

## **АНТИТЕЛА К БЕЛКАМ НЕРВНОЙ ТКАНИ S100, GFAP, MP65 У БЕРЕМЕННЫХ С РАННИМ ТОКСИКОЗОМ**

**С.Г. МОРОЗОВ, А.Б. ПОЛЕТАЕВ, Л.Е. МУРАШКО, Е.П. ДЬЯКОВА,  
И.В. ПОНОМАРЕВА, Б.Б. ГНЕДЕНКО, Г.Т. СУХИХ**

**НИИ биомедицинской химии РАМН, Москва; Медико-экологический Фонд  
“Чернобыль-Тест”, Москва; ГНЦ акушерства, гинекологии и перинатологии  
РАМН, Москва.**

В сыворотках крови женщин с физиологически протекающей беременностью выявлены антитела к белкам ткани мозга S100, GFAP и MP65, которые были обозначены как естественные аутоантитела. При физиологически протекающей беременности, их уровни находятся в достаточно ограниченных пределах. При обследовании 32 женщин со сроками беременности 3-15 недель, у которых наблюдался ранний токсикоз, выявлены достоверные изменения уровней изучаемых антител как в сторону повышения, так и снижения. Частота рождения детей с различными отклонениями у женщин с ранним токсикозом, у которых наблюдались изменения сывороточной иммунореактивности к данным белкам, была выше по сравнению с популяцией в 1,5-2 раза.

**Ключевые слова:** нейроантигены, аутоантитела, антиидиотипические антитела

**ВВЕДЕНИЕ.** За последние годы был получен целый ряд экспериментальных и клинических данных, свидетельствующих о важной роли иммунной системы в нормальном течении беременности и ее исходе [1, 2, 3, 4]. Так, например, было показано, что если оплодотворенные яйцеклетки, полученные от здоровых мышей, трансплантировать в матку аутоиммунных животных, у родившихся детенышей обнаруживаются выраженные нарушения деятельности мозга; напротив, развитие оплодотворенных яйцеклеток, полученных от аутоиммунных животных в матке здоровых мышей, приводило к рождению здоровых детенышей [5]. В этих экспериментах было четко продемонстрировано, что уровень каких-то неидентифицированных материнских аутоантител (аАТ) является важным, возможно, ведущим фактором, определяющим нормальное или аномальное развитие нервной системы. В свою очередь в работах Takeuchi было установлено, что не только увеличенный, но и аномально низкий уровень материнских аАТ (также неидентифицированных) может являться причиной остановок или нарушений эмбрионального развития [4].

Согласно теории Jerne [6], иммунная система здорового человека продуцирует аАТ ко всем антигенным компонентам собственного организма. К настоящему времени в сыворотке крови здоровых лиц идентифицированы сотни видов естественных (нормальных, физиологических) аАТ разной специфичности, направленных к гормонам и рецепторам, компонентам межклеточного матрикса и белкам цитоскелета, ДНК и гистонам, многим ферментам, маркерам главного комплекса гистосовместимости и другим эндогенным соединениям. Предполагается, что подобные физиологические аАТ участвуют в регуляции практически всех метаболических процессов в организме [7].

Задача настоящего исследования заключалась в изучении изменений иммунореактивности сывороточных аутоантител к белкам мозга S100, GFAP и MP65 при раннем токсикозе беременности. Актуальность данного исследования обусловлена тем, что в настоящее время ранний токсикоз у матери рассматривают как один из прогностически неблагоприятных факторов возникновения у ребенка в первый год жизни осложнений со стороны ЦНС, однако механизмы его остаются неизученными [8].

Белки S100 и GFAP часто используют в качестве маркеров нервной ткани [9], причем S100 связан с регуляцией созревания центральных серотонинергических структур [10]. Белок MP65 (представитель суперсемейства интегринов) был получен под иммунохимическим контролем сывороток женщин с неблагоприятным исходом беременности [11].

**МЕТОДИКА.** Протестировано 32 образца сыворотки больных с ранним токсикозом беременности (рвота беременных) в возрасте от 18 до 41 года. В ходе выполнения работы было протестировано также 50 образцов сыворотки женщин с физиологически протекающей беременностью (контрольная группа) того же возраста. Женщины контрольной группы не имели признаков соматических, эндокринных, неврологических, инфекционных, воспалительных заболеваний и иных нарушений. Полученные сыворотки хранили при  $-40^{\circ}\text{C}$  (однократное замораживание). Забор крови проводили на сроке беременности 3-15 недель.

