

На правах рукописи

АХУШКОВА ЛЕЙЛЛА МАГОМЕДОВНА

ЩЕЛОЧНАЯ ФОСФАТАЗА И ЛАКТОФЕРРИН В КЛИНИКО-
ЛАБОРАТОРНОМ ИССЛЕДОВАНИИ ГЕСТОЗОВ

03.01.04 - биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Астрахань - 2015

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения России

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор
Николаев Александр Аркадьевич

Официальные оппоненты:

Трунов Александр Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины», заведующий лабораторией иммунологии;

Сафронов Игорь Дмитриевич, доктор медицинских наук, профессор, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения России, профессор кафедры патологической физиологии и клинической патофизиологии

Ведущая организация:

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Москва).

Защита состоится « ____ » _____ 2015г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 001.034.01 в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт биохимии» (630117, г.Новосибирск, ул.Тимакова, 2, тел. 8(383)333-54-81). С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биохимии», <http://www.niibch.ru>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2015г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Г.С. Русских

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Гестозы (преэклампсия) занимают второе место в статистике акушерских осложнений [Криворучко А.Ю.2007, Однокозова О.С. 2010, Шубина В.И. 2012, Crocker I.P., et al.2000]. Их патогенез окончательно не изучен, а диагностика и прогнозирование до настоящего времени представляют собой трудную задачу [Хадарцева К. А.,2010, Трунов А.Н и соавт..2011, Davidson J.M., Lindheimer M.D.2011].

На сегодня принято считать, что гестоз – это комплексная эндотелиальная дисфункция (эндотелиоз), при котором происходит нарушение роста, дифференцировки и функционирования сосудов плаценты, связанное с неадекватной продукцией сосудисто-эндотелиального фактора роста, а также нарушение свертывающего потенциала крови с развитием хронического варианта ДВС-синдрома. [Севостьянова О.Ю. и соавт.,, 2004 г Н. А.. Зорин и соавт.,, 2005.].

В клинико-экспертной оценке течения преэклампсии беременности учитываются такие стандартные лабораторные показатели, как общий анализ крови и мочи, анализы мочи по Нечипоренко, Зимницкому, биохимические показатели крови, показатели системы свёртывания крови и фибринолиза. Однако их чувствительность и специфичность для диагностики преэклампсии незначительны [Москаленко Н.П., 2012 г.]. Несмотря на интенсивные исследования в идентификации молекулярных маркеров гестоза, например, Siddiqui et al[2010] нашел наличие аутоантител к ангиотензин-1 рецепторам (AT1-AA), Jensen et al[2012]; обнаружили изменение соотношения CD19(+)/CD5(+) В-клеток, задача ранней молекулярной диагностики гестоза остается нерешенной[Warrington J.P et al 2013].

Поэтому актуальной проблемой является организация исследований по разработке и внедрению новых клинико-лабораторных и иммунохимических методов своевременного обнаружения отклонений в состоянии здоровья женщин, оценке течения беременности, диагностики, лечения и профилактики осложнений гестационного периода [Сухарев А.Е. и соавт., 2011., Шубина В.И.2012].

Плацентарная щелочная фосфатаза (ПЩФ) продуцируется микроворсинками плаценты и эндотелием её новообразующихся сосудов, является органоспецифическим антигеном плаценты, в связи

с чем, логично предположить непосредственное участие этого фермента в указанных патологических процессах.

Исследованию ПЩФ, как маркера эмбриональных и малигнизированных тканей, в последние десятилетия уделено большое внимание [Бассалык Л.С. и соавт., 2009]. Этот фермент изучен, наряду с другими маркерами течения беременности [Hohn H.P., 2006, Gibson J.M., 2011,]. Однако работы по иммунохимическому изучению ПЩФ в комплексе с острофазовыми белками в биохимии немногочисленны и не дают ответа на вопрос о диагностическом значении этого антигена при преэклампсии и фето-плацентарной недостаточности у беременных женщин.

Увеличение концентрации ЛФ в биологических жидкостях отмечается при воспалении, некрозе, анемии, беременности и опухолевой прогрессии, то есть процессах, сопровождающихся гиперфибриногенемией и гиперкоагуляцией крови.

Интересными представляются данные об изменениях уровней ПЩФ и лактоферрина в сыворотке крови и других биологических жидкостях беременных [Barlutti F et al 2012]. Таким образом, комплексное иммунохимическое исследование плацентарной щелочной фосфатазы и лактоферрина в сыворотке крови и других биологических жидкостях у беременных женщин с преэклампсией является актуальной задачей в современных условиях модернизации здравоохранения.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ. Разработка методов диагностики и прогнозирования течения гестозов на основе комплексного иммунохимического исследования плацентарной щелочной фосфатазы и лактоферрина.

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ.

1. Разработать метод выделения плацентарной щелочной фосфатазы используя новые свойства этого белка и современные методы выделения и очистки белков .
2. Разработать упрощенный способ иммуноферментного определения плацентарной щелочной фосфатазы, основанный на ее собственной ферментативной активности.
3. Определить количественное содержание плацентарной щелочной фосфатазы (ПЩФ) и лактоферрина (ЛФ) в плаценте, сыворотке крови, моче беременных с преэклампсией (гестозах) и при неосложненной беременности;

4. Провести сравнительную оценку чувствительности, специфичности и прогностической ценности неинвазивных иммунохимических тестов и стандартных лабораторных анализов в клиничко-лабораторной оценке гестозов;

Научная новизна

Впервые при гестозах отмечено достоверное снижение количества плацентарной щелочной фосфатазы в водно-солевых экстрактах плаценты, по сравнению с тканью плаценты женщин с нормально развивающейся беременностью, что может отражать функциональную плацентарную недостаточность при преэклампсии на фоне указанных гистологических нарушений.

