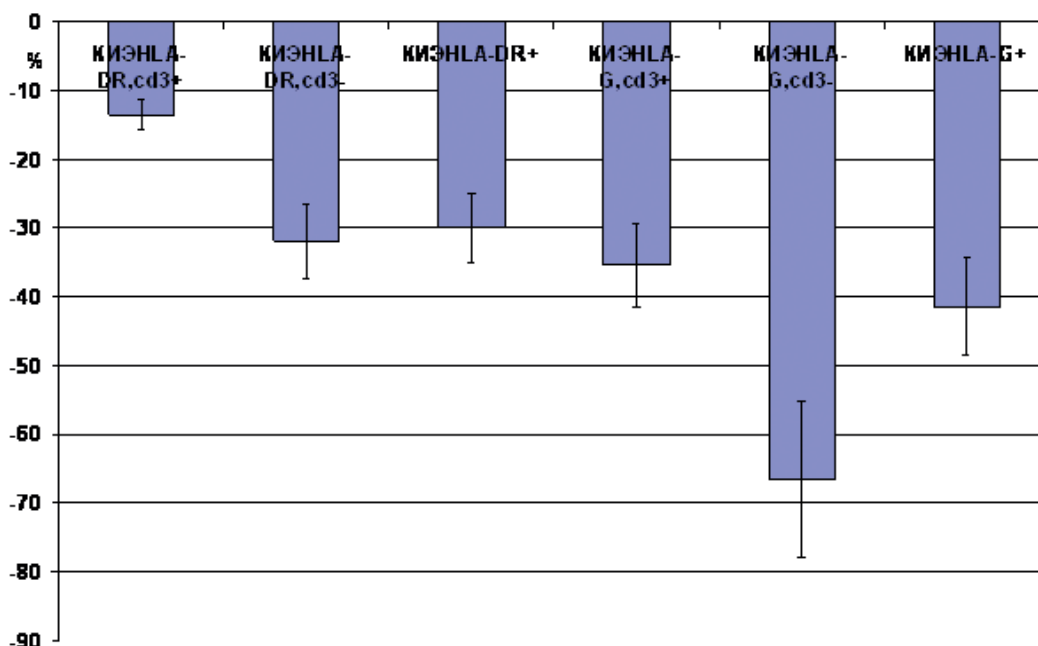


**Рисунок 4.**

Гистограммы и анализ изменений коэффициента экспрессии HLA-G на различных субпопуляциях лимфоцитов в контрольной (А) и опытной (Б) группах.

**Figure 4.**

Histograms and analysis of HLA-G expression in various lymphocyte populations in control (A) and experimental (B) groups.



нии молекул презентации антигенов на мембране иммунокомпетентных клеток (В-лимфоцитов и моноцитов).

### Заключение

Выполненное исследование показало, что очищенная фракция иммуноглобулина G многопложавших женщин содержит антитела, блокирующие молекулы HLA-DR и HLA-G. Особенности этих антител связаны с тем, что они преимущественно взаимодействуют с молекулой HLA-G на CD3 отрицательных лимфоцитах. К этому типу лимфоцитов могут относиться

и клетки, презентующие эмбриональные антигены посредством молекулы HLA-G. Соответственно блокирование последних будет ограничивать и иммунное воспаление в системе «мать-эмбрион» и через этот феномен воздействовать на ассоциированный с воспалением тератогенез в сердечно-сосудистой системе.

Этот эффект очищенной фракции иммуноглобулина G многопложавших женщин может быть значимым для иммунопрофилактики и лечения иммунных нарушений в системе «мать-эмбрион», приводящих к формированию несиндромальных спорадических ВПС.

