

УДК 618.3-06:615.37:616.153.96

ВЛИЯНИЕ ПРЕИМУНИЗАЦИИ САМОК КРЫС ПЛАЦЕНТАРНЫМИ БЕЛКАМИ НА ГРАВИМЕТРИЧЕСКИЕ ФЕТОПЛАЦЕНТАРНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ В КОНЦЕ ИХ БЕРЕМЕННОСТИ**Коханов А.В., Ямпольская И.С., Луцева О.А., Пшанова М.К.***ГБОУ ВПО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, Астрахань, e-mail: kokhanov@mail.ru*

На 10 белых крысах, иммунизированных белками плаценты человека из пяти исследованных белков обнаружен максимальный титр антител к плацентарной щелочной фосфатазе (ПЩФ). 36 небеременных и нерожавших самок белых крыс, начиная с месячного возраста, иммунизировали очищенным ферментом ПЩФ. Установлено, что длительная иммунизация чужеродным плацентарным белком ПЩФ человека, индуцирующая у самок крыс до беременности гиперпродукцию антител к ПЩФ, в период беременности крыс оказывает угнетающее действие как на плод, так и на плаценту крыс. После эвтаназии крыс на 21 день наблюдается статистически достоверная задержка внутриутробного развития плодов с уменьшением массы плодов на 10% и плацентарная недостаточность с уменьшением массы последов на 6% по сравнению с параметрами при физиологическом течении беременности. Преимунизацией самок крыс препаратом чужеродной ПЩФ достигается срыв иммунологической толерантности к антигенам собственной плаценты крыс и моделируется аутоиммунная фетоплацентарная недостаточность.

Ключевые слова: лабораторные крысы-самки, иммунизация, белки плаценты, плацентарная щелочная фосфатаза, беременность, влияние аутоантител, гравиметрические фетоплацентарные показатели

INFLUENCE OF PREVIOUS IMMUNIZATION OF FEMALE RATS BY PLACENTAL PROTEINS ON GRAVIMETRIC FETOPLACENTAL INDICATORS AT THE END OF PREGNANCY**Kokhanov A.V., Yampolskaya I.S., Lutseva O.A., Pshanova M.K.***Astrakhan State Medical University, Astrakhan, e-mail: kokhanov@mail.ru*

For 10 white rats immunized with human placental proteins of the five examined proteins was found maximum titer of antibodies to placental alkaline phosphatase (PLAP). 36 non-pregnant and nulliparous female white rats, since months of age, were immunized with the purified enzyme PLAP. It is established that prolonged heterologous immunization of rats with human placental protein PLAP induces in female rats before pregnancy hyperproduction of antibodies against PLAP and in rats during pregnancy has an inhibitory effect on the fetus and the placenta. After euthanasia, the rats for 21 days is observed statistically significant intrauterine growth retardation with a decrease in fetal weight by 10% and placental insufficiency with decreasing mass placentas by 6% compared to the parameters in physiological pregnancy. Pre-immunization of female rats with drug of heterologous PLAP is achieved breakdown of immunological tolerance to antigens own placenta in rats and is modeled autoimmune fetoplacental insufficiency.

Keywords: laboratory female rat, immunization, placental proteins, placental alkaline phosphatase, pregnancy, influence of autoantibodies, gravimetric fetoplacental indicators

В научной литературе описано множество экспериментальных моделей нарушений в системе «мать – плацента – плод», имеющих своей целью воспроизведение на животных плацентарной недостаточности (ПН), хронической внутриутробной гипоксии (ХВГ) и синдрома задержки развития плода (СЗРП). В качестве повреждающего фактора предложены хроническая анемия за счет ежедневных кровопусканий или гемолизирующего эффекта сапонин-колларгола, гипобарическая гипоксия, модель теплового стресса, чрезмерные физические нагрузки, солевая диета, исключение из пищевого рациона аминокислот, жирных кислот и железа, умбиликоплацентарная эмболизация и другие оперативные вмешательства, направленные на нарушение маточно-плацентарного кровотока [2, 4, 5, 7, 8, 10].

Назначение этих моделей заключается не только в проверке гипотез ФПН и возможности изучения особенностей патогенеза ФПН, ХВГ и СЗРП, но и в их использовании на этапе доклинических испытаний для оценки эффективности новых лекарственных средств, разрабатываемых для коррекции вышеуказанной патологии [5].