Впервые выявлено существование цитозольных и мембраносвязанных вариантов лактоферрина в эпителии ворсин плаценты. Это позволяет предположить, что плацента может служить источником повышения лактоферрина в сыворотке крови беременных в процессе увеличения срока беременности. Повышение лактоферрина в сыворотке крови в 3 триместре, коррелирует со степенью преэклампсии.

Впервые биохимическими методами выявлены различные изоформы щелочной фосфатазы в сыворотке крови и моче, отличающиеся субстратной специфичностью, отношением к ингибиторам и электрофоретической подвижностью.

Впервые выявлена при преэклампсии селективная протеинурия за счёт элиминации в мочу щелочной фосфатазы, плацентарной щелочной фосфатазы, лактоферрина, иммуноглобулинов. Интенсивность белкового спектра мочи коррелирует со степенью тяжести преэклампсии и нефропатии и отражает патофизиологические механизмы нарушения клубочко-канальцевой фильтрации.

Разработан способ прогноза развития преэклампсии по суммарной концентрации плацентарной щелочной фосфатазы и лактоферрина в моче беременных

Научно-практическая значимость работы.

Практическое значение работы заключается в разработке системы комплексной лабораторной оценки лабораторных данных исследования мочи позволяющей прогнозировать вероятности развития гестоза у беременных женщин уже на 22 неделе беременности. Прогноз основан на сумме концентраций плацентарной щелочной фосфатазы и концентраций лактоферрина, определенных двукратно с интервалом в 2 недели в суточной моче.

При таком расчете суммарная концентрация выше 16,0 нг/мл позволяет судить о возможности развития гестоза с вероятностью 75%.

Наряду с этим результаты исследования представляют значительный методический интерес, так как впервые разработан и апробирован в данной работе способ выделения и очистки плацентарной щелочной фосфатазы.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. В плацентах женщин, страдавших гестозами определен значительный дисбаланс между уровнем щелочных фосфатаз в цитозольной и мембранной фракциях. Наблюдается опережающее снижение уровня мембраносвязанного фермента, т.е. происходит вымывание специфической плацентарной фосфатазы в цитозольную фракцию.
2. Впервые получены доказательства существования цитозольных и мембраносвязанных вариантов лактоферрина. Показано, что в плацентах женщин, страдавших преэклампсией наблюдается рост концентрации лактоферрина в ткани плаценты. Нами выделен из бутанольной фракции лактоферрин с электрофоретической подвижностью достоверно ниже электрофоретической подвижности лактоферрина молока человека и полученный препарат можно рассматривать как лактоферрин с другим профилем изоформ нежели лактоферрин молока.
3. Исследована активность и концентрация трех типов щелочных фосфатаз сыворотки крови: расщепляющая п-нитрофенилфосфат, расщепляющая нафтол-фосфаты и специфическая плацентарная фосфатаза. При преэклампсии выявляется достоверное ($P \leq 0,001$) снижение активности ЩФ (субстрат нафтол-AS-фосфат), значительно большее, чем отмечено снижение активности сывороточной щелочной фосфатазы (субстрат п-нафтилфосфат). Этот факт представляет не только диагностический интерес, но и подтверждает мнение о гетерогенности пула сывороточной щелочной фосфатазы.
4. Неинвазивное иммунохимическое исследование мочи беременных показало, что методом ИФА определяется плацентарная щелочная фосфатаза в 96,6% случаев, со средней концентрацией $75,8 \pm 0,8$ нг/мл также синхронно с увеличением количества других белков. В контрольной группе у здоровых беременных ПЩФ выявляется в 6,7% случаев со средней концентрацией $5,2 \pm 0,5$ нг/мл.

Лактоферрин в моче беременных страдающих преэклампсией обнаруживается в 52,3% случаев.

5. Предложена формула вероятности развития преэклампсии у беременных женщин уже на 22 неделе беременности. Прогноз основан на сумме концентраций плацентарной щелочной фосфатазы и концентраций лактоферрина, определенных двукратно с интервалом в 2 недели. При таком расчете суммарная концентрация выше 16,0 нг/мл позволяет судить о возможности развития преэклампсии с вероятностью 75%, при специфичности 89,7%.

Апробация работы и публикации

Материалы, вошедшие в диссертационную работу, ее основные положения были представлены и обсуждены на: VIII Межрегиональной научно-практической конференции «Лекарство и здоровье человека» (2009г., г. Астрахань).

В соавторстве с д.м.н., профессором А.А.Николаевым, д.м.н. А.Е.Сухаревым, и к.б.н. М.В.Плосконос подана заявка на выдачу патента на изобретение «способ выделения щелочной фосфатазы плацентарного типа»

В соавторстве с д.м.н., профессором А.А.Николаевым, подана заявка на изобретение «способ прогнозирования гестозов у беременных», [Заявка на изобретение №201412290 (037291) от 04.06.2014]. о чем получено положительное решение на выдачу патента от 27.01.2015. и Способ выделения щелочной фосфатазы плацентарного типа. Заявка на изобретение №2014122905(037292) от 04.06.2014. Положительное решение на выдачу патента от 27.01.2015.

Работа прошла апробацию на межкафедральной конференции с участием кафедр химии, фармацевтической химии, биохимии, нормальной физиологии, патологической физиологии, микробиологии ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздрава России; кафедры молекулярной биологии, генетики и биохимии ГБОУ ВПО «Астраханский государственный университет».

