

## АНТИТЕЛА К КСЕНО- И ЭНДОБИОТИКАМ У ЖЕНЩИН С ПРИВЫЧНЫМ НЕВЫНАШИВАНИЕМ БЕРЕМЕННОСТИ

© 2009 Е.Г. Поленок<sup>1</sup>, Т.П. Аносова<sup>1</sup>, М.П. Аносов<sup>1</sup>, М.В. Костянко<sup>2</sup>, А.Н. Глушков<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт экологии человека Сибирского отделения РАН, г. Кемерово

<sup>2</sup> Кемеровский государственный университет

Поступила в редакцию 10.11.2009

Разработана методика иммуноанализа антител к ксенобиотику бензо[а]пирену (Вр) и эндобиотикам – стероидным гормонам эстрадиолу (Es) и прогестерону (Pg) в сыворотке крови. Выявлены антитела трех классов (IgA, IgG, IgM) к Вр, Es и Pg у женщин с физиологическим течением беременности и с привычным невынашиванием беременности. Показано, что при высоких значениях соотношений уровней антител ксенобиотик/эндобиотик относительный риск (RR) привычного невынашивания беременности возрастает в 3-20 раз.

Ключевые слова: невынашивание беременности, ксенобиотик, эндобиотик, иммуноанализ

Несмотря на достижения современной медицины, проблема вынашивания здорового потомства до сих пор остается актуальной. В публикациях последних лет все больший акцент придается иммунологическому характеру невынашивания беременности в результате возникновения аутоиммунных процессов. Аутоантитела обнаруживаются при различных заболеваниях, их особая роль в патологическом процессе доказана для таких заболеваний как антифосфолипидный синдром, аутоиммунный тиреоидит и др. [1, 4]. В немногочисленных работах [6, 8, 12, 13] авторами показана роль аутоантител к стероидным гормонам, к фосфолипидам, хорионическому гонадотропину в патогенезе привычного невынашивания беременности. Особый интерес представляют антитела (АТ) не только к собственным эндобиотикам, но и к ксенобиотикам окружающей среды, оказывающих значительное влияние на нормальное течение беременности. Одним из таких ксенобиотиков является бензо[а]пирен (Вр) из группы полициклических ароматических углеводородов, который является не только канцерогеном, но и тератогеном [3]. АТ к Вр и его аддуктам с ДНК выявляются не только у людей, занятых в производстве с высокой экспозицией к Вр [3, 10], но и у онкологических больных [2, 9]. Сходство

структуры и характера метаболизма Вр и стероидных гормонов позволяет предположить и сходство механизмов образования АТ к этим веществам, и возможное их участие в возникновении репродуктивных нарушений.

**Целью нашей работы** было разработать методику определения АТ к стероидным гормонам и бензо[а]пирену и изучить особенности образования антител к ксено- и эндобиотикам у женщин с привычным невынашиванием беременности (ПНБ).

**Материалы и методы исследования.** Материалом исследований послужили образцы сыворотки крови женщин во втором триместре беременности (12-25 недель): 61 женщина с физиологическим течением беременности (контроль) и 81 женщина с ПНБ. Все женщины наблюдались в Кемеровском областном перинатальном центре ДГКБ №5 и в Областной медико-генетической консультации. Изотипический состав АТ к ксенобиотику бензо[а]пирену (Вр) и к эндобиотикам прогестерону (Pg) и эстрадиолу (Es) определяли методом неконкурентного иммуноферментного анализа, разработанного в лаборатории иммунобиотехнологии Института экологии человека СО РАН. Иммунологические полистирольные планшеты сенсibilizовали растворами конъюгатов Вр, Pg, Es с бычьим сывороточным альбумином (BSA), синтезированных по методике [11], в концентрации 2 мкг/мл при температуре 25°C в течение ночи. Для блокировки свободных мест на пластике в лунки вносили по 250 мкл. блокирующего раствора (натрий-фосфатный буфер PBS, содержащий 0,5% BSA и 0,05% Tween 20) и инкубировали в течение 30 мин. при комнатной температуре. Сыворотки крови разводили на блокирующем растворе: для определения IgA сыворотку разводили 1:20, IgG – 1:100, IgM – 1:50. В лунки вносили по 100 мкл. сыворотки