Экспериментальных моделей, использующих в качестве повреждающего фактору фактора аутоантитела к плацентарным антигенам, в литературе не описано, несмотря на существующие гипотезы участия аутоиммунных механизмов в формировании фетоплацентарной недостаточности (ФПН) [6].

Цель исследования. Путем предварительной до беременности иммунизации самок крыс плацентарными белками человека и крысы добиться аутоиммунной реакции

к собственной плаценте в период беременности крысы и получить экспериментальную модель аутоиммунной плацентарной недостаточности (ПН) и сопутствующего ей синдрома задержки развития плода (СЗРП).

Материалы и методы исследования

В экспериментах использовали 46 самок белых крыс линии Wistar и 10 белых беспородных крыс, с 4-недельного до 3–5-месячного возраста, любезно предоставленных к.м.н., старшим научным сотрудником Давыдовым А.Г. из вивария ФГБУЗ «НИИ по изучению лепры». Для спаривания из этого же вивария временно отбирались 5–6-месячные самцы крыс Wistar. Масса самок крыс перед оплодотворением колебалась от 190 до 250 граммов. Для каждой серии экспериментов группы крыс включали по 5–10 животных.

В период экспериментальных исследований животных содержали в соответствии с «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием лабораторных животных», принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных целей (Страсбург, 1986) и приказа МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики» [5].

Для исключения реакции на новизну обстановки самок перед началом эксперимента выдерживали 10 дней в стационарных условиях вивария. Питание и питье животные получали *ad libitum*. Крыс содержали в виварии с естественным освещением при температуре 20–22 °С в клетках площадью 0,6 кв.м, не более 4 самок в каждой клетке. Для серологических исследований взятие крови у самок крыс осуществляли из хвостовой вены [5]. Иммунизацию крыс плацентарными белками проводили по классической схеме с полным и неполным адьювантом Фрейнда (ПАФ и НПАФ).

Ранее не рожавшие самки крыс после иммунизации плацентарными белками подвергались процедуре оплодотворения. Определялась фаза эстрального цикла, и самок в период диэструса подсаживали к самцу из расчета 4 самки на самца. Продолжительность периода спаривания не превышала 2-х недель. Отсчет сроков беременности вели с момента обнаружения сперматозоидов в вагинальных мазках [1]. Внешние признаки беременности определялись с конца второй недели. У самок увеличивалась окружность живота, наблюдался усиленный рельеф сосков и поведенческие особенности.

На 21 день беременности, за день до предполагаемых родов, проводили эвтаназию животных с помощью этиминал-натрия в дозе 60 мг/кг, осуществляли аутопсию самок и определяли число плодов и наличие пороков развития [1]. Для обнаружения внешних видимых аномалий развития все плоды обследовали под бинокулярным микроскопом типа МБС [5]. Взвешивание плодов и эмбрионов проводили при помощи весов ВЛТ-150. Всего гравиметрические и морфологические исследования проведены на 309 плодах крыс и таком же количестве последов.

Для определения в крови крыс антител к плацентарной щелочной фосфатазе (ПЩФ) применяли тест-системы, полученные самостоятельно [3]. Идентификацию антител и определение титра антител к белкам плаценты человека трофобластическому бе-

та-глобулину (ТБГ), плацентарному лактогену (ПЛ), хорионическому гонадотропину (ХГ) и плацентарному ферритину (Фрт) проводили с помощью иммунохимических наборов из банка тест-систем кафедры биохимии Астраханского ГМУ.

Полученные результаты подвергались статистической обработке с вычислением средних величин и их ошибок ($M \pm m$), достоверными считались различия при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

В предварительной серии экспериментов на 10 беспородных белых крысах, длительно иммунизированных экстрактом плаценты человека, нами оценивались титры антител к важнейшим плацентарным белкам человека – ХГ, ТБГ, ПЛ, ферритину и ПЩФ. Установлено, что через полтора месяца после иммунизации небеременных самок крыс экстрактом плаценты с ПАФ титры ПЩФ и Фрт были почти на порядок выше, чем титры сывороточных белков беременности – ХГ, ТБГ, ПЛ (рис. 1).