Белки S-100, GFAP, MP65 и поликлональные антитела к ним (AT1) получали из сыворотки иммунных кроликов с помощью ранее описанных хроматографических приемов [11, 12]. Антиидиотипические антитела (AT2) (антитела против F(ab)<sub>2</sub>-фрагментов AT1) получали с помощью иммуноаффинной хроматографии на колонках с носителями на которых были иммобилизованы F(ab)<sub>2</sub>-фрагменты AT1 к S-100, GFAP и MP65 [12]. Получение F(ab)<sub>2</sub>-фрагментов препаратов антител проводили по методу Demignot et al. [13].

Образцы сывороток обследуемых тестировали с помощью стандартного твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) на полистироловых планшетах фирмы "Nunc" (Дания) с сорбированными белками S100, GFAP и MP65 в 0,05 М карбонатном буфере pH 9,6 (2 мкг/мл по 100 мкл в лунку). Инкубацию проводили при  $4^{\circ}\text{C}$  в течение 16 ч. Затем планшеты отмывали от несвязавшихся АГ отмывающим буфером (140 mM NaCl с 2,7 mM KCl, 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8,7 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  с 0,05% Твина-20; PBST) и обрабатывали 0,5% раствором желатины в течение 1 ч при  $37^{\circ}\text{C}$ . Затем в лунки вносили сыворотки исследуемых пациентов и здоровых доноров, разведенные PBST 1:160. После инкубации при  $4^{\circ}\text{C}$  в течение 16 ч планшеты отмывали и вносили в лунки козы АТ к IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена ("Sigma", США). Реакцию проявляли о-фенилендиаминам/ $\text{H}_2\text{O}_2$ . Определение оптической плотности проводили фотометрически при длине волны 490 нм. В другой серии экспериментов для определения в тестируемых образцах сыворотки беременных аАТ к S100, GFAP и MP65 планшеты активировали F(ab)<sub>2</sub>-фрагментами AT2 либо F(ab)<sub>2</sub>-фрагментами AT1 к S100, GFAP и MP65 (для определения соответствующих антиидиотипических антител).

В качестве "внутреннего стандарта" использовали сыворотку беременной женщины контрольной группы, имеющей показатели иммунореактивности близкие к средним по группе. Данные, полученные в абсолютных единицах оптической плотности, пересчитывались в условные единицы, а именно в проценты от уровня реакции "внутреннего стандарта". Результаты реакций более интенсивных, по сравнению с сыворотками доноров, считались повышенными (обозначали знаком > - см. табл. 1). Сильно повышенными (>>) считались реакции, когда оптическая плотность превышала эталонные значения более чем на 70 %. Результаты реакций менее интенсивных, по сравнению с реакцией "внутреннего стандарта", считались заниженными (обозначались знаком < ). Реакции считались сильно заниженными



(<<), если оптическая плотность была менее 35 % от значений реакции "внутреннего стандарта".

С целью определения оптимального разведения тестируемых сывороток при проведении ИФА три позитивные анти-S100, анти-GFAP и анти-MP65 сыворотки были использованы для построения калибровочных кривых (рис. 1). Наиболее оптимальным было разведение сывороток 1:160.

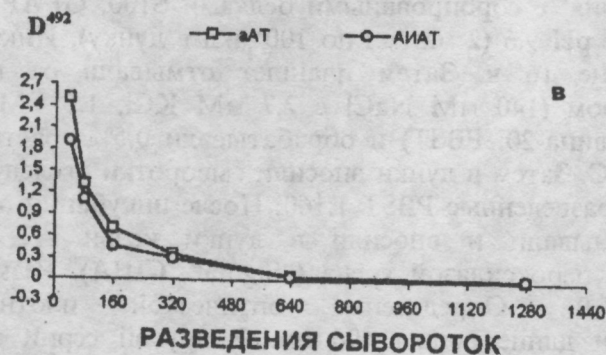
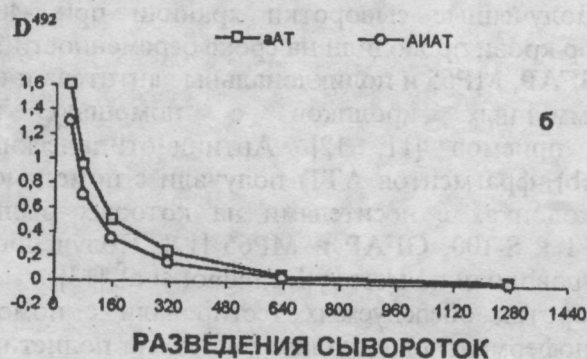
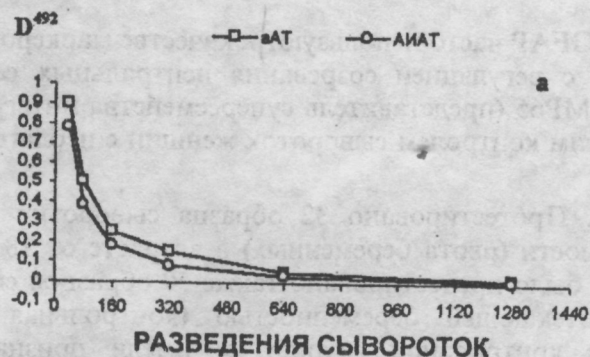