По теме диссертации опубликовано 10 научных работ, в том числе 3 статьи в центральной медицинской печати, рекомендованной Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, собственных

результатов и их обсуждения, заключения, практических рекомендаций, выводов, списка литературы.

Материалы диссертации изложены на 130 страницах машинописного текста, включая 23 таблиц и 19 рисунков. Список литературы состоит из 196 работ, из них 54 отечественных и 142 зарубежных авторов

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Предпринятое исследование представляет собой лабораторное изучение плацентарных и сывороточных белков у беременных женщин, страдавших гестозом и с нормально протекавшей беременностью. В связи с этим были выбраны, наиболее адекватные, методы их изучения.

Объектами нашего исследования были экстракты плацент беременных женщин страдавших гестозами и с нормально протекавшей беременностью, сыворотки крови этих женщин и моча этих женщин. В работе использовано 196 экстрактов плаценты, Сыворотки крови беременных с неосложнённой беременностью 244, Сыворотки крови беременных, страдавших гестозами 185. Образцы мочи беременных с неосложнённой беременностью 130 и Образцы мочи беременных, страдавших гестозами 265.

Использовали следующие методы исследования: иммунодиффузионный анализ в агаре (ИДА), иммуноэлектрофорез (ИЭФ) [Девени Т., Гергей Я., 1976, Иммунологические методы. / Под ред. Х. Фримеля. 1987], [Егоров А. М., и соавт 2001, Fischbach FT, eds 2011], ИФА, аффинную хроматографию, гель-фильтрацию, ионообменную хроматографию [Шаповалова Е.Н., Пирогов А.В., 2007 Dedkov V. et all 2010, Eith C. et all 2005.].

Статистическую обработку полученных количественных данных осуществляли с помощью пакета статистического анализа Statistica 6, SPSS V 10.0.5, программ «STATLAND», «EXCEL-97», «Basic Statistic» с учетом стандартных методик вариационной статистики, включая вычисление критерия t Стьюдента для оценки достоверности различий. Данные представлены в виде $M \pm m$, достоверные различия обсуждались при $t = < 0,001$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

ИССЛЕДОВАНИЕ ТКАНИ ПЛАЦЕНТЫ ПРИ ГЕСТОЗАХ.

В водно-солевых экстрактах послеродовой плаценты содержится от 512 до 2048 ЕД Боданского активности ПЩФ и от 2048 до 4096 ЕД - в

бутаноловых экстрактах. По нашим расчётам выявленная активность ПЩФ соответствует $7,6 \pm 1,0$ мкг/100 г ткани в водно-солевых экстрактах и $22,8 \pm 3,0$ мкг/100 г – в бутаноловых экстрактах плаценты. То есть существует цитозольная (вероятно она же – секретируемая в кровотока) ПЩФ и мембраносвязанная ПЩФ, обеспечивающая метаболизм фетоплацентарного комплекса.

В водно-солевых экстрактах плаценты при гестозах отмечается достоверное снижение активности термостабильной щелочной фосфатазы (рис1.). Наблюдается опережающее снижение уровня именно мембраносвязанного фермента, что, видимо, усугубляет функциональное состояние фетоплацентарного комплекса.

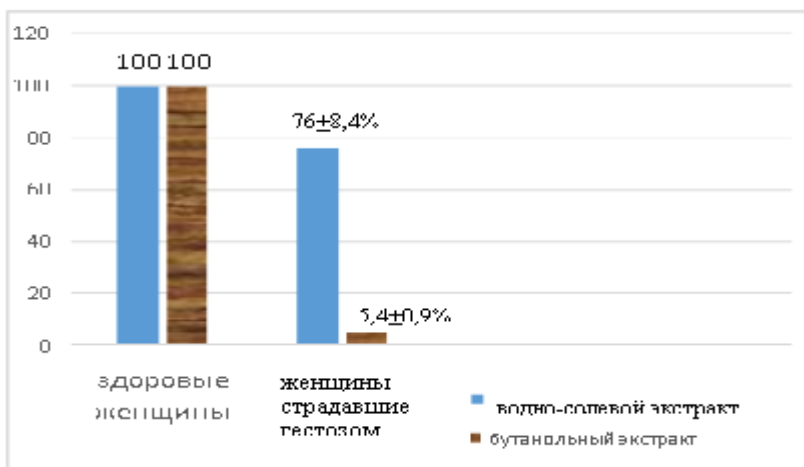


Рис.1. Активность термостабильной щелочной фосфатазы в экстрактах плаценты здоровых женщин и страдающих гестозом (активность в норме принята за 100%).

Иммунохимические свойства ПЩФ. Получение поликлональных антител к очищенному препарату плацентарной щелочной фосфатазы, позволило разработать моноспецифическую тест систему на этот фермент. На рис 2 приведена стандартная иммуноэлектрофореграмма

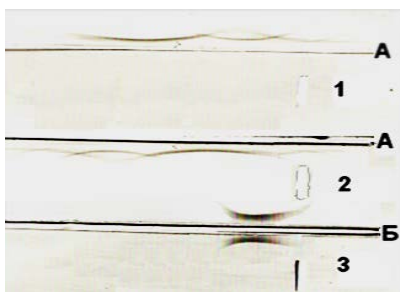


Рис.2. Иммуноэлектрофорез ПЩФ. 1,3-Очищенный препарат ПЩФ; 2-водно-солевой экстракт плаценты. А-антисыворотка к белкам сыворотки крови человека, Б-антисыворотка к препарату ПЩФ

Плацентарная щелочная фосфатаза по данным двумерного иммуноэлектрфореза состоит из 2-х иммунохимически идентичных компонентов с относительной электрофоретической подвижностью $0,65 \pm 0,04$ и $0,52 \pm 0,02$, что соответствует описанным в литературе F и S изоформам (рис 2). Прогревание при 56°C в течение 30 минут или 60°C – 10-15 минут сохраняет активность ПЩФ, что свидетельствует о её основном отличии от других изоформ ЩФ свойстве – термостабильности .

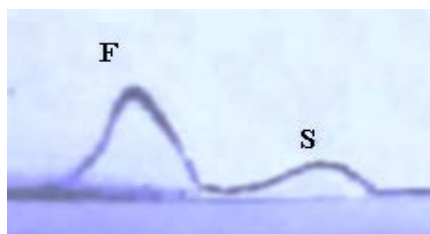


Рис 3. Двумерный иммуноэлектрофорез экстракта плаценты. F- фракция с электрофоретической подвижностью $0,65$,S- фракция с электрофоретической подвижностью $0,52$. Агароза содержит антитела к плацентарной щелочной фосфатазе.

В работе использован препарат плацентарной щелочной фосфатазы, полученный по разработанному нами способу. Особенностью этого способа очистки плацентарной щелочной фосфатазы является обнаруженная нами способность лектина бодяги речной (*Ephydatia fluviatilis*) преципитировать плацентарную щелочную фосфатазу и представляет собой аффинную хроматографию плацентарной щелочной фосфатазы на иммобилизованном лектине

бодяги речной. Через колонку (1,5x12см) лектин-сефарозы, уравновешенную трис-НСI буфером, пропускали весь объем полученной на предшествующей стадии, фракции Далее колонку промывали 1М раствором хлорида натрия, забуференного трис-НСI буфером, а затем элюировали, связанную на колонке плацентарную щелочную фосфатазу 0,1 М раствором лактозы в боратном буфере рН=9,0. Полученный элюат диализовали и концентрировали до приемлемого объема (17 мл). Главное преимущество нашего способа заключается в применении аффинной хроматографии, лектине животного происхождения из бодяги речной. Этот лектин обладает высоким сродством к галактозосодержащим гликопротеинам. По нашим данным константа диссоциации лактозы с этим лектином составляет $1,34 \times 10^{-4}$ ММ. Это позволяет однократно повысить степень очистки в 270 раз.

На рис.4 показано, что препарат плацентарной щелочной фосфатазы гомогенен при электрофоретическом контроле чистоты.

Контроль полученного препарата ПЩФ из плаценты с ингибиторами позволил определить, что ПЩФ представлена ферментом, активность которого на 88,6% ингибируется L-фенилаланином в количестве 50 ммоль, но не 50 ммоль L-лейцином или 1,0 М мочевиной. Согласно литературным данным, обнаруженные свойства препарата характерны для изоэнзима ПЩФ – Регана .



Рис. 4. Электрофорез в полиакриламидном геле. А – бутанольный экстракт плаценты; В – фракция после осаждения сульфатом аммония из водно-солевого экстракта; С – фракция плацентарной щелочной фосфатазы после аффинной хроматографии

3.2.3. Плацентарная Щелочная фосфатаза (ЩФ), метод ракетного энзимэлектрофореза

С помощью очищенного препарата ПЩФ нами были получены гипериммунные сыворотки к этому белку, которые позволили разработать методы количественного определения ПЩФ в экстрактах плаценты, используя минимальное количество биоматериала.

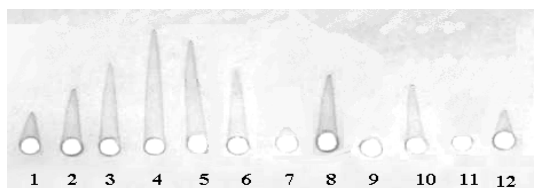


Рисунок 5. Типичная электрофореграмма при определении ПЩФ
 1-4 – Разведения ПЩФ. Концентрации 5; 10; 15; 20 мкг/мл.
 5,6,8,10,12 – образцы тканей плаценты;7,9,11- сыворотки крови беременных

Для количественного определения ПЩФ использовали метод ракетного иммуноэлектрофореза (РИЭФ). На рисунке 5 представлена типичная электрофореграмма определения ПЩФ в экстрактах ткани плаценты и сыворотках крови беременных.

Таблица 1. Концентрация плацентарной термостабильной щелочной фосфатазы в экстрактах плаценты здоровых женщин и страдающих гестозом.

Донор плаценты	Водно-солевой экстракт мкг/100г ткани	Бутанольный экстракт мкг/100г ткани
Здоровые женщины (n=21)	1017,517±14,5	2176,6±42,1
Женщины страдавшие гестозом (n=33)	804,11±12,3 *	1836,8±26,0*

* $P \leq 0,01$

В водно-солевых экстрактах плаценты при гестозах отмечается достоверное (более 20%) снижение концентрации ПЩФ, а бутанольных чуть менее 16% (табл.1). Причем, наблюдается заметное отличие в динамике изменений концентрации плацентарной щелочной фосфатазы определенной иммунохимическими методами и изменения активности термостабильной щелочной фосфатазы.

Таким образом, на основании исследования водно-солевых и бутаноловых экстрактов послеродовой плаценты мы пришли к выводу что существует цитозольная (вероятно она же – секретируемая в кровотоки) плацентарная щелочная фосфатаза и мембраносвязанная плацентарная щелочная фосфатаза, обеспечивающая метаболизм фетоплацентарного комплекса. Дисбаланс динамики активности термостабильной щелочной фосфатазы и концентрации

специфической плацентарной щелочной фосфатазы подтверждает не только факт значительного присутствия фосфатаз различного происхождения в водно-солевой фракции, но и следует признать, что специфическая плацентарная фосфатаза не единственная мембрансвязанная фосфатаза. Интересно, что снижение концентрации менее выражено, чем снижение активности. Расчет удельной активности валовой термостабильной щелочной фосфатазы показывает, что в нормально развивающейся плаценте в водно-солевых экстрактах удельная активность щелочной фосфатазы составляет $1,3 \pm 0,02$ ЕД/мкг плацентарной щелочной фосфатазы, а в бутанольных экстрактах $1,43 \pm 0,02$ ЕД/мкг ПЩФ. В плацентах, полученных от женщин, страдавших гестозом удельная активность щелочной фосфатазы в водно-солевых экстрактах составляет $1,18 \pm 0,025$ ЕД/мкг ПЩФ, а в бутанольных экстрактах $0,91 \pm 0,01$ ЕД/мкг ПЩФ. Анализ этих данных показывает, что самое значительное снижение удельной активности происходит при сравнении бутанольных экстрактов нормальной плаценты и, плаценты женщин страдавших гестозами. Здесь различие составляет более 36%. (рисб.)

Резкое снижение на 36% удельной активности в бутанольных экстрактах плаценты женщин страдавших гестозами по сравнению с нормальной плацентой, свидетельствует об опережающем снижении уровня специфической плацентарной фосфатазы в мембрансвязанной фракции, а значительное увеличение различия между удельной активностью щелочной фосфатазы в водно-солевых и бутанольных экстрактах (более чем на 23%) может свидетельствовать в пользу представления о более активном вымывании именно специфической плацентарной фосфатазы в цитозольную фракцию.

Следовательно, при гестозах происходит не только количественное изменение уровня плацентарной щелочной фосфатазы, но и во-первых, дисбаланс между цитозольной и мембранной фракциями щелочной фосфатазы и, во-вторых, изменение профиля многочисленных фосфатаз, клеток плаценты, с опережающим снижением уровня специфической плацентарной щелочной фосфатазы, что усугубляет функциональное состояние фетоплацентарного комплекса.

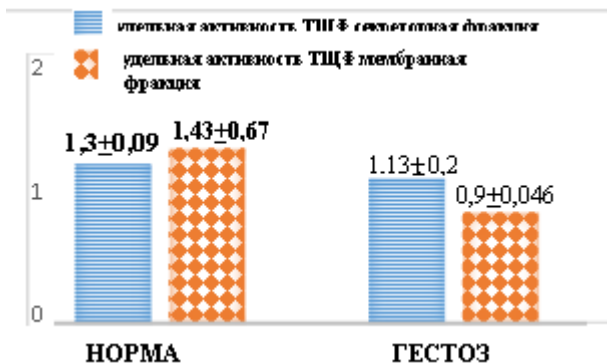


Рис 6. Распределение удельной активности ТПЩФ в цитозольной и мембранной фракциях плаценты.

Определение лактоферрина в ткани плаценты.

Иммуногистохимическим методом лактоферрин обнаружен нами в эпителии ворсин плаценты (рис 8). В пуповинной сыворотке крови лактоферрин определяется в количестве до 9000 нг/мл. Высокое содержание лактоферрина в плаценте и пуповинной сыворотке позволяет предположить то, что плацента может служить источником повышения ЛФ в сыворотке крови беременных в процессе увеличения срока беременности.

Мы провели выделение лактоферрина из ткани плаценты по распространенной методике [Famaud S., et all. 2003] с нашими модификациями. Мы оптимизировали метод очистки лактоферрина в котором выход продукта составляет не менее 85%. Метод основан на сочетании преципитации сульфатом аммония и хроматографии на гепарин сефарозе

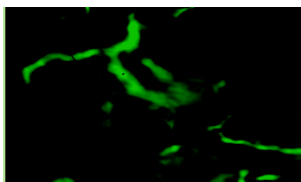


Рис 7. Локализация лактоферрина в ткани плаценты. Иммуногистохимическое исследование. Увеличение x220.

Отличие нашей модификации перед существующими методами аффинной хроматографии на гепарин сефарозе (В.С. Дедков 2010) заключается в том, что колонка с гепарин-сефарозой перед началом хроматографии обрабатывается 0,2-0,3% раствором формальдегида, который окисляет минорные функциональные группы гепарина (NH₂

например) повышает его отрицательный заряд и, соответственно, повышает аффинность по отношению к лактоферрину. По нашим данным константа диссоциации снижалась с 106 М до 85 М, что свидетельствует о повышении аффинности лактоферрина к гепарину и более полному его связыванию. Полученный лактоферрин представляет собой гликопротеин с молекулярной массой около 84000, коэффициентом диффузии в агарозе $3,1 \times 10^{-7} \text{ см}^2 \text{ сек}^{-1}$, относительной электрофоретической подвижностью 0,42. этот белок обладает малой гидрофобностью и элюируется с фенилсефарозы 0,4 М сульфатом аммония. Изоэлектрическая точка его равна 9,2.

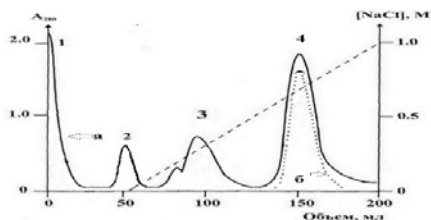


Рис. 8. Профиль хроматографического разделения лактоферрина на гепарин-сефарозе. а. поглощение белка при 280нм; б. иммунохимическая детекция лактоферрина;

Полученный лактоферрин, несмотря на полную иммунохимическую идентичность с лактоферрином из молока человека, по некоторым физико-химическим характеристикам отличается от лактоферрина выделенного из молока человека (Ward, P.P.2002). Особенно заметно отличие в электрофоретической подвижности плацентарного лактоферрина и лактоферрина молока человека (рис10)

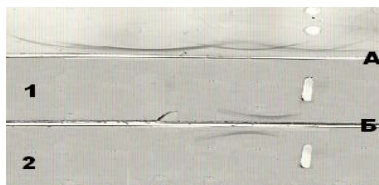


Рис. 9. Иммуноэлектрофорез лактоферрина.

1. плацентарный лактоферрин; 2. лактоферрин молока человека; А – антисыворотка к белкам крови человека; Б-Антисыворотка к лактоферрину человека.

По нашим данным относительная электрофоретическая подвижность плацентарного лактоферрина $0,41 \pm 0,006$, а очищенного препарата

лактоферрина из молока человека $0,47 \pm 0,003$. Эти различия можно считать подтверждением существования нескольких изоформ лактоферрина, обладающих одинаковой молекулярной массой, иммунохимической идентичностью, но различающихся сродством к различным ионогенным группам [Furmanski, P., Li, Z.P. 1990].

Содержание лактоферрина в водно-солевых и бутаноловых экстрактах плаценты определяется в пределах, соответственно, $1950,0 \pm 320,0$ нг/мл и 4550 ± 710 нг/мл. То есть, получены доказательства существования цитозольных и мембраносвязанных вариантов лактоферрина. Этот факт отмечен впервые. Содержание лактоферрина в водно-солевых и бутаноловых экстрактах плаценты, женщин страдавших гестозами определяется в пределах, соответственно, $2340,0 \pm 180,0$ нг/мл и $4970,0 \pm 640,0$ нг/мл. Эти данные свидетельствуют о противоположной, по сравнению с плацентарной щелочной фосфатазой, тенденцией роста концентрации лактоферрина в ткани плаценты. Если мембраносвязанная форма (бутанольная фракция) увеличивается незначительно (чуть более 9%), то водорастворимая форма возрастает на 20% ($p \leq 0,01$)

Рост уровня лактоферрина в плацентах женщин, страдавших гестозом, мы расцениваем как признак дегенерации клеток эпителия ворсин плаценты, т.к. существуют данные об участии лактоферрина в активации процессов апоптоза [Бабина С.Е. 2006].

Исследование сыворотки крови при гестозах.

Метод твердофазного иммуноферментного анализа на плацентарную щелочную фосфатазу.

Особенностью иммуноферментного анализа на плацентарную щелочную фосфатазу является наличие собственной высокой ферментативной активности и поэтому в данном случае не использовали конъюгатов антител с ферментом-индикатором, а ограничились выявлением фосфатазной активности, связанной антителами фиксированными на твердой фазе.

В работе использовали антитела к плацентарной щелочной фосфатазе полученные из моноспецифических кроличьих антисывороток к этому белку. Предел чувствительности иммуноферментного анализа на щелочную фосфатазу в данном варианте метода составил $2,5$ нг/мл. A_{410} при $2,5$ нг/мл больше A_{410} контрольной пробы на 2 среднеквадратичных отклонения. Полученная чувствительность более чем в 2 раза ниже известных из литературных данных о чувствительности классических ИФА на плацентарную щелочную

фосфатазу [Llinas P. et all. 2005]. Однако, это обстоятельство не имеет существенного значения так как средний уровень плацентарной щелочной фосфатазы в сыворотке крови здоровых беременных женщин не ниже 12,5 нг/мл и он достоверно определяется нашим методом. Мы установили, что при нормальной беременности количество ПЩФ в сыворотке крови равно в 1 – 2 триместрах $16,7 \pm 2,6$ а в 3 триместре $36,4 \pm 2,4$ нг/мл. В сыворотке крови у женщин с гестозами отмечается снижение количества ПЩФ до 12 – 4 нг/мл. При этом в большинстве случаев ПЩФ при гестозах 1 степени определяется в количестве 16-14 нг/мл. При гестозах 2 – 3 степени количество ПЩФ не превышает 7 нг/мл.

Мы провели динамическое исследование сывороток крови беременных женщин, наблюдавшихся в женской консультации №1 г. Астрахани с 15 по 36 неделю беременности, с интервалом наблюдения 2 недели. Всего было обследовано в разные периоды времени 56 женщин, среди которых у 17 развился гестоз. При ретроспективном анализе вариационных рядов полученные данные были сгруппированы не по уровню ПЩФ, а разделены по связи их с последующим развитием гестоза. В группе беременных с нормальным уровнем ПЩФ до 25 недели беременности у 30 женщин не отмечено развитие гестоза, а у 5 развился гестоз. Полученные результаты свидетельствуют, что достоверное снижение в крови беременных женщин, уровня ПЩФ, может служить прогностическим признаком развития гестоза в 3 триместре. Следует заметить, что у 6 женщин с нормально протекающей беременностью был снижен уровень ПЩФ. Однако в среднем у 17 женщин, с развившемся в последствии гестозом уровень ПЩФ был достоверно ниже чем у женщин с нормально развивавшейся беременностью.

Таблица 2.Содержание ЛФ в сыворотке крови в разные сроки неосложнённой беременности

Сроки беременности	ЛФ интервалы в нг/мл	M±m
8-24 недель (n=42)	1500-2200	1787,5±216,0
29-40 недель (n=64)	3500-6500	4995,0±340,0

По нашим данным[табл.2], содержание лактоферрина в сыворотке крови беременных с физиологически протекающей беременностью колеблется в пределах показателей у здоровых доноров (1500-2200 нг/мл) в период до 24 недель. После этого срока,

вплоть до 40 недель беременности отмечено повышение уровня ЛФ до 3500-6500 нг/мл у 88% женщин.

Учитывая данные по обнаружению лактоферрина в водно-солевых и бутаноловых экстрактах плаценты, можно допустить, что причиной гиперлактоферринемии у беременных и рожениц является продукция лактоферрина плацентой. Это согласуется с результатами Thaler et al [1999] которые с помощью моноклональных антител к ЛФ выявили реакцию интерстиция трофобласта базальной площадки плаценты человека и ворсинок цитотрофобласта, но не ворсинок хориона. Они сделали вывод о том, что клетки трофобласта плаценты экспрессируют уникальные эпитопы ЛФ. Такая экспрессия повышается в присутствии активированных макрофагов и является экстраэмбриональным ответом на воспаление и реакцией организма матери, направленной на защиту трофобласта [Thaler C.J., et al. 1999].

При гестозах гиперлактоферринемия может достигать 178% от уровня при неосложнённой беременности (рис.10), что, видимо, связано как с патологическими процессами в ткани плаценты, так и с неспецифической реакцией организма на этот процесс.

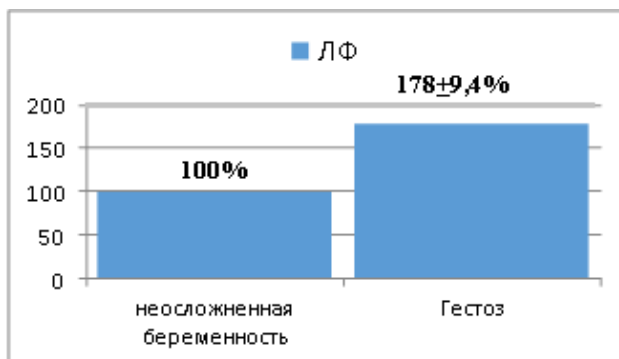


Рис 10. Динамика уровня лактоферрина сыворотки крови про неосложненной беременности и гестозах разной тяжести (уровень лактоферрина при неосложненной беременности принят 100%)

Неинвазивные иммунохимические исследования мочи при гестозах.

В составе мочи беременных с гестозом ЩФ колориметрическим методом выявляется в 80,4% случаев с активностью от 1 до 16 ЕД Боданского ($M \pm m = 7,3 \pm 1,4$) также пропорционально степени тяжести протеинурии. В составе мочи здоровых беременных ЩФ колориметрическим методом выявляется в 36,6% случаев с активностью от 1 до 8 ЕД Боданского ($M \pm m = 4,8 \pm 0,6$).

Методом ИФА определяется ПЩФ в 96,6% случаев в моче беременных с гестозами, со средней концентрацией $75,8 \pm 0,8$ нг/мл. В контрольной группе у здоровых беременных ПЩФ выявляется в 6,7% случаев со средней концентрацией $5,2 \pm 0,5$ нг/мл. Эти данные получены нами впервые.

Обнаружение лактоферрина в моче в 95,7% случаев также характеризуется неоднозначно: от следовых количеств до выраженной гиперлактоферринурии, соответственно от нескольких десятков до нескольких тысяч нг/мл, как в сыворотке крови. При этом высокие количества ЛФ в моче часто отмечаются на фоне нормального числа лейкоцитов в анализах мочи по Нечипоренко, следовательно, появление ЛФ в моче и его концентрации могут зависеть от других патогенетических причин, не связанных с лейкоцитурией, но отражающих степень выраженности патологических процессов в почках при гестозах. Эти данные также получены нами впервые и могут иметь важное диагностическое значение.

Итак, преимущества иммунохимических методов исследования мочи перед существующими в клинике стандартными методиками заключаются не только в **достоверно более высокой** чувствительности в диагностике общей протеинурии, но также и в возможности выявления в этой биологической жидкости отдельных белковых компонентов, определении их «паспортных» характеристик, как бы, «протеиномики» мочи или селективной протеинурии.

В литературе нет аналогичных исследований изоферментов щелочной фосфатазы, лактоферрина в моче у беременных и считаем, что полученные результаты имеют не только научную новизну, но и практическое значение для диагностики и оценки патогенетических механизмов нефропатии при токсикозах беременности.

Мы провели динамическое исследование мочи 96 здоровых (на момент исследования) беременных и определяли методом ИФА уровни плацентарной щелочной фосфатазы и лактоферрина в их суточной моче на 20-22 неделе беременности и повторно через 2 недели. Все беременные женщины наблюдались до родов и

регистрировалось развитие гестозов. Из 96 женщин гестоз развился у 17. Ретроспективный анализ лабораторных данных позволил нам предложить формулу вероятности развития гестоза у беременных женщин уже на 22 неделе беременности. Прогноз — это вероятностное суждение о будущем состоянии объекта исследования. В нашем случае прогноз основан на сумме концентраций плацентарной щелочной фосфатазы и концентрации лактоферрина, определенных двукратно с интервалом в 2 недели. При таком расчете суммарная концентрация выше 16,0 нг/мл позволяет судить о возможности развития гестоза с вероятностью 75%.

Чувствительность метода: $\frac{\text{Истинноположительные}}{\text{Истинноположительные} + \text{Ложнонегативные}} = 75,0\%$.