Поэтому для разработки аутоиммунной модели ФПН нами сделан выбор в пользу самого иммуногенного белка плаценты – ПЩФ. Кроме того, выбор в качестве иммуногена органоспецифического белка плаценты ПЩФ человека, а не водорастворимых белков, секретлируемых плацентой (ТБГ, ХГ, ПЛ), был связан с его большей чужеродностью для крыс. Во-первых, ПЩФ человека, в отличие от ТБГ, ХГ, ПЛ не имеет полного крысиного аналога, и, во-вторых, это тканевой, а не секретлируемый в кровь белок.

С целью получения гипериммунного ответа 36 небеременных и нерожавших самок белых крыс, начиная с месячного возраста, иммунизировали очищенным ферментом ПЩФ человека в дозе 10 мг/кг массы тела еженедельно (0,4% раствор ПЩФ в 0,4–0,5 мл) с ПАФ и НПАФ по классической схеме, двукратную реиммунизацию проводили с интервалом 1 месяц. В конце второго цикла реиммунизации в крови у всех крыс определяли титр антител к ПЩФ человека методом встречного иммуноэлектрофореза (табл. 1). Суммарная доза ПЩФ на циклы иммунизации-реиммунизации составляла 8–10 мг белка на крысу. Высокие титры антител к ПЩФ человека (1:32–1:64) перед спариванием выявлены у 21 из 36 сенсибилизированных крыс, средние титры (1:8–1:16) – у 8 животных и у остальных 7 животных обнаружены низкие титры АТ к ПЩФ человека (1:2–1:4). Животных, не отреагировавших на иммунизацию ксеногенным ПЩФ индукцией антителогенеза, в данной экспериментальной группе не было (табл. 1).

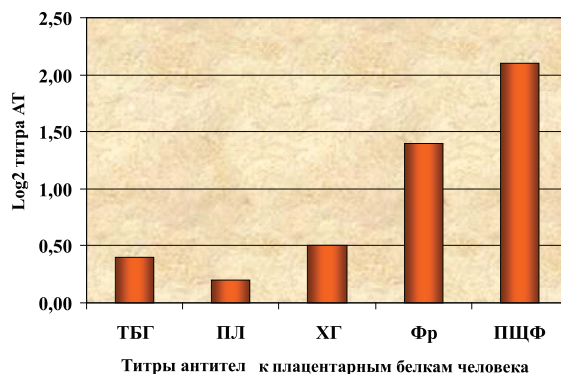


Рис. 1. Титры антител к плацентарным белкам человека в крови самок белых крыс через 1,5 месяца иммунизации экстрактом плаценты

Таблица 1

Число (*n*) иммунизированных до беременности самок крыс с высоким, средним и низким титрами антител к ПЩФ человека и крысы

Препарат для иммунизации	АТ abs	1:1–1:4	1:8–1:16	1:32–1:64
ПЩФ человека (<i>n</i> = 24)	–	3	4	17
ПЩФ крысы (<i>n</i> = 5)	5	–	–	–
Экстракт плаценты крыс (<i>n</i> = 7)	6	1	–	–
Всего животных (<i>n</i> = 36)	11	4	4	17

Попытки получить по той же схеме аутоантитела к аллогенной крысиной ПЩФ у небеременных самок крыс иммунизацией очищенным ферментом ПЩФ крысы или цельным экстрактом крысиной плаценты (табл. 1) не привели к выраженной аутоенсибилизации крыс – антитела к ПЩФ крысиной плаценты методом ВИЭФ не выявлены ни у одной из 5 крыс, иммунизированных крысиной ПЩФ, и отсутствовали у 5 из 6 крыс, иммунизированных пулом крысиных плацентарных белков. Только у одного животного, иммунизированного ЭКП, обнаруживались ААТ к ПЩФ крысы в низком титре – 1:1 (цельная сыворотка крови без разведения). Все крысы со слабым иммунным ответом на плацентарные белки также подвергались спариванию и входили в дополнительные группы контроля.

По мере оплодотворения беременные самки включались в одну из контрольных или основных экспериментальных групп. Группами контроля (табл. 2) служили 10 интактных крыс, не подвергавшихся иммунизации, и соответственно с физиологической беременностью (группа «ФБ»), а также объединенная группа, состоящая из 5 беременных крыс, безрезультатно иммунизированных ПЩФ крысы, и 7 крыс, иммунизированных крысиным плацентарным экстрактом (группа «АТ–»). Остальные 24 беременные крысы были последовательно по мере наступления беременности разделены на четыре экспериментальных

группы: одну группу из 7 беременных крыс, иммунизированных ПЩФ человека и имевших перед оплодотворением низкий и средний титр АТ к ПЩФ (группа «АТ+»), и 17 крыс с высоким титром АТ к ПЩФ (группа «АТ+++»). Из 17 крыс группы «АТ+++» было сформировано 3 подгруппы, из которых две подгруппы (11 животных) в период беременности получали дополнительное корректирующее воздействие и в данной работе не описываются. Данные по 6 интактным крысам группы «АТ+++» представлены в табл. 2.

Ни у одной из крыс во всех экспериментальных группах беременность самопроизвольно не прерывалась и донашивалась до 21 дня.

Средний двоичный логарифм титра в группе «АТ+» составил $2,7 \pm 0,42$, а в группе «АТ+++» $5,5 \pm 0,12$. Различия в логарифмах титров антител к ПЩФ между группами крыс «АТ+» и «АТ+++» высоко достоверны ($p < 0,001$).

Объектом нашего исследования, являлись плоды крыс в конце периода беременности, масса которых характеризует СЗРП, и их плаценты, масса которых отражает степень ПН. Во избежании самопоедания последов самкой крыс всем крысам из групп контроля и опыта на 21 день беременности проводилась эвтаназия.

После эвтаназии подсчитывали число крысят, у извлеченных плодов определяли основной параметр физического разви-

тия – массу тела (табл. 2). При визуальном исследовании последов оценивали степень кровенаполнения, изменения формы, цвета, консистенции. Длины новорожденных крысят и индексы массы тела (ИМТ) крысят

в табл. 2 не приведены, так как эти показатели статистически менее информативны массы крысят. То, что ИМТ при ЗРП менее информативен, чем масса плодов, подтверждается литературными данными [9].

Таблица 2

Гравиметрические признаки ФПН ($M \pm m$) в конце срока беременности у крыс с различным титром антител к ПЩФ

Группа, число животных, число плодов и последов	Среднее число плодов	Масса плодов (мг)	Масса плаценты (мг)
«ФБ» ($n = 10, 72$)	$7,2 \pm 0,36$	$4030 \pm 63,1$	$525,9 \pm 5,29$
«АТ-» ($n = 12, 81$)	$6,8 \pm 0,35$	$4107 \pm 80,1^{**}$	$522,8 \pm 5,04^{**}$
«АТ+» ($n = 7, 46$)	$6,6 \pm 0,37$	$3976 \pm 116,1^{**}$	$509,1 \pm 8,10$
«АТ+++» ($n = 6, 39$)	$6,5 \pm 0,43$	$3625 \pm 100,8^*$	$496,9 \pm 9,17^*$

Примечания:

* – $p < 0,001$ статистически значимые различия по сравнению с интактной группой крыс (ФБ);

** – $p < 0,01$ статистически значимые различия по сравнению с группой «АТ+++» с высоким титром антител к ПЩФ до беременности.

От 10 самок контрольной группы «ФБ» (табл. 2, рис. 2) было получено 72 плода со средней массой $4030 \pm 68,3$ мг. Средняя масса 72 последов крыс этой контрольной группы составила $525,9 \pm 5,29$ мг. Среднее число плодов и последов на интактную самку составило $7,2 \pm 0,36$, что выше, чем во всех остальных группах, однако статистически незначимо (табл. 2).

От 12 беременных крыс объединенной группы «АТ-», иммунизированных крысиными плацентарными белками (табл. 2, рис. 2), был получен 81 плод при среднем числе плодов и последов в помете $6,8 \pm 0,35$ на одну самку. Средняя масса новорожденных крысят составила $4107 \pm 80,1$ мг, что на 2% выше, чем у плодов интактных крыс, и статистически достоверно не отличалась от средней массы крысят в группе интактных беременных крыс. Средняя масса 81 последа крысят этой группы не отличалась от контрольной группы и составила $522,8 \pm 5,04$ мг.

От 7 самок контрольной группы «АТ+», с низким титром антител к ПЩФ (табл. 2, рис. 2) было получено 46 плодов со средней массой $3976 \pm 80,1$ мг, то есть почти со значениями массы контрольных крысят. Средняя масса 46 последов крыс была на 3% ниже массы плацент в контрольной группе и составила $530,33 \pm 5,88$ мг. Различие между группами статистически недостоверно (табл. 2).

От 6 самок группы «АТ+++», с высоким титром антител к ПЩФ (табл. 2, рис. 2) было получено 39 плодов со средней массой $3625 \pm 100,8$ мг, что статистически достоверно на 10% ниже, чем в контрольной группе «ФБ» ($p < 0,001$), на 12% ниже, чем в контрольной группе «АТ-» ($p < 0,001$), и на 9% ниже, чем в группе «АТ+» ($p < 0,01$). Полученные результаты свидетельствуют об отрицательном влиянии на эмбрион эффективной иммунизации самок крыс ПЩФ человека с развитием гипотрофии плода и СЗРП у беременных крыс этой группы.

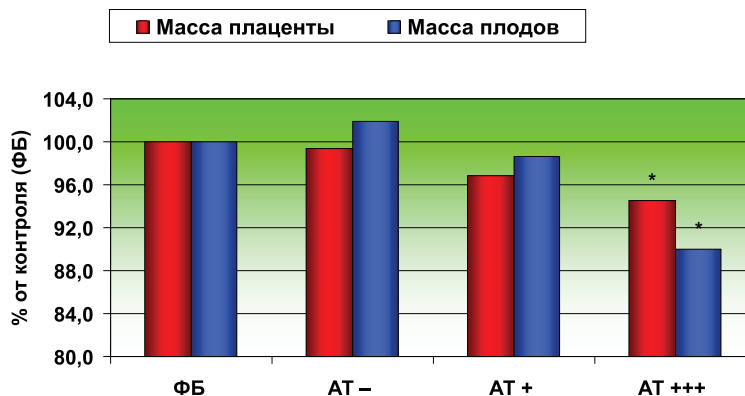


Рис. 2. Масса плодов и последов (в% к контролю) от беременных крыс, иммунизированных плацентарными белками крысы и человека

Средняя масса 39 последов крыс группы «АТ+++» составила $496,9 \pm 9,17$ мг, что статистически достоверно на 6% ниже, чем в контрольной группе «ФБ» ($p < 0,01$), на 5% ниже, чем в контрольной группе «АТ-» ($p < 0,01$), и статистически недостоверно на 2% ниже, чем в контрольной группе «АТ+». Это свидетельствует о признаках ПН у беременных крыс группы «АТ+++».

Таким образом, в процессе проведенных экспериментов на крысах установлено, что длительная иммунизация чужеродным плацентарным белком ПЩФ человека, индуцирует у самок крыс до беременности гиперпродукцию антител к ПЩФ, а в период беременности крыс оказывает угнетающее действие как на плод, так и на плаценту крыс с развитием аутоиммунной фетоплацентарной недостаточности. То есть преиммунизацией самок крыс препаратом ксеногенной ПЩФ мы добились срыва иммунологической толерантности к антигенам собственной плаценты крыс и получили новую аутоиммунную модель ФПН.

Показателем качества моделирования аутоиммунной ФПН на крысах является статистически достоверная задержка внутриутробного развития плодов с уменьшением массы плодов на 10% и плацентарная недостаточность с уменьшением массы последов на 6% по сравнению с параметрами при физиологическом течении беременности. Предлагаемая простая модель ФПН на крысах открывает новые перспективы в экспериментальном акушерстве.

Выводы

1. Установлено, что длительная иммунизация небеременных самок крыс очищенным чужеродным белком ПЩФ человека с адьювантом в дозе 10 мг/кг приводит к гиперпродукции антител к ПЩФ, которые в период беременности крыс оказывают депрессивное действие как на плод, так и на плаценту.

2. Следствием моделирования аутоиммунной фетоплацентарной недостаточности на крысах является статистически достоверная задержка внутриутробного развития плодов с уменьшением массы плодов на 10% и плацентарная недостаточность с уменьшением массы последов на 6% по сравнению с параметрами при физиологическом течении беременности.

3. Предлагаемая аутоиммунная модель ФПН на крысах может быть использована в экспериментальном акушерстве при оценке эффективности новых лекарственных средств, разрабатываемых для коррекции ПН и СЗРП.

Список литературы

1. Гамбарян П.П. Крыса / П.П. Гамбарян, Н.М. Дукельская. – М.: Советская наука, 1955. – 256 с.

2. Гармашева Н.Л. Введение в перинатальную медицину / Н.Л. Гармашева, Н.Н. Константинова. – М.: Медицина, 1978. – 294 с.