### Литература / References:

1. Wu QY. [To promote the sustainable development of surgical treatment for congenital heart disease by innovation and practice]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*. 2018;56(6):407-409. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0529-5815.2018.06.003>
2. Нагорнева С.В., Прохорова В.С., Шелаева Е.В., Худовекова А.М. Анализ частоты выявления врожденных пороков развития у плодов за последние 5 лет (2013–2017). *Журнал акушерства и женских болезней*. 2018;67(3):44-48 [Nagorneva SV, Prokhorova VS, Shelaeva EV, Khudovecova AM. The prevalence of congenital fetal anomalies for the past 5 years (2013-2017). *Journal of Obstetrics and Women's Diseases*. 2018;67(3):44-48. (In Russ.).] <https://doi.org/10.17816/JOWD67344-48>
3. Шабалдин А.В., Шмудевич С.А., Чистякова Г.Н., Ремизова И.И., Лукоянычева Е.Б., Горшкова С.В., Шабалдина Е.В. Особенности аллогенных взаимодействий в краткосрочной культуре лимфоцитов супругов, имеющих детей с врожденными пороками сердца или ранние репродуктивные потери. *Медицинская иммунология*. 2019;21(2):279-292 [Shabaldin AV, Shmulevich SA, Chistyakova GN, Remizova II, Lukoyanycheva EB, Gorshkova SV, Shabaldina EV. Peculiarities of allogenic interactions in the short-term culture of lymphocytes of spouses who have children with congenital heart diseases or early reproductive losses. *Medical Immunology (Russia)*. 2019;21(2):279-292. (In Russ.).] <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2019-2-279-292>
4. Романенко Н.А., Бессмельцев С.С., Чечёткин А.В. Коррекция иммунного статуса пациентов иммуноглобулином человека для внутривенного введения. *Казанский медицинский журнал*. 2017;5:775-783 [Romanenko NA, Bessmel'cev SS, Chechetkin AV. Correction of patients' immune status with human intravenous immunoglobulin. *Kazan Medical Journal*. 2017;5:775-783. (In Russ.).] <https://doi.org/10.17750/KMJ2017-775>
5. Nyborg KM, Kolte AM, Larsen EC, Christiansen OB. Immunomodulatory treatment with intravenous immunoglobulin and prednisone in patients with recurrent miscarriage and implantation failure after in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 2014;102(6):1650-1655.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.08.029>
6. Дубоссарская З.М., Дубоссарская Ю.А. Основные вопросы иммунологии репродукции. *Медицинские аспекты здоровья женщины*. 2010;4(31):15-21 [Dubossarskaya ZM, Dubossarskaya YuA. Osnovnye voprosy immunologii reproduktivnoy. *Medical Aspects of Women's Health*. 2010;4(31):15-21. (In Russ.).]
7. Bøyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 1968;97:7.
8. Шабалдин А.В., Горшкова С.В., Шмудевич С.А., Цепочкина А.В., Вавин Г.В., Лукоянычева Е.Б., Шабалдина Е.В. Способ прегравидарного прогнозирования риска формирования спорадических септальных врожденных пороков сердца без хромосомных заболеваний в последующих поколениях. Патент на изобретение RU 2709610 C1, 19.12.2019. Ссылка активна на 22.11.2020 [Shabaldin AV, Gorshkova SV, Shmulevich SA, Tsepokina AV, Vavin GV, Lukoyanycheva EB, Shabaldina EV, inventors; A method of pregravid prediction of the risk of sporadic septal congenital heart defects without chromosomal diseases in subsequent generations. Patent RUS US №2709610, C1. 19.12.2019. Available at: [https://yandex.ru/patents/doc/RU2709610C1\\_20191219](https://yandex.ru/patents/doc/RU2709610C1_20191219) (In Russ.).]

### Сведения об авторах

**Шабалдин Андрей Владимирович**, доктор медицинских наук, доцент кафедры микробиологии, иммунологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (650056, Россия, г. Кемерово, ул. Ворошилова, д. 22 а); ведущий научный сотрудник лаборатории пороков сердца ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (650002, Россия, г. Кемерово, Сосновый бульвар, д. 6).

### Authors

**Dr. Andrey V. Shabaldin**, MD, DSc, Associate Professor, Department of Microbiology, Immunology and Virology, Kemerovo State Medical University (22a, Voroshilova Street, Kemerovo, 650056, Russian Federation); Leading Researcher, Laboratory of Congenital Heart Disease, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002, Russian Federation).

**Contribution:** convinced and designed the study, wrote the manuscript.  
**ORCID:** 0000-0002-8785-7896

**Вклад в статью:** разработка дизайна исследования, написание текста статьи.

**ORCID:** 0000-0002-8785-7896

**Деева Надежда Сергеевна**, младший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (650002, Россия, г. Кемерово, Сосновый бульвар, д. 6).

**Вклад в статью:** пробоподготовка образцов, проведение высокоэффективной жидкостной хроматографии, оформление статьи.

**ORCID:** 0000-0002-6162-4808

**Сухих Андрей Сергеевич**, кандидат фармацевтических наук, доцент, старший научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (650056, Россия, г. Кемерово, ул. Ворошилова, д. 22 а).

**Вклад в статью:** пробоподготовка образцов, организация и проведение высокоэффективной жидкостной хроматографии.

**ORCID:** 0000-0001-9300-5334

**Вавин Григорий Валерьевич**, кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической физиологии, медицинской и клинической биохимии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (650056, Россия, г. Кемерово, ул. Ворошилова, д. 22 а).

**Вклад в статью:** организация и проведение иммунологических исследований.

**ORCID:** 0000-0002-5171-8261

Статья поступила: 19.11.2020г.

Принята в печать: 30.11.2020г.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

**Dr. Nadezhda S. Deeva**, MD, Junior Researcher, Laboratory of Cell and Tissue Engineering, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002, Russian Federation).

**Contribution:** prepared the samples; performed high-performance liquid chromatography; wrote the manuscript.

**ORCID:** 0000-0002-6162-4808

**Dr. Andrey S. Sukhikh**, MD, PhD, Senior Researcher, Central Research Laboratory, Kemerovo State Medical University (22a, Voroshilova Street, Kemerovo, 650056, Russian Federation).

**Contribution:** prepared the samples; performed high-performance liquid chromatography.

**ORCID:** 0000-0001-9300-5334

**Dr. Grigoriy V. Vavin**, MD, PhD, Associate Professor, Department of Pathophysiology, Medical and Clinical Biochemistry, Kemerovo State Medical University (22a, Voroshilova Street, Kemerovo, 650056, Russian Federation).

**Contribution:** performed the flow cytometry and immunoelectrophoresis.

**ORCID:** 0000-0002-5171-8261

Received: 19.11.2020

Accepted: 30.11.2020

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.