

ЗНАЧЕНИЕ АУТОАНТИТЕЛ К ПЛАЦЕНТАРНЫМ БЕЛКАМ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ФЕТОПЛАЦЕНТАРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Коханов А.В., Ямпольская И.С., Бисалиева Р.А., Мамиев О.Б., Мяснянкин А.А.

ГБОУ ВПО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, Астрахань, Россия (414000, Астрахань, ул. Бакинская, 121), e-mail: kokhanov@mail.ru

В сыворотках крови 74 женщины с физиологическим течением беременности и 41 женщины с беременностью осложненной фетоплацентарной недостаточностью (ФПН), разделенными на подгруппы по степени тяжести плацентарной недостаточности (ПН) и синдрома задержки развития плода (СЗРП) I и II степени в сроки 10-14, 20-22, 30-32, 39-41 недель гестации методом встречного иммуноэлектрофореза (ВИЭФ) проведен поиск антител к плацентарным белкам. Исследовались три типа антиплацентарных аутоантител (ААТ): против специфического для плаценты мембранного белка ПЩФ (антиПЩФ ААТ), против тканевого межорганного плацентарного белка ферритина (ААТ к Фрт) и против пула растворимых белков плаценты альфа-глобулиновой природы (ААТ к АГП). В сыворотках 1,5-2,9% рожавших женщин доноров обнаружены аутоантитела ко всем белкам. Единичные случаи обнаружения ААТ к Фрт в крови и доноров, и беременных свидетельствуют о внегестационных причинах их образования. При физиологической и патологической беременности частота обнаружения ААТ к АГП увеличивается в процессе гестации. Впервые установлен факт появления антиПЩФ аутоантител, пропорциональный степени тяжести ФПН. Для доклинической оценки беременности, осложненной ФПН, рекомендуется определять антиПЩФ аутоантитела ВИЭФ-тестом на сроке 20-22 недели гестации.

Ключевые слова: беременность, плацентарная недостаточность, белки плаценты, плацентарная щелочная фосфатаза, аутоантитела в сыворотке крови, значение для диагностики.

THE IMPORTANCE OF AUTOANTIBODIES TO PLACENTAL PROTEINS FOR THE DIAGNOSIS OF FETO-PLACENTAL INSUFFICIENCY

Kokhanov A.V., Yampolskaya I.S., Bisaliev R.A., Mamiev O.B., Myasnyankin A.A.

Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russia (414000, Astrakhan, Bakinskaya street, 121), e-mail: kokhanov@mail.ru

In the serum of 74 women with physiological pregnancy and 41 women with pregnancy complicated by placental insufficiency (FPI), divided into subgroups by severity of placental insufficiency (PI), and fetal growth retardation (IUGR) I and II degree in terms of 10-14, 20-22, 30-32, 39-41 weeks of gestation by counter immunoelectrophoresis (CIEF) searched antibodies to placental proteins. Three types of anti-placental autoantibodies (AAB): against specific for placental membrane protein PLAP (anti PLAP AAT), against interorgan tissue placental protein ferritin (antiFrt AAT) and against pool of soluble placental proteins of alpha-globulin nature (antiAGP AAT) were investigated. In the sera of 1,5-2,9% of parous women-donors founded autoantibodies to all placental proteins. Single cases of detection antiFrt AAT in the blood of donors and pregnant women indicate about non-gestational reasons for their formation. The frequency of detection antiAGP AAT in physiological and pathological pregnancy increases during gestation. First established fact of the appearance of autoantibodies anti PLAP proportional to the severity of the FPI. For preclinical estimation of pregnancy complicated by FPI is recommended to determine antiPLAP autoantibodies by CIEF-test beginning with period 20-22 weeks of gestation.

Keywords: pregnancy, placental insufficiency, placental proteins, placental alkaline phosphatase, specific activity, autoantibodies in the serum, the importance for the diagnosis.

Оценка состояния системы мать-плацента-плод на основе изучения особенностей фетоплацентарного гомеостаза при физиологической и патологической беременности остается чрезвычайно актуальной проблемой современного акушерства и перинатологии [1, 7, 9]. По данным отечественных авторов фетоплацентарная недостаточность (ФПН) в акушерской практике остается широко распространенной патологией и встречается с частотой от 10 до

24% [1, 7]. Наиболее ранними проявлениями ФПН, еще до клинических проявлений синдрома задержки развития плода (СЗРП) и плацентарной недостаточности (ПН) являются инструментальные и биохимические маркеры нарушения метаболизма в плаценте, на улучшение диагностической эффективности которых нацелено внимание современных исследователей [1, 7, 9].

В этом аспекте актуальны исследования, посвященные диагностической ценности при беременности и ее осложнениях изменений уровней ряда так называемых естественных регуляторных аутоантител (ААТ), не связанных с аутоиммунной патологией [4, 5].

Доказана патологическая роль для развития нормальной беременности избыточной продукции ААТ к фосфолипидам [8], нативной и денатурированной ДНК [5]. Проводятся исследования, посвященные различным проблемам иммунопатологии беременности [1, 9].

Более перспективными представляются исследования, свидетельствующие об участии патологических аутоиммунных процессов в формировании нарушений фетоплацентарного гомеостаза у беременных с осложнениями гестационного периода.

В плане проверки гипотезу о роли аутоиммунных механизмов развития ФПН с участием плацентарных белков перспективными представляются исследования роли аутоантител к белкам плаценты, особенно в связи с появлением современных высокочувствительных иммунохимических методов регистрации антител в сыворотке крови (ИФА, иммунохроматографический и иммунохемилюминисцентный анализ).

Однако, по данным литературы, секретируемые плацентарные белки с гормональной активностью (плацентарный лактоген, хорионический гонадотропин и др.) не являются чужеродными антигенами для иммунной системы материнского организма, поэтому для поиска ААТ мы выбрали более иммуногенные тканеспецифические плацентарные белки, в первую очередь мембраносвязанный белок ПЩФ [2, 3].

Цель исследования. Обнаружить в крови беременных аутоантитела против ПЩФ и других плацентарных белков и определить их значения для диагностики фетоплацентарной недостаточности.

Материалы и методы. У 74 беременных женщин в возрасте от 18 до 35 лет с физиологическим течением периода гестации и у 41 женщины с беременностью, осложненной плацентарной недостаточностью I и II степени, в сроки 10-14, 20-22, 30-32, 39-41 недель гестации комплексно исследована сыворотка крови на наличие аутоантител. Забор крови у беременных для биохимических исследований осуществлялся на базе женской консультации ГБУЗ АО КРД г.Астрахани или в самом родильном доме путем венепункции из локтевой вены.

Клинический материал был собран на базе ГБУЗ АО «Городской клинический родильный дом» г.Астрахани. Все обследованные беременные (115 женщин) на основании оценки особенностей течения беременности и обследования состояния здоровья их 115 новорожденных ретроспективно были разделены на три клинические группы: 1) пациентки с физиологическим течением беременности, условно обозначенная как группа «ФБ» (n=74); 2) беременные с фетоплацентарной недостаточностью, обозначенная как группа «ФПН» (n=41) и разделенная по степени тяжести ПН на: 3) беременных женщин с компенсированной формой ПН, подгруппа «ПН I ст» (n = 28); 4) пациенток с беременностью, осложненной субкомпенсированной формой ПН, группа «ПН II ст» (n = 13). В качестве контрольной группы использовали 68 образцов сывороток крови женщин-доноров в возрасте от 23 до 50 лет, имевших в анамнезе срочные роды.

Клиническое обследование беременных, плодов и новорожденных осуществлялось с помощью стандартных клинических, лабораторных и биохимических методов, ультразвуковой диагностики, доплерометрии. Диагностика ЗРП до родов основывалась на данных наружного акушерского исследования и фетометрии.

Анализ данных акушерского анамнеза, течения беременности, родов, особенностей течения раннего неонатального периода проводился с использованием обменных карт и историй родов (уч. ф. № 96) и развития новорожденного (уч. ф. № 097/у), протоколов патологоанатомического исследования последов.

Признаки СЗРП различной степени тяжести выявлены у всех 13 беременных подгруппы «ПН II ст» и у 14 из 28 женщин подгруппы «ПН I ст».

Сыворотки крови разливались по аликвотам в маркированные пробирки Эппендорфа по 0,5 мл и без добавления консерванта хранились в замороженном виде при -20°C до момента проведения анализа.

Для идентификации аутоантител к белкам плаценты в сыворотках крови рожающих женщин-доноров и беременных применяли метод встречного иммуноэлектрофореза (ВИЭФ) [103]. При обнаружении аутоантител к Фрт или альфа-глобулиновой фракции экстракта плаценты результаты были видны через 30 минут, сразу после электрофореза, для выявления аутоантител к ПЩФ электрофореграммы дополнительно окрашивались на щелочную фосфатазу (рис. 2), при этом чувствительность выявления ААТ к ПЩФ возрастала на порядок и составляла 100 нг/мл.

В качестве антигенов для поиска антител использовали очищенные препараты ПЩФ и полученные самостоятельно [2, 6] и плацентарного ферритина (Фрт) из банка тест-систем кафедры биохимии Астраханского ГМУ. Так как ограничением метода ВИЭФ является высокая электрофоретическая подвижность тест-антигена, дающего реакцию преципитации

с антителами, выявленные нами в сыворотках женщин аутоантитела к белкам экстракта плаценты, относились к классу альфа-глобулинов плаценты (АГП).

Достоверность различий средних частот оценивали с использованием критерия χ^2 -квадрат. Результаты считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. В сыворотках крови женщин мы исследовали три типа антиплацентарных аутоантител (ААТ), которые естественно вне периода гестации в организме не синтезируются: против специфического для плаценты мембранного белка ПЩФ, против тканевого межорганного плацентарного белка ферритина (Фрт) и против общего пула растворимых белков плаценты альфа-глобулиновой природы (АГП). Причем, в данной работе перед нами была поставлена задача только поиска подобных ААТ к АГП, без уточнения их антительной специфичности.

Методом ВИЭФ при исследовании крови 68 женщин-доноров, имевших в анамнезе беременность и срочные роды, аутоантитела (ААТ) к Фрт обнаружены всего в двух из 68 образцов сывороток крови, причем в одном из образцов выявлены ААТ только к альфа-глобулинам плаценты (АГП), а в другом образце ААТ ко всем исследованным антигенам: и Фрт, и АГП, и ПЩФ. Таким образом, частота обнаружения аутоантител к плацентарным белкам в контрольных донорских сыворотках составила 1,5% ААТ к Фрт, 2,9% ААТ к АГП и 1,5% ААТ к ПЩФ (табл. 1).

Таблица 1

Частота выявления аутоантител (ААТ) к ПЩФ, Фрт и альфа-глобулинам плаценты (АГП) в сыворотках крови беременных с различным сроком гестации во взаимосвязи со степенью выраженности ПН и ЗРП, абс. (%)

Показатель	Срок гестации	ФБ (n=74)	ФПН (n=41)	ПН I (n=28)	ПН II (n=13)	ЗРП II (n=10)	Доноры (n=68)
ААТ к Фрт	10-12 нед	1 (1,4)	–	–	–	–	2 (1,5)
	20-22 нед	1 (1,4)	1 (2,4)	–	1 (7,7)	1 (10,0)	
	30-32 нед	1 (1,4)	2 (4,9)	1 (3,6)	1 (7,7)	1 (10,0)	
	39-41 нед	1 (1,4)	2 (4,9)	1 (3,6)	1 (7,7)	1 (10,0)	
ААТ к АГП	10-12 нед	1 (1,4)	1 (2,4)	–	1 (7,7)	1 (10,0)	4 (2,9)
	20-22 нед	2 (2,7)	3 (7,3)	1 (3,6)	2 (15,4)*	1 (10,0)	
	30-32 нед	4 (5,4)	3 (7,3)	1 (3,6)	2 (15,4)	1 (10,0)	
	39-41 нед	5 (6,8)	5 (12,2)	3 (10,7)	2 (15,4)	1 (10,0)	
ААТ к ПЩФ	10-12 нед	2 (2,7)	2 (4,9)	–	2 (15,4)*	1 (10,0)	2 (1,5)
	20-22 нед	5 (6,8)	5 (12,2)	3 (10,7)	2 (15,4)	2 (20,0)	
	30-32 нед	7 (9,5)	8 (19,5)	5 (17,9)	3 (23,1)	3 (30,0)	
	39-41 нед	6 (8,1)	10(24,4)*	7 (25,0)*	3 (23,1)	3 (30,0)*	

Примечание: * - $p < 0,05$ статистически значимые различия по сравнению с физиологической беременностью соответствующего срока гестации (группа «ФБ»).

ААТ к Фрт (табл. 1) из 74 женщин с ФБ обнаружены во все сроки гестации только у одной беременной (1,4%), из 41 женщины с беременностью, осложненной ФПН – у 2 (4,9%). Единичные случаи обнаружения ААТ к Фрт в крови и доноров, и беременных

свидетельствуют о внегестационных причинах их образования. Не исключено, что ААТ к ФрТ у этих беременных циркулировали в кровотоке и ранее до беременности.

Частота обнаружения ААТ к АГП (табл. 1) в сыворотке крови при физиологической беременности увеличивается в процессе гестации (1,4–2,7–5,4–6,8%) и при беременности осложненных ФПН (2,4–7,3–7,3–12,2%). Однако существенных различий в повышении частоты обнаружения ААТ между группами «ФБ», «ФПН» и донорами не выявлено. Причиной этого может быть низкая чувствительность метода ВИЭФ в отношении ААТ к АГП (500-1000нг/мл).

В сыворотках крови беременных из подгруппы «ПН II» ААТ к АГП обнаружены на 10-12 неделях гестации в 1 образце (7,7%) и в 2 образцах из 13 (15,4%) во все остальные сроки гестации, причем на 20-22 неделе процент выявления ААТ к АГП в подгруппе «ПН II» достоверно выше ($p < 0,05$), чем в группе «ФБ» (табл. 1). Частота выявления ААТ к АГП в подгруппе «ЗРП II» постоянная (10%) во все сроки за счет единственной беременной.

При физиологической беременности (табл. 1, рис.1) ААТ к ПЩФ на 10-12 неделе обнаружены в двух образцах из 74 беременных группы «ФБ» (частота выявления – 2,7%). Начиная с 20-22 недели, и вплоть до родов частота выявления ААТ к ПЩФ в группе «ФБ» составляла 6,8% на 20-22 неделях, 9,5% на 30-32 неделях и 8,1% на 39-41 неделях гестации, вплоть до 30-32 недели, достоверно отличаясь от фоновых значений частоты аутоантител у рожавших женщин-доноров.

В сыворотках крови женщин с беременностью, осложненной ФПН (табл. 1, рис.1), частота выявления антиПЩФ ААТ в этот срок составила на 10-12 неделе 4,9% (2/41), на 20-22 неделе 12,2%, на 30-32 неделе – 19,5% и на 39-41 неделе гестации – 24,4%

Как демонстрирует рис. 1, на протяжении третьего триместра до родов при физиологической беременности наблюдалось плато, в отличие от всех вариантов патологической беременности, когда к 39-41 неделях гестации происходит дальнейший рост частоты выявления ААТ. При этом различия между группами с физиологической и патологической беременностью перед родами по критерию χ -квадрат становятся статистически достоверными: аутоантитела против ПЩФ при ФПН встречаются перед родами в 3-4 раза чаще, чем при ФБ (табл. 1).

У беременных из группы «ФПН» частота выявления ААТ к ПЩФ (была достоверно выше контрольных донорских цифр на 20-22 неделях ($p < 0,05$), на 30-32 неделях ($p < 0,001$) и на 39-41 неделях гестации ($p < 0,001$). Сравнивая с донорами, достоверно более высокая встречаемость ААТ к ПЩФ установлена во всех подгруппах женщин с беременностью, осложненной ПН и СЗРП, начиная с 20-22 недель гестации (в 8-20 раз чаще).

У беременных женщин из подгруппы «ЗРП I» антиПЩФ ААТ обнаружены (рис. 1) на 10-12 неделях гестации в одном образце (5,9%), на 20-22 неделях в 2 образцах (11,8%), на 30-32 неделях обнаружены в 3 образцах из 17 (17,6%), а на 39-41 неделях гестации – в 5 образцах (29,4%). При этом, ни на одном из сроков беременности частота обнаружения антител к ПЩФ достоверно от группы «ФБ» по критерию χ^2 -квадрат не отличалась. В то же время значения частот были достоверно выше донорских цифр на 20-22 неделях ($p < 0,05$), на 30-32 неделях ($p < 0,01$) и на 39-41 неделях гестации ($p < 0,01$).

Таким образом, нами впервые установлен факт появления антиПЩФ аутоантител, пропорциональный степени тяжести ФПН, поэтому положительный ВИЭФ-тест на аутоантитела к ПЩФ может служить индикатором гестации, осложненной ПН и СЗРП. Следовательно, обнаружение в крови беременной антиПЩФ аутоантител ВИЭФ-тестом на сроке 20-22 недели гестации требует перевода беременной в группу риска по ФПН и ее немедленного углубленного обследования.

Обнаруженные нами закономерности не исключают регулирующей роли антител к ПЩФ и другим плацентарным белкам в механизмах роста и развития плаценты и плода, а при их дисбалансе – в формировании ПН и СЗРП.

Выводы

1. Методом встречного иммуноэлектрофореза в сыворотках крови рожавших женщин доноров обнаружены аутоантитела к ферритину у 1,5% обследованных, к пулу плацентарных белков альфа-глобулиновой природы – у 2,9% и к ПЩФ – у 1,5% доноров.

2. Единичные случаи обнаружения аутоантител к ферритину в крови женщин при физиологической и осложненной беременности не превышают фоновых частот встречаемости аутоантител к ферритину у доноров, что свидетельствуют о внегестационных причинах их появления в кровотоке.

3. Обнаружено, что частота регистрации аутоантител против белков плаценты альфа-глобулиновой природы в сыворотке крови при физиологической беременности увеличивается в процессе гестации (1,4–2,7–5,4–6,8%) и при беременности осложненных ФПН (2,4–7,3–7,3–12,2%). Однако достоверных различий в частоте встречаемости аутоантител к плацентарным белкам между группами «ФБ», «ФПН» и донорами не выявлено из-за низкой чувствительности метода детекции.

4. Установлен факт увеличения частоты обнаружения антиПЩФ аутоантител, пропорциональный степени тяжести ФПН, поэтому положительный ВИЭФ-тест на аутоантитела к ПЩФ может служить индикатором гестации, осложненной ПН и СЗРП.

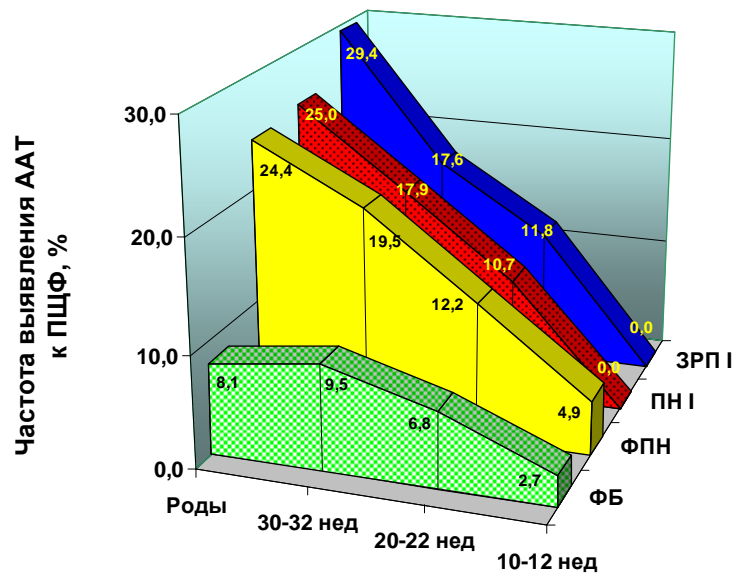


Рис. 1. Частота выявления ААТ к ПЩФ в крови беременных в различные сроки гестации при физиологической беременности (ФБ) и в зависимости от степени тяжести ПН и СЗРП.

Список литературы

1. Акушерство: Национальное руководство / Под ред. Э.К. Айламазяна и др. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 800 с.
2. 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.
3. Коханов А.В. Плацентарная щелочная фосфатаза и научное наследие профессора Р.И. Асфандиярова / Коханов А.В., Сухарев А.Е., Ямпольская И.С., Кривенцев Ю.А., Луцева О.А. // Астраханский медицинский журнал. – 2013. – №1. – С. 133-137.
4. Крылова Ю.В. Прогнозирование развития плацентарной недостаточности по содержанию ряда регуляторных аутоантител в сыворотке крови беременных: автореф. дис. канд. мед. наук. – М., 2004. – 27 с.
5. Мальцева Л.И. Клиническое значение регуляторных аутоантител в развитии плацентарной недостаточности у женщин с отягощенным акушерским анамнезом / Л.И. Мальцева [и др.]. // Гинекология. – 2005. – Т. 11, № 5. – С.86-88.
6. Патент России № 2492868. 2013, Бюл. № 13

7. Серов В.Н. Современные представления о лечении плацентарной недостаточности / В.Н. Серов, В.Л. Тютюнник, О.И. Михайлова // РМЖ. Акуш. и гинекол. – 2010. –Т. 18., № 4. – С. 157–162
8. Сидельникова, В.М. Антифосфолипидный синдром в акушерской практике // Новые медицинские технологии в акушерстве, гинекологии и неонатологии / Под ред. Т.А. Федоровой. – М., 2005. – С. 39–45.
9. Сухих Г.Т. Иммунология беременности / Г.Т. Сухих, Л.В. Ванько. – М., Издательство РАМН, 2003. – 400 с.
- 10 Kohn J. Method for the detection and identification of α 1-fetoprotein in serum // J. Clin. Path. 1970. – Vol. 23. – P. 733

Рецензенты:

Николаев А.А., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой химии, Астраханский государственный медицинский университет, г.Астрахань.

Молдавская А.А., д.м.н., профессор, профессор кафедры анатомии, Астраханский государственный медицинский университет, г.Астрахань.