3. Коханов А.В. Разработка тест-системы для индикации сывороточных уровней плацентарной изоформы щелочной фосфатазы / А.В. Коханов, О.В. Мусатов, А.А. Мяснянкин, Р.И. Асфандияров, И.С. Ямпольская // Астраханский медицинский журнал. – 2011. – № 3. – С. 229–230.

4. Кузнецов Р.А. Патоморфология, профилактика и коррекция плацентарной недостаточности у крыс: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 2008. – 24 с.

5. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под общей редакцией члена-корреспондента РАМН, профессора Р.У. Хабриева. – 2-изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 2005. – 832 с.

6. Стрижаков А.Н., Тимохина Т.Ф., Баев О.Р. Фетоплацентарная недостаточность: патогенез, диагностика, лечение // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2003. – № 5. – С. 53–63.

7. Barry J.S. An animal model of placental insufficiency-induced intrauterine growth restriction / J.S. Barry, P.J. Rozance, R.V. Anthony // Semin. Perinatal. – 2008. – Vol. 32, № 3. – P. 225–230.

8. Ergaz Z. Intrauterine growth restriction-etiology and consequences: what do we know about the human situation and experimental animal models? / Z. Ergaz, M. Avgil, A. Ornoy // Reprod. Toxicol. – 2005. – Vol. 20, № 3. – P. 301–322.

9. Miller J. Fetal growth restriction / J. Miller, S. Turan, A.A. Baschat // Semin Perinatal. – 2008. – Vol. 32, № 4. – P. 274–280

10. Morrison J.L. Sheep models of intrauterine growth restriction: fetal adaptations and consequences // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. – 2008. – Vol. 35, № 7. – P. 730–743.

References

1. Gambarjan P.P. Krysa / P.P. Gambarjan, N.M. Dukel'skaja. M.: Sovetskaja nauka, 1955. 256 p.

2. Garmasheva N.L. Vvedenie v perinatal'nuju medicinu / N.L. Garmasheva, N.N. Konstantinova. M.: Medicina, 1978. 294 p.

3. Kohanov A.V. Razrabotka test-sistemy dlja indikacii syvorotochnyh urovnej placentarnoj izoformy shhelochnoj fosfatazy / A.V. Kohanov, O.V. Musatov, A.A. Mjasnjankin, R.I. Asfandijarov, I.S. Jampol'skaja // Astrahanskij medicinskij zhurnal. 2011. no. 3. pp. 229–230.

4. Kuznecov R.A. Patomorfologija, profilaktika i korekcija placentarnoj nedostatochnosti u krys: avtoref. dis. ... kand. med. nauk. M., 2008. 24 p.

5. Rukovodstvo po jeksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniju novyh farmakologicheskikh veshhestv / pod obshhej redakciej chlena-korrespondenta RAMN, professora R.U. Habrieva. 2-izd., pererab. i dop. M.: Medicina, 2005. 832 p.

6. Strizhakov A.N., Timohina T.F., Baev O.R. Fetoplacental'naja nedostatochnost': patogenez, diagnostika, lechenie // Voprosy ginekologii, akusherstva i perinatologii. 2003. no. 5. pp. 53–63.

7. Barry J.S. An animal model of placental insufficiency-induced intrauterine growth restriction / J.S. Barry, P.J. Rozance, R.V. Anthony // Semin. Perinatal. 2008. Vol. 32, no. 3. pp. 225–230.

8. Ergaz Z. Intrauterine growth restriction-etiology and consequences: what do we know about the human situation and experimental animal models? / Z. Ergaz, M. Avgil, A. Ornoy // Reprod. Toxicol. 2005. Vol. 20, no. 3. pp. 301–322.

9. Miller J. Fetal growth restriction / J. Miller, S. Turan, A.A. Baschat // Semin Perinatal. 2008. Vol. 32, no. 4. pp. 274–280

10. Morrison J.L. Sheep models of intrauterine growth restriction: fetal adaptations and consequences // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 2008. Vol. 35, no. 7. pp. 730–743.

Рецензенты:

Мамиев О.Б., д.м.н., профессор кафедры акушерства и гинекологии лечебного факультета, Астраханский государственный медицинский университет, г. Астрахань;

Тризно Н.Н., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии, Астраханский государственный медицинский университет, г. Астрахань.

Работа поступила в редакцию 29.12.2014.