Специфичность: $\frac{\text{Истиннонегативные}}{\text{Истиннонегативные} + \text{Ложноположительные}} = 89,7\%$.

Таким образом, это означает: у 75,0% беременных женщин с суммарным уровнем ПЩФ и лактоферрина выше 16,0 нг/мл прогноз развития гестоза оказывается верным. Специфичность равна 89,7%. следовательно, у 89,7% пациентов, с заведомо отрицательным прогнозом, результаты теста отрицательны. Отрицательная разница в 14,7% между достоверно положительным прогнозом и достоверно отрицательным прогнозом является фактором неопределенности и в данном случае открывает возможности для введения новых прогностических признаков для повышения чувствительности.

По нашему мнению, механизмы элиминации различных белков при селективной протеинурии могут быть неоднозначными и, вероятно, обусловлены их избирательностью для того или иного маркера, включая проницаемость клубочково-канальцевого фильтра для мелких, средних и крупных белковых молекул.

В конечном итоге, указанные в организме матери, видимо, небезразличны для функционирования фетоплацентарного комплекса и развития плода.

ВЫВОДЫ.

1. Разработан метод выделения плацентарной щелочной фосфатазы основанный на свойстве этого белка специфически связываться с лектином бодяги пресноводной.
2. Разработан упрощенный способ иммуноферментного определения плацентарной щелочной фосфатазы основанный на ее собственной ферментативной активности.
3. В плацентах женщин, страдавших гестозами наблюдается значительный дисбаланс между уровнем щелочных фосфатаз в цитозольной и мембранной фракциях. Происходит активное вымывание специфической плацентарной фосфатазы в цитозольную фракцию.
4. Впервые получены доказательства существования цитозольных и мембраносвязанных вариантов лактоферрина и показано, что в плацентах женщин, страдавших гестозами происходит достоверный рост концентрации лактоферрина в ткани плаценты.
5. Предложена формула вероятности развития гестоза у беременных женщин. Прогноз основан на сумме концентраций плацентарной щелочной фосфатазы и концентраций лактоферрина, определенных двукратно с интервалом в 2 недели. При таком расчете суммарная концентрация выше 16,0 нг/мл позволяет судить о возможности развития гестоза с вероятностью 75%, при специфичности 89,7%.

**Список научных работ, опубликованных по теме
Диссертации**

1. *Ахушкова Л.М., Сухарев А.Е., Булах Н.А. Н.П. Москаленко, Вайчулис Ю.В. Плацентарная щелочная фосфатаза и острофазовые белки в оценке гестозов// Астраханский медицинский журнал, 2011, т.6, №3, стр. 252 – 254.
 2. Ахушкова Л.М., Сухарев А.Е., Булах Н.А. Плацентарная щелочная фосфатаза – маркер эмбриональных и малигнизированных тканей // "Успехи современного естествознания" 2011 - №4 - с. 41-46
 3. Ахушкова Л.М. Иммунохимический анализ мочи при гестозах. ТРУДЫ АГМА том 43 –с.187-188
 4. Akhushkova ., Sukharev A., Nikolaev A.A.. Immunochemical research methods in gestosis\\ Family Health — the XXI century: Materials of the XVII International scientific conference, the editorship of. Y.Perevalov; «completely», -2013. — p.35-38.
 5. Сухарев А.Е., Ахушкова Л.М., Булах Н.А. Плацентарная щелочная фосфатаза в онтогенезе и при патологии\\Современные проблемы науки и образования- 2011-№ 5 –с.57-62
 6. *Николаев А.А., Ахушкова Л.М., Сухарев А.Е. Характеристика лектина из бодяги речной (*Ephydatia fluviatilis*)\\ "Фундаментальные исследования"2013- №2 (часть 1), -с.24-27
 7. *Николаев А.А., Ахушкова Л.М., Сухарев А.Е. Исследование щелочной фосфатазы в ткани плаценты при гестозах// "Фундаментальные исследования" 2013-№ 12 (часть 2)-стр. 167-171.
 8. *Булах Н.А., Николаев А.А., Ахушкова Л.М., Сухарев А.Е., Москаленко Н.П.. Изучение С-реактивного протеина при беременности\\ "Фундаментальные исследования"-2014-№4 –С. 619-623.
 9. *Способ прогнозирования гестозов у беременных. Заявка на изобретение №201412290 (037291) от 04.06.2014. Положительное решение на выдачу патента от 27.01.2015.
 - 10.* Способ выделения щелочной фосфатазы плацентарного типа. Заявка на изобретение №2014122905(037292) от 04.06.2014. Положительное решение на выдачу патента от 27.01.2015.
- * - работа опубликована в журнале, включенном Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий.

Список сокращений

HEL4 - линия «бессмертных» клеток, используемая во множестве научных исследований в области биологии и фармакологии.

АМГФ - альфа2-микроглобулин фертильности

АТФ - аденозинтрифосфат

АФП - альфа-фетопротеин

БОФ – белки острой фазы

ВЗОМТ - воспалительные заболевания органов малого таза

ИДА – иммунодиффузионный анализ в агаре

ИФА – иммуноферментный анализ

ИЭФ – иммуноэлектрофорез

КФ - кислая фосфатаза

ЛФ - лактоферрин

ПЛ - плацентарный лактоген

ПЩФ - плацентарная щелочная фосфатаза

СРБ – С-реактивный белок

ТКЩФ – тонкокишечная щелочная фосфатаза

ХГЧ - хорионический гонадотропин человека

ЩФ - щелочная фосфатаза