Рисунок. I.

Калибровочные кривые иммуноферментного анализа aAT и АИАТ к белкам S100b (а), GFAP (б) и MP65 (в). По оси абсцисс - разведение сыворотки беременных женщин в норме. По оси ординат - оптическая плотность при длине волны 492 нм.

С помощью многократного повторения эксперимента все используемые в работе тест-системы были охарактеризованы как высокоточные, надёжные и воспроизводимые.

Статистическую обработку полученных результатов проводили методом 2x2 таблицы с расчетом достоверности по  $\chi^2$ .

Оценки состояния новорожденных базировались на заключениях неонатологов НЦ акушерства, гинекологии и перинатологии РАМН, наблюдавших ребенка в первые недели жизни.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Сыворотки иммунизируемых антигенами животных содержат как антитела (АТ1) против самого антигена (идиотипы), так и соответствующие антиидиотипы (АТ2), представляющие собой "антитела против антител", переменные участки которых представляют собой стереохимическую копию антигенных детерминант самого антигена. Так как АТ1 иммунизированных животных представляют собой поликлональные антитела к различным детерминантам используемых для иммунизации белков, то и выделенные АТ2 представляли собой набор соответствующих поликлональных анти-антител, представляющих в своих переменных участках пространственные копии разных антигенных детерминант антигена (в том числе скрытых внутри белковой глобулы нативного антигена и недоступных в обычных условиях для взаимодействия с АТ1). Таким образом, подменяя в ИФА нативный антиген соответствующими поликлональными антиидиотипами, мы получали возможность, представить более широкий спектр антигенных детерминант белковой молекулы, чем при использовании нативного белка.

Иммунореактивность аАТ (или АИАТ) контрольных сывороток к белкам S100, GFAP и MP65 после прохождения через колонки, на которых были иммобилизованы соответствующие Fab<sub>2</sub>-фрагменты АТ2 (или АТ1) к данным белкам, уменьшилась до 5-9 % по сравнению с первоначальным уровнем реакции. В то же время при прохождении стандартного образца через колонку с иммобилизованным на сефарозе БСА, его иммунореактивность к указанным белкам нервной ткани уменьшилась до 64-79% от первоначального уровня, что можно объяснить разведением сыворотки в процессе хроматографии. Элюированные с колонок препараты антител (АТ1 и АТ2) пропускali через колонку с иммобилизованным неиммунным IgG кролика, чтобы удалить имеющиеся в препарате антитела, неспецифически реагирующие с эпитопами иммуноглобулинов. Так как препараты, элюированные с колонок с иммобилизованными АТ2, на иммуноблоттинге специфически связывались с используемыми в работе белками нервной ткани, они были обозначены нами как естественные аутоантитела (аАТ), или аутоантитела первого порядка. Препараты, элюированные с колонок с иммобилизованными АТ1, были обозначены как естественные аутоантитела второго порядка, или антиидиотипические антитела (АИАТ), что было показано с помощью конкурентного иммуноферментного анализа. Таким образом, был сделан вывод о том, что в сыворотке крови здоровых женщин при физиологической беременности содержатся естественные аутоантитела как первого, так и второго порядка к белкам нервной ткани S100, GFAP и MP65.

Результаты тестирования образцов сыворотки женщин с физиологически протекающей беременностью, а также пациенток с ранним токсикозом беременности представлены на рис. 2 и табл.

*Таблица.* Частота и характер отклонений сывороточной иммунореактивности к изучаемым антигенам при физиологической беременности и у беременных с ранним токсикозом

	N	S100B					GFAP					MP65				
		<<	<	H	>	>>	<<	<	H	>	>>	<<	<	H	>	>>
К	50	0	1/0	48/48	1/2	0	0	1/2	47/48	2/0	0	0	2/1	47/48	1/1	0
П	32	1/3	4/3	18/17	4/4	5/5	4/4	7/5	12/12	4/4	5/7	2/3	3/3	16/17	4/3	7/6

N - количество образцов; К - контрольная группа (физиологическое течение беременности); П - группа беременных с ранним токсикозом; << - число пациентов с уровнем/аффинностью антител менее чем -35 % по отношению к стандарту; < - менее чем 17 %; H - число пациентов с нормальным уровнем/аффинностью антител (в диапазоне от -17 до +42 % по отношению к стандарту); > - число пациентов с уровнем/аффинностью антител более чем +42% по отношению к стандарту; >> - более чем 70 %; х/у - в числителе число пациентов, у которых определяли уровень/аффинность аАТ, в знаменателе - АИАТ.



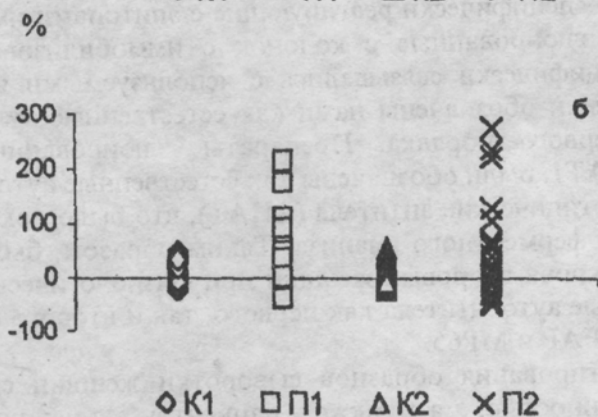
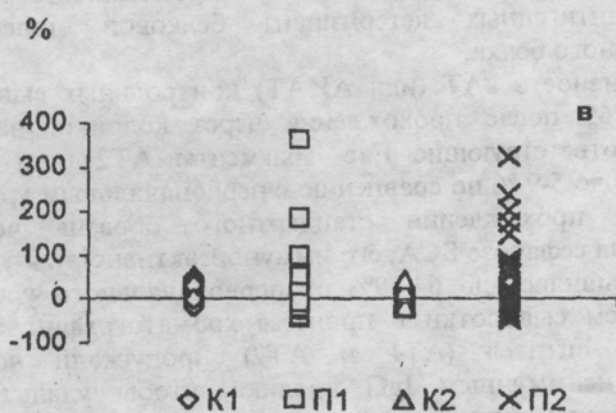
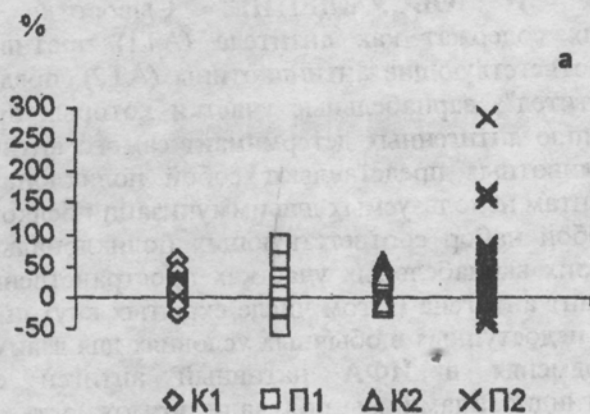


Рисунок 2.

Распределение уровня/аффинности аАТ и АИАТ к белкам SIOOb (а), GFAP (б) и MP65 (в), выраженного в процентах относительно уровня/аффинности стандартной сыворотки.

K1 - уровень/аффинность аАТ при физиологической беременности; П1 - уровень/аффинность аАТ у беременных с ранним токсикозом; K2 - уровень/аффинность АИАТ при физиологической беременности; П2 - уровень/аффинность АИАТ у беременных с ранним токсикозом.

При анализе сывороток женщин с физиологически протекающей беременностью было установлено, что "нормальная иммунореактивность" исследуемых аАТ и АИАТ находится в пределах от -17 % до +42 % по отношению к оптической плотности эталонной сыворотки. У женщин этой группы не было обнаружено ни одного случая антенатальной смерти и ни одного случая рождения ребенка с пороками развития.