*Поленок Елена Геннадьевна, кандидат фармацевтических наук, заведующая лабораторией иммунобиотехнологии. E-mail: ihe@list.ru*

*Аносова Татьяна Петровна, научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунохимии канцерогенеза. E-mail: ihe@kemtrel.ru*

*Аносов Михаил Петрович, научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунохимии канцерогенеза. E-mail: ihe@kemtrel.ru*

*Костянко Михаил Владимирович, ассистент кафедры органической химии*

*Глушков Андрей Николаевич, доктор медицинских наук, директор. E-mail: presidium@kemtrel.ru*

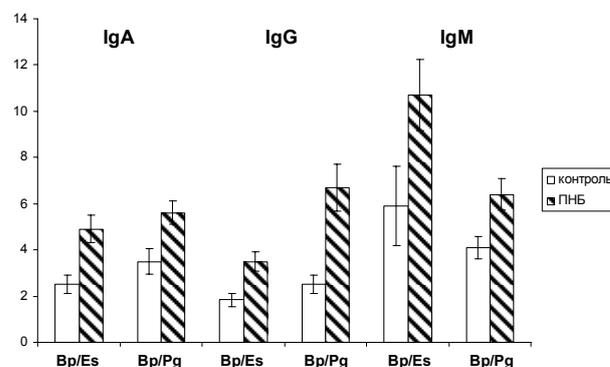
крови, инкубировали при 37°C на шейкере в течение 1 ч. Затем в лунки вносили по 100 мкл. пероксидазного конъюгата АТ кролика против иммуноглобулинов человека («Dako-Cytomation», Дания), инкубировали при 37°C на шейкере в течение 1 ч. После каждого этапа инкубации планшеты отмывали 4-5 раз PBS, содержащим 0,05% Tween 20 (PBST). Регистрацию адсорбированных на планшете антител проводили с помощью субстратного буфера, содержащего тетраметилбензидин (ТМБ, США) на фотометре (Пикон, Россия) при длине волны 450 нм.

Соотношение уровней АТ ксенобиотик/эндобиотик вычисляли путем деления оптических плотностей (OD) Вр/Es и Вр/Pg с вычетом фонового связывания сывороток с BSA. Статистическую обработку данных проводили с помощью непараметрического критерия  $\chi^2$  с поправкой Йетса на непрерывность вариации при уровне значимости  $p < 0,05$  и U-критерия Манн-Уитни ( $p < 0,05$ ) [5]. Относительные риски (RR) возникновения репродуктивной патологии рассчитывали по методу [7] с доверительным интервалом (CI) при 95% уровне значимости.

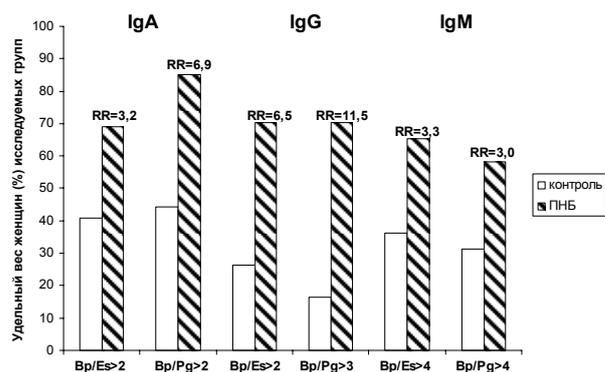
**Результаты и обсуждение.** В результате проведенного исследования у женщин с ПНБ и с физиологическим течением беременности были выявлены АТ трех классов А, G, М к ксенобиотику Вр и эндобиотикам – стероидным гормонам Es и Pg. Соотношение уровней АТ Вр/Es и Вр/Pg классов А, G, М у женщин с ПНБ было 1,5-2 раза значимо выше, чем в контрольной группе женщин с физиологическим течением беременности ( $p < 0,05$ ) (рис. 1). Нами были выявлены максимально значимые границы значений соотношений уровней АТ ксенобиотик/эндобиотик, по которым женщины с репродуктивной патологией отличались от контрольной группы ( $p < 0,0001$ ). Соотношения IgA-АТ Вр/Es и Вр/Pg  $\leq 2$  чаще встречались у женщин с физиологическим течением беременности, у женщин с ПНБ чаще встречались соотношения  $> 2$  (рис. 2).

У женщин с физиологическим течением беременности чаще встречались соотношения IgG-АТ Вр/Es  $\leq 2$  и Вр/Pg  $\leq 3$ , при ПНБ –  $> 2$  и  $> 3$  соответственно. Соотношения IgM-АТ Вр/Es и Вр/Pg  $\leq 4$  чаще встречались у женщин с физиологическим течением беременности, при ПНБ –  $> 4$  (рис. 2). Максимальные значения риска развития ПНБ обнаружены у женщин при соотношении уровней IgA-АТ Вр/Pg  $> 2$  и IgG-АТ Вр/Pg  $> 3$  (рис. 2). Риск возникновения репродуктивных нарушений возрастает при одновременном обнаружении IgA- и IgG-АТ с высокими соотношениями как Вр/Es, так и Вр/Pg (табл. 1). При данном сочетании риск

возникновения ПНБ увеличивается в 16 раз. Максимальная величина риска возникновения репродуктивных нарушений выявлена при высоких значениях соотношений уровней АТ Вр/Es и Вр/Pg всех трех классов иммуноглобулинов (RR=20,8). Это диктует необходимость комплексного анализа данных показателей для ранней диагностики репродуктивных нарушений.



**Рис. 1.** Соотношение уровней антител классов А, G, М к бензо[а]пирену и к эстрадиолу (Вр/Es) и к прогестерону (Вр/Pg) у женщин исследуемых групп



**Рис. 2.** Удельный вес женщин (%) и относительные риски (RR) возникновения ПНБ при высоких значениях соотношений уровней антител классов А, G, М ксенобиотик/эндобиотик

**Выводы:** на основании результатов проведенного исследования с помощью разработанной нами методики иммуноанализа АТ к ксено- и эндобиотикам можно говорить об иммунохимическом дисбалансе при ПНБ, для которого характерны высокие значения соотношений уровней АТ к химическим канцерогенам (бензо[а]пирену) и к стероидным гормонам (эстрадиолу, прогестерону) у женщин с репродуктивной патологией. При высоких значениях указанных соотношений риск возникновения ПНБ возрастает в 3-20 раз. Показатель соотношения уровней АТ ксенобиотик/эндобиотик может являться маркером репродуктивной патологии и рекомендуется для

ранней лабораторной диагностики привычного невынашивания беременности.

**Таблица 1.** Относительные риски (RR) привычного невынашивания беременности (ПНБ) при высоких значениях соотношений уровней антител к бензо[а]пирену и эстрадиолу (Bp/Es) и прогестерону (Bp/Pg)

Класс АТ, соотношение	RR, CI
IgA Bp\ES>2	3,2(0,9-11,4)
IgG Bp\ES>2	6,5(1,8-23,3)
IgM Bp\ES>4	3,3(0,9-11,9)
IgA Bp\PG>2	6,98(1,9-25,1)
IgG Bp\PG>3	11,5(3,2-41,5)
IgM Bp\PG>4	3,0(0,8-10,8)
IgA Bp\ES>2, Bp\PG>2	6,5(2,5-17,2)
IgG Bp\ES>2, Bp\PG>3	11,1(4,2-29,3)
IgM Bp\ES>4, Bp\PG>4	2,8(1,0-7,3)
IgA Bp\ES>2, Bp\PG>2	16,7(6,3-44,3)
IgG Bp\ES>2, Bp\PG>3	
IgM Bp\ES>4, Bp\PG>4	20,8(7,8-54,9)

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. *Гладкова, К.А.* Роль сенсibilизации к прогестерону в клинике привычного невынашивания беременности / *К.А. Гладкова, И.В. Менжинская, Г.Т. Сухих, В.М. Сидельникова* // Проблемы репродукции. – 2007. - №6. – С. 95-98.
2. *Глушков, А.Н.* Изотипические особенности антител к полициклическим ароматическим углеводородам у больных раком молочной железы, желудка, толстой и прямой кишки / *А.Н. Глушков, Т.П. Аносова, Н.Г. Небесная, Л.Я. Железнова* // Эксперимент. онкология. – 1996. – Т. 18. – С. 426-428.
3. *Глушков, А.Н.* Антитела в канцерогенезе. – Кемерово: Кузбассвузиздат, 2000. – 164 с.
4. *Добродеева, Л.К.* Содержание аутоантител у практически здоровых людей / *Л.К. Добродеева, Л.В. Сенькова, Г.Т. Лютфалиева* и др. // Физиология человека. – 2006. – Т. 12, №1. – С. 99-107.
5. *Лакин, Г.Ф.* Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 350 с.
6. *Менжинская, И.В.* Антипрогестероновые антитела в клинике первичной потери беременности / *И.В. Менжинская, К.А. Гладкова, В.М. Сидельникова, Г.Т. Сухих* // Иммунология. – 2008. - №1. – С. 34-37.
7. *Певницкий, Л.А.* Статистическая оценка ассоциаций HLA-антигенов с заболеваниями // Вестник АМН СССР. – 1988. - №7. – С. 48-51.
8. *Сидельникова, В.М.* Привычная потеря беременности. М.:Наука, 2000. – 145 с.
9. *Chagnaud, J.L.* Identification and immunochemical characterization of IgA in sera of patients with mammary tumors / *J.L. Chagnaud, S. Faiderbe, M. Geffard* // Int. J. Cancer. – 1992. – V. 50. – P. 395-401.
10. *Galati, R.* Detection of antibodies to the benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adducts in sera from individuals exposed to low doses of polycyclic aromatic hydrocarbons / *R. Galati, A. Zijno, R. Crebelli* et al. // J. Exp. Clin. Cancer Res. – 2001. – V. 20, № 3. – P. 359-364.
11. *Glushkov, A.N.* Synthesis of polycyclic aromatic hydrocarbon-protein conjugates for preparation and immunoassay of antibodies // Rus. J. Immunol. – 2002. – V. 7, № 1. – P. 42-46.
12. *Itsekson, A.M.* Recurrent pregnancy loss and inappropriate local immune response to sex hormone / *A.M. Itsekson, D.S. Seidman, M. Zolti* et al. // Am. J. Reprod. Immunol. – 2007. – V. 57, № 2. – P. 160-165.
13. *Shoenfeld, Y.* Autoantibodies and prediction of reproductive failure / *Y. Shoenfeld, H.J. Carp, V. Molina* et al. // Am. J. Reprod. Immunol. – 2006. – V. 56. – P. 337-344.

## ANTIBODIES TO XENO- AND ENDOBIOTICS AT THE WOMEN WITH RECURRENT PREGNANCY LOSS

© 2009 E.G. Polenok<sup>1</sup>, T.P. Anosova<sup>1</sup>, M.P. Anosov<sup>1</sup>, M.V. Kostyanko<sup>2</sup>, A.N. Glushkov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Human Ecology SB RAS, Kemerovo

<sup>2</sup> Kemerovo State University

The method of immunoassay of antibodies to xenobiotic benzo[a]pyrene (Bp) and endobiotics – steroid hormones estradiol (Es) and progesterone (Pg) in blood serum was developed. The three classes (IgA, IgG, IgM) antibodies to Bp, Es and Pg at the women with physiological pregnancy and with recurrent pregnