

O. S. Mankovska, T. K. Ternovska, M. Z. Antonyuk

CYTOLOGICAL STABILITY AND VIABILITY OF INTROGRESSIVE LINES WITH GAMETOCIDAL CHROMOSOME 4S^L AND THEIR HYBRIDS

Summary. Common wheat introgressive lines T. aestivum/Ae. sharonensis with and without gametocidal chromosome 4S^L were studied as to their cytological stability, seed germination, and fertility of the F₁ hybrids from crossing of these lines with the introgressive цмyи of another pedigree and the common wheat varieties. Byizuey some cytological instability of the lines and their hybrids and reduced seed germination of most lines they were revealed suitable for use in crossing with another introgressive lines and common wheat varieties as inductor of chromosome rearrangement due to formation of euploid plants of certain fertility level.

УДК 618.2/3:611–018.54:618.29:612.014.24

Бадюк В. М., Білько Н. М., Бариляк І. Р.

ІМУНОРЕАКТИВНІСТЬ СИРОВАТКИ КРОВІ ВАГІТНИХ З ХРОМОСОМНОЮ ПАТОЛОГІЄЮ ПЛОДА

У статті представлені дані оригінального дослідження, що стосується вивчення імунореактивності (ембріотропних антитіл) сироватки крові вагітних із встановленою хромосомною патологією (ХП) плода. У вагітних з ХП плода не відмічено жодного випадку нормальної реактивності сироватки крові. У групі дослідження визначено зміну реактивності сироватки в бік збільшення продукції антитіл (АТ) проти колагену, білків S100 та MP65, що може розглядатись як потенційний маркер ХП плода для скринінгу вагітних.

Вступ

Плацента є анатомічним та імунним бар'єром між організмами матері та ембріона. Нині накопичено дані про участь гуморальних та клітинних механізмів у регуляції розвитку ембріона та плода [1]. Вдалося ідентифікувати деякі регуляторні антитіла (АТ) класу IgG, що синтезуються в материнському організмі, рівень яких виявляється критично важливим для нормального розвитку ембріона і плода людини. До таких «ембріотропних регуляторів» відносять, наприклад, АТ до основного білка мієліну, білків S100, ACBP14/18 (еволюційно консервативний білок, що належить до групи негістонових аніонних білків хроматину, міцно зв'язаних з ядерною ДНК) та MP65 (еволюційно консервативний мембранний білок, що бере участь у процесах міжклітинної адгезії; представник надродини імуноглобулінів). Було встановлено, що концентрація цих АТ у нормальних умовах (у здорових

жінок репродуктивного віку) підтримується у вузьких фізіологічних межах (в діапазоні 150–250 нг/мл у сироватці периферійної крові). У той же час у жінок, які мали проблеми з несприятливими закінченнями вагітностей, концентрація ембріотропних (ембріотоксичних) АТ виходить за експериментально встановлені межі фізіологічної норми [5].

Природні регуляторні антитіла синтезуються в організмі кожної здорової людини і беруть участь в регуляції активності клітин різних типів. Продукція таких антитіл у нормі підтримується у вузькому діапазоні. Вміст деяких відомих антитіл (IgG) можливо визначити за допомогою імуноферментних досліджень [8].

Для виявлення специфічних імунних змін, що можуть впливати на діяльність клітин різних типів, які визначають функціональну активність органів та тканин, з 1996 року в медичній практиці почали застосовувати методи групи ЕЛІ-тест (ELISA-detected probability of pathology) [7].

Ці методи дозволяють виявляти аномалії в сироватковому вмісті маркерних ауто-АТ класу IgG певної антигенної специфічності. У результаті аналізу визначаються особливості імунореактивності сироватки, що відображають зміни у продукції та секреції певних ауто-АТ. Для жінок репродуктивного віку використовують тест «ЕЛП-П-комплекс», що застосовують як для вагітних (для прогнозу виникнення акушерських ускладнень), так і для жінок з репродуктивними втратами для визначення порушень імунної системи.

Метою дослідження було визначення характеру реактивності сироватки крові вагітних із встановленою ХП плода.

Матеріали та методи

Тест-системи «ЕЛП-П-комплекс», що використовували в даному дослідженні, розроблені для оцінки вмісту в сироватці периферійної крові низку ауто-АТ, необхідних для здійснення репродуктивної функції та нормального перебігу гестаційного процесу: антитіла (IgG) до хоріонічного гонадотропіну людини (ХГЛ), двоспиральної ДНК, β_2 -глікопротеїну, до АТ проти β_2 -глікопротеїну (анти-АТ), Fc-фрагмента імуноглобулінів, колагену, білків S100 та MP65 [6, 7].

Дослідження ембріотоксичних антитіл у жінок з ХП плода (11 вагітних) та в контрольній групі (11 випадків) проводили методом твердофазного імуоферментного аналізу [3] на аналізаторі Chemwell відповідно до інструкції виробника тест-систем «ЕЛП-П-комплекс» (МІЦ «Іммунокулос», Росія). Вміст ембріотропних антитіл визначали напівкількісно в парних сироватках за середнім арифметичним і порівнювали з розрахунками для контрольної сироватки. Оцінка результатів для кожної сироватки була комплексною для всіх антигенів, на її підставі робили висновок про імунореактивність сироватки вагітної за категоріями: нормореактивність, гіпореактивність, гіперреактивність та нескоординовані зміни.

Результат розраховували за відповідною формулою згідно з інструкцією виробника. Нормальна реакція (нормореактивність) сироватки визначали на підставі розрахованих значень від -25% до $+30\%$. Гіпореактивність визначали, якщо хоча б одне розраховане значення менше -35% , за умови, що решта не перевищують $+30\%$. Гіперреактивність сироватки визначали, якщо хоча б один показник перевищує $+40\%$, при тому, що решта знаходяться в межах до -25% . Якщо значення для певної сироватки крові виходять за межі від -35% до $+40\%$, то це свідчить про нескоординовані зміни її імунореактивності.

Межі нормальних рівнів антитіл до антигенів було визначено виробником тест-системи «ЕЛП-П-комплекс» на основі аналізу зразків сироватки

крові в першому триместрі вагітності у 500 клінічно здорових жінок з фізіологічним перебігом вагітності, які в подальшому народили клінічно здорових дітей. Однак в доступній літературі відсутні дані про визначення рівнів ембріотоксичних антитіл у сироватці крові вагітних з ХП плода під час вагітності. Така робота проведена в Україні вперше.

Результати та обговорення

За період дослідження доступною для визначення ембріотоксичних антитіл виявилась сироватка крові 11 вагітних із цитогенетично підтвердженою ХП плода. Оскільки частота ХП, яка виявляється в першій половині вагітності при масових дослідженнях, зменшується зі збільшенням терміну вагітності і в терміні, наприклад, 16 тижнів для трисомії хромосоми 21 у плода вагітної 30 років становить 1:703, виявлення 11 випадків ХП плода за період дослідження ми вважали достатньою групою для визначення вмісту ембріотоксичних антитіл. Результати дослідження антитіл та каріотипи (хромосомні набори) плодів, у порядку їх виявлення, наведено в табл. 1. Вік вагітної та термін вагітності зазначено на момент визначення імунореактивності сироватки крові, що відбувалось в період від 3 до 7 днів від встановлення патологічного каріотипу плода.

Таблиця 1. Імунореактивність сироватки крові вагітних з хромосомною патологією плода

№ з/п	Каріотип плода	Вік вагітної	Термін вагітності	АТ до, %							
				ХГЛ	ДНК	гп	ат-гп	Fc-фрагменту	колагену	S100	MP65
1	47,XY,+21	36	12	-0,2	-10	-20	-11	-27	-15	22	102
2	47,XX,+21	36	11	-31	-47	-20	-27	-44	43	60	12
3	47,XY,+21	32	19	-4	-21	-47	-54	-55	3	-26	68
4	47,XY,+21	36	19	-25	-14	-21	-31	-31	-17	-5	-29
5	47,XY,+21	23	20	-42	-62	-55	-60	-24	-14	-14	-38
6	47,XX,+21	38	19	9	407	-28	-4	-14	147	292	215
7	47,XY,+21	26	21	-6	4	-11	-17	-13	63	75	69
8	45,X	30	12	-28	-37	25	-37	-38	3	-14	3
9	47,XX,+21	25	19	-68	-23	-36	-45	-21	-10	-41	-15
10	69,XXY	28	19	27	-27	-23	-37	-16	50	-16	14
11	47,XX,+21	40	21	-11	-6	-53	-56	-42	-47	-42	-38

У групі дослідження було виявлено таку хромосомну патологію: 9 випадків трисомії 21 хромосоми (5 – при чоловічому каріотипі плода та 4 – при жіночому), один випадок моносомії X-хромосоми та один випадок триплоїдії. Тільки у трьох випадках (27,3 %) діагноз було встановлено в першому триместрі вагітності, в інших восьми випадках (72,7 %) – у терміні 19–21

тиждень, який є критичним з точки зору встановлення хромосомної патології плода та переривання вагітності за медичними показаннями (до 22 тижнів згідно з наказом МОЗ № 503) [3]. У жодному випадку не було відмічено ультразвукових ознак внутрішньоутробного інфікування плода або інфекційно-запальних захворювань вагітної, які могли б вплинути на рівні ембріотропних антитіл у сироватці вагітної за рахунок загального підняття рівнів імуноглобулінів внаслідок поліклональної активації лімфоцитів.

Оскільки не завжди хромосомна патологія виявляється в першому триместрі, на який розраховано контрольні величини сироватки тест-системи «ЕЛІ-П-комплекс», і при дослідженні ембріотоксичних антитіл середній термін вагітності становив $17,5 \pm 0,34$ тижні, що відповідає середині другого триместру вагітності, методом послідовного аналізу (включення в дослідження по одному парному випадку) було досліджено контрольну групу, що складалася з 11 вагітних жінок, котрі протягом терміну дослідження перебували на обліку та спостерігались у жіночій консультації ТОВ «Академічна клініка» м. Києва.

У всіх вагітних з контрольної групи вагітність проходила без ускладнень, при проведенні комбінованого генетичного скринінгу ризик ХП плода мав низьке значення (менше 1:1000) і вагітності завершилися народженням клінічно здорових дітей. Результати дослідження ембріотропних антитіл у контрольній групі наведено в табл. 2. Вік вагітної та термін вагітності вказано на день отримання сироватки крові для аналізу імунореактивності.

Таблиця 2. Імунореактивність сироватки крові вагітних, що народили клінічно здорових дітей (контрольна група)

№ з/п	Вік вагітної	Термін вагітності	АТ до, %							
			ХГЛ	ДНК	гп	ат-гп	Fc	Колаген	S100	MP65
1	23	10	-55	-63	-58	-52	-37	-1	-55	10
2	37	19	-71	-33	-22	-70	-26	-6	-23	-16
3	29	21	-67	-22	-17	-24	-70	-19	23	-15
4	38	11	-17	-24	-25	-12	-31	-39	-29	-29
5	28	12	-32	-59	-49	-19	-51	-22	-33	-34
6	33	11	-14	-22	34	38	25	15	32	-21
7	25	16	2,4	30	-14	-15	-35	-7	35	13
8	26	17	-3	12	-20	-19	-11	26	18	17
9	37	18	-28	-27	-27	-30	-33	-8	17	23
10	27	18	22	-19	-12	-18	-51	33	33	9
11	29	19	-43	-30	-36	-11	-5	-10	3	29

Середній вік жінок у групі дослідження становив $31,8 \pm 1,7$ років, у контрольній групі $30,2 \pm 1,6$ років, при середньому терміні вагітності $15,6 \pm 0,36$ тижнів.

У контрольній групі імунореактивність сироватки була визначена в 4 випадках (36,4 %), в інших 7 випадках виявлена гіпореактивність (63,6 %). Не виявлено жодного випадку гіперреактивності та нескординованих змін. У дослідженні Старцевої [10] було отримано подібні результати для вагітностей, що мають фізіологічний перебіг, а саме – випадки імунореактивності та гіпореактивності сироватки крові вагітних в другому та третьому триместрах, що може свідчити про ознаки часткового пригнічення продукції АТ при збільшенні терміну вагітності.

На відміну від контрольної групи, у групі дослідження не виявлено жодного випадку імунореактивності сироватки. Гіпореактивність сироватки встановлено у 5 випадках (45,5 %), гіперреактивність – у 3 випадках (27,25 %) і нескординовані зміни також у 3 випадках (27,25 %). Слід зауважити, що в усіх випадках нескординованих змін імунореактивності сироватки при ультразвуковому обстеженні плода були виявлені ознаки загрози переривання вагітності, що не спостерігались при інших станах (гіпо- та гіперреактивності).

У нашому дослідженні результати вимірювань концентрації АТ до ХГЛ, β_2 -глікопротеїну, АТ- β_2 -глікопротеїну та Fc-фрагмента імуноглобулінів мали однакову тенденцію в обох групах: не було визначено жодного випадку гіперреактивності до цих агентів (значення не перевищували +40 %), але відмічалось зниження всіх показників у бік гіпореактивності (менше -35 %).

При аналізі антитіл до ДНК у контрольній групі імунореактивність сироватки спостерігалась у 9 випадках (81,8 %), у двох випадках відмічена гіпореактивність (18,2 %). У групі дослідження імунореактивність відмічена в 7 випадках (63,6 %), гіпореактивність – у 3 (27,3 %), в одному випадку (9,1 %) – значна гіперреактивність (рівень антитіл 407 %), причому вагітна не скаржилась на проблеми зі здоров'ям, а у плода з трисомією хромосоми 21 не було відмічено вад розвитку.

При дослідженні антитіл до колагену було визначено, що в контрольній групі нормальні значення були в 10 випадках (90,9 %), в одному випадку (9,1 %) відмічена незначна гіпореактивність (-39 %). У групі дослідження в 6 випадках (54,5 %) реактивність сироватки була в межах нормальних значень, в одному випадку (9,1 %) визначена гіпореактивність, в 4 випадках – значна гіперреактивність (37,4 %).

Оскільки відомо, що зміна рівнів антитіл до білків S100 та MP65 впливає на нормальний процес ембріогенезу і може викликати порушення розвитку плода, визначені рівні проаналізовані з точки зору виявлених вад розвитку плодів з хромосомною патологією та контрольної групи.

Слід зазначити, що в контрольній групі тільки в одному випадку відзначена гіпопродукція анти-тіл до білка S100 (–55 %); дитина народилась клінічно здоровою. В інших випадках контрольної групи рівні антитіл до обох білків були в межах норми (див. табл. 2). При аналізі рівнів антитіл до білка S100 в групі дослідження визначено, що в 6 випадках (54,5 %) регуляторні анти-тіла продукувались у межах норми. Гіпореактивність спостерігалась у 2 випадках (18,2 %), значна гіперреактивність – у 4 випадках (36,4 %).

Нормореактивність сироватки за рівнем антитіл до білка MP65 у групі дослідження виявилась тільки в 4 випадках (36,4 %). Гіпореактивність визначена у 3 випадках (27,3 %), значна гіперреактивність – в 4 випадках (36,4 %) (рис. 1).

Як відомо, ХП плода не завжди супроводжується вродженими вадами розвитку (ВВР), які можна діагностувати до народження [9]. За результатами ультразвукових досліджень (УЗО) вагітних групи дослідження встановлено, що ВВР відмічено у 4 плодів (36,4 %), з них у двох – множинні ВВР (в одному випадку при трисомії хромосоми 21 та в одному – при триплодії), виявлені при повторному УЗО після скринінгового дослідження під час визначення хромосомного набору плода. У двох плодів діагностовано ВВР серця (тетрада Фалло та AV-комунікація у плодів з трисомією хромосоми 21). Всі вади розвитку встановлено в терміні 19–21 тиждень вагітності. Аналіз імунореактивності сироватки крові при ВВР плода показав 3 випадки гіпореактивності та 1 випадок нескоординованих змін (при трип-

лоїдії, що супроводжувалась множинними ВВР у плода).

Таким чином, можемо відзначити, що в нашому дослідженні ХП плода в більшій частині випадків супроводжувалась порушенням з боку імунної системи матері, що проявлялось зміною продукції ембріотропних АТ (гіпо- та гіперреактивністю). При цьому настання вагітності та її розвиток не супроводжувалися будь-якими відхиленнями. На думку деяких авторів [1, 6], порушення імунореактивності при вагітності, що супроводжується ХП плода, може бути спрямоване на створення несприятливих умов для розвитку плода з ХП та його елімінації. Ми вважаємо перспективними дослідження динаміки порушення імунореактивності у вагітних з ХП плода, а також, вивчення можливості використання ембріотропних АТ (до колагену, білків S100 та MP65) для скринінгу вагітних з метою виявлення ХП плода.

Висновки

Аналіз імунореактивності сироватки крові у жінок з ХП плода виявив випадки гіперреактивності та нескоординованих змін, що не було відзначено в контрольній групі. Виявлено, що випадки гіперреактивності сироватки крові вагітних з ХП плода при застосуванні тесту «ЕЛІП-П-комплекс» стосувались тільки антитіл до колагену, білків S100 та MP65, що може бути використане для визначення можливості застосування зазначених типів антитіл у скринінгових дослідженнях як додаткових маркерів для виявлення вагітних із підвищеним ризиком ХП плода.

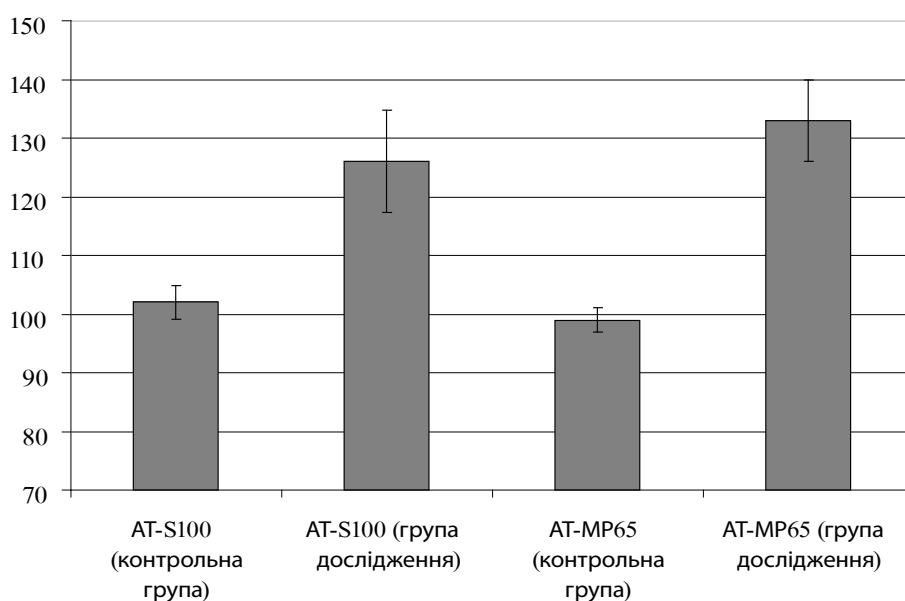


Рис. 1. Порівняння рівнів ембріотоксичних антитіл до білків S100 та MP65 у групі дослідження та контрольній групі

1. Полетаев А. Б., Кузьменко Л. Г. Иммунологическая диагностика / А. Б. Полетаев, Л. Г. Кузьменко. – М. – 2006. – 47 с.
2. Медицинские лабораторные технологии. Справочник / Под ред. проф. А.И.Карпищенко. – СПб.: Интермедика. – 2002. – С. 413–446.
3. Наказ Міністерства Охорони Здоров'я від 28.12.02 р. № 503 «Про удосконалення амбулаторної акушерсько-гінекологічної допомоги в Україні». – <http://www.moz.gov.ua/ua/main/docs/?docID=11353>.
4. Полетаев А. Б. Инновационные подходы к раннему выявлению патологических изменений в организме человека (основы перехода от лечебной к профилактической медицине) / А. Б. Полетаев. – М.: Иммунодиагностика, 2008. – 24 с.
5. Полетаев А. Б. Инфекция беременной и патология плода и новорожденного / А. Б. Полетаев // Практическая медицина. – 2003. – № 3. – С. 21–26.
6. Полетаев А. Б. Клиническая и лабораторная иммунология: Избранные лекции / А. Б. Полетаев. – М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2007. – 184 с.
7. Полетаев А. Б. Состояние системы естественного аутоиммунитета у женщин фертильного возраста и риск нарушений развития эмбриона и плода / А. Б. Полетаев, Н. К. Вабищевич // Вестник Рос. ассоц. акуш. гинекол. – 1997. – № 4. – С. 21–4.
8. Полетаев А. Б., Вабищевич Н. К., Морозов С. Г. Способ скринингового обследования женщин детородного возраста с помощью тест-системы ELI-P для прогноза развития эмбриона и плода и рождения здорового либо аномального ребенка: Пат. № 2107913 Российская Федерация от 27 марта 1998.
9. Сенчук А. Я. Безопасное материнство (физиологическая беременность). Руководство для врачей / А. Я. Сенчук, Б. М. Венцовский, А. В. Заболотная, А. В. Чернов. – Нежин: Гидромакс, 2008. – 180 с.
10. Старцева Н. М. Резервы снижения перинатальной заболеваемости и смертности детей с задержкой развития плода при недоношенной беременности: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня доктора мед. наук / Н. М. Старцева. – М., 2006. – 62 с.

V. Badiuk, N. Bilko, I. Baryliak

REACTIVITY OF IMMUNE SYSTEM OF PREGNANT WOMEN WITH FETUS'S CHROMOSOMAL ABNORMALITY

The results of original research devoted to the investigation of immune system's reactivity (embryotoxic auto-Abs) in serum from pregnant women whose fetuses had chromosomal pathology (11 cases). Normal reactivity was not detected in serum from any pregnancies with chromosomal pathology of fetuses. The significant increase of serum reactivity was observed only for auto-Abs against proteins S100, MP-65 and collagen. Obtained results can be used for maternal serum screening.

УДК 616-006:57.083.3

Симчич Т. В., Караман О. М., Юдіна О. Ю., Євстрат'єва Л. М., Дідківська Л. П., Воєйкова І. М., Діденко Г. В., Лісовенко Г. С., Потебня Г. П.

ВИВЧЕННЯ ТОКСИЧНОГО ТА ІМУНОМОДУЛЮЮЧОГО ЕФЕКТІВ ЕМБРІОНАЛЬНИХ КУРЯЧИХ ПРОТЕЇНІВ У МИШЕЙ ЛІНІЇ BALB/C

Показано, що введення ембріональних курячих протеїнів (ЕКП) не чинило токсичного впливу на організм мишей лінії Balb/c та не викликало запальних процесів у дослідних тварин. Введення ЕКП не призводило до активації природних кілерних клітин та перитонеальних макрофагів, що визначали у МТТ та НСТ-тестах відповідно. Натомість, у імунізованих тварин реєстрували індукцію синтезу специфічних до ЕКП антитіл.

Вступ

Проблема підвищення ефективності лікування онкологічних хворих досі залишається актуальною. Одним із підходів до її вирішення є застосування протипухлинних вакцин (ПВ). Сьо-

годні розроблені й проходять експериментальну та клінічну перевірку ПВ, виготовлені за різними технологіями [1, 2, 3]. Доведена можливість формування протипухлинного імунітету та клінічної відповіді для деяких з них. Проте не вирішеними залишаються ще низка проблем: то-