В группе женщин с ранним токсикозом беременности параметры иммунореактивности, т.е. уровень/аффинность определяемых аАТ и АИАТ во

многих случаях выходили за границы условной нормы. Причем нередко наблюдалось не только патологическое повышение, но и аномальное снижение иммунореактивности. Отклонения от нормы по каждому изучаемому параметру носили статистически достоверный характер (значения  $\chi^2$  не ниже 19,63;  $p < 0,001$ ). Лишь у 5 пациенток из 32 все 6 определяемых показателей не выходили за пределы нормы. Наиболее часто наблюдали изменения уровня/аффинности аАТ и АИАТ к белку GFAP.

Из 27 пациенток с измененной иммунореактивностью к указанным нейроантигенам у 9 родились дети в асфиксии различной степени тяжести, 8 новорожденных имели выраженные признаки гипотрофии и синдромом гипервозбудимости ЦНС. У одной пациентки родился ребенок с пороком развития твердого и мягкого неба (синдром Пьера-Робинсона). Частота рождения детей с различными отклонениями у женщин с измененной иммунореактивностью к S100, GFAP и MP65 была выше чем в среднем по популяции в 1,5-2 раза.

Существуют мнения [14], что количество накопленных к настоящему времени данных достаточно для формирования представлений об участии иммунной системы в регуляции процессов дифференцировки и морфогенеза, как об одной из главных общеорганизменных функций этой системы. В тоже время следует признать, что пока остается не вполне ясно, анализ каких иммунологических параметров может быть оптимальным инструментом прогноза нормального или аномального развития эмбриона и плода. Возможно, ими являются некоторые естественные аАТ, способные модулировать функциональную активность соответствующих белков-мишеней, участвующих в регуляции процессов клеточной дифференцировки.

По-видимому, не случайно уровень/аффинность аАТ к ряду нейроантигенов оказываются измененными у беременных с ранним токсикозом. Имеется ряд данных, свидетельствующих об изменениях в иммунной системе организма при ранних токсикозах. Так, например, отмечено нарастание антител к антигенам тканей плода и внезародышевых образований, а также к антигенам тканей материнского организма. При этом наибольший титр антител был обнаружен к антигенам ткани матки и антигенам легкого, селезенки и тимуса плода [15, 16]. Данные о том, что ранний токсикоз беременных является неблагоприятным фактором для развития нервной системы будущего ребенка [8] явились основанием для проведения данной работы.

Полученные результаты свидетельствуют о необходимости поддержания нормального баланса регуляторных аАТ в узких физиологических пределах. Эти данные, вероятно, отражают тот факт, что условием нормального функционального состояния организма женщины, в том числе его репродуктивных функций, является поддержание определенной "золотой середины" в содержании изучавшихся регуляторных аАТ. Феномен "золотой середины", хорошо изученный экспериментаторами и клиницистами на примерах таких классических регуляторов биологических функций, как молекулы гормонов (достаточно вспомнить случаи патологии, характерные как для гипо-, так и для гипертиреоза), является общебиологическим принципом в отношении любых регуляторных молекул. Эмпирически установленные границы (удивительно узкие) "золотой середины" иммунореактивности для естественных аАТ и АИАТ к белкам S100, GFAP и MP65, в совокупности с данными о росте числа рождения детей с отклонениями развития как при гипер-, так и при гипопродукции этих антител, являются важным, хотя и косвенным свидетельством в пользу представлений о выполнении этими молекулами важных регуляторных функций в общеорганизменном плане.

Некоторое время было принято считать, что продуцируемые естественные аАТ являются исключительно низкоаффинными полиреактивными молекулами класса IgM [17]. Однако, в последующих работах было установлено, что до половины циркулирующих в кровотоке аАТ относится к классу IgG, причем, значи-



тельная часть естественных аАТ класса IgG моноспецифична по своей антигенной направленности, а их аффинность может достигать высоких значений [18].

Неплохо изученным примером избирательности тканевых барьеров в отношении антител определенных классов может служить плацентарный барьер, формируемый ворсинами трофобласта и служащий целям биохимической и иммунологической разобщенности организмов матери и плода. Плацентарный барьер активно (против градиентов концентраций) осуществляет "перекачку" материнских антител класса IgG к плоду, но в тоже время оказывается практически непроницаемым для иммуноглобулинов классов IgM, IgD, IgE, и IgA [19].

В заключение необходимо отметить, что детали конкретного участия естественных регуляторных аАТ в механизмах эмбрио/фетогенеза пока далеки от понимания. Легко детектируемые изменения в содержании определенных аАТ, могут оказаться лишь видимой "верхушкой айсберга", основная масса которого, возможно представленная огромным числом событий и процессов на молекулярном и клеточном уровнях, остается пока вне нашего рассмотрения. Тем не менее, доступная уже сегодня информация позволяет с оптимизмом относиться к потенциальным возможностям новых разрабатываемых методов диагностики (прогностики) и специфической иммунокоррекции нарушений репродуктивных функций.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Абрамов В. В.* (1988). Взаимодействия нервной и иммунной систем. Новосибирск.
2. *Донцов В.И.* (1989). Иммунология, 10, 94-96.
3. *Radosevic-Stasic B.* (1980). Period. Biologorum, 82, 83-87.
4. *Takeuchi S.* (1990). Amer. J. Reprod. Immunol., 24, 108-119.
5. *Денненберг В.* (1991). Сб.: Условный рефлекс в системе нейронаук. Ленинград. 37-38.
6. *Jerne N.K.* (1984). Bioscience Reports, 5, 439-451.
7. *Полетаев А.Б.* (1995). В кн.: Моноклональные антитела в нейробиологии. Новосибирск. С. 36-46.
8. *Куликова И.К.* (1990). Медицинский журнал Узбекистана, N 10, 33-35.
9. *Mecocci P., Parnetti L., Romano G. et al.* (1995). J. Neuroimmunol., N 57, 165-170.
10. *Azmitia E.C., Dolan K., Whitaker-Azmitia P.M.* (1990). Brain Res., 516, 354-356.
11. *Полетаев А.Б., Вабищевич Н.К., Морозов С.Г.* (1998). Способ скринингового обследования женщин детородного возраста с помощью тест-системы ELI-P для прогноза развития эмбриона/плода и рождения здорового либо аномального ребенка. Рос. Патент N 2107913.
12. *Полетаев А.Б.* (1987). Мозгоспецифические белки группы S100, их эндогенные акцепторы и лиганды, и регуляция метаболических процессов в нервной ткани. Дис. докт. мед. наук. - М.: НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина АМН СССР.
13. *Demignot S., Garnett M.C., Baldwin R.W.* (1989). J. Immunol. Meth., 121, 209-217.
14. *Агеев А.И.* (1994). Лицо рака.
15. *Брысин В.Г., Инакова М.К.* (1981). Проблемы патологии в эксперименте и клинике. Львов, С. 62-63.
16. *Каюмова Ш.* (1986). Клинико-иммунологическая характеристика рвоты беременных. Дис. канд. мед. наук, М.

17. *Casali, P., Notkins, A.L.* (1989). *Immunol. Today*, **10**, 364-368.
18. *Bendtzen K., Svenson M., Jonsson V., Hippe E.* (1990). *Immunol. Today*, **11**, 167-169.
19. *Landor M.* (1995). *Ann. Allergy, Asthma Immunology*, **74**, 279-283.

# **SERUM ANTI-S100, ANTI-GFAP AND ANTI-MP65 AUTOANTIBODIES IN PREGNANTS WITH EARLY TOXICOSIS**

S.G. MOROZOV, A.B. POLETAEV, L.E. MURASHKO, E.P.  
DYAKOVA, I.V. PONOMAREVA,  
B.B. GNEDENKO, G.T. SUKHIKH

Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences,  
Pogodinskaya st., 10, Moscow;  
Medico-Ecological Fund "Chernobyl-Test",  
Rimskogo-Korsakova st. 10, Moscow;  
State Scientific Center of obstetrics, gynecology and perinatology,  
Russian Academy of Medical Sciences, Oparina st., 4, Moscow.

Serum levels/affinities of natural autoantibodies to proteins S100, GFAP and MP65 in patients with physiological pregnancy are usually constant and may vary among individuals within relatively narrow range. In patients with early toxicosis in pregnancy dispersion of serum autoantibodies levels were often found beyond the normal range. This group includes cases with significantly elevated as well as abnormally decreased immunoreactivity parameters. Percent of newborns with different deviations from women with abnormal serum levels/affinities of autoantibodies to proteins S100, GFAP and MP65 was higher 1,5-2 fold compared with population.

**Key words:** neuroantigens, autoantibodies, antiidiotype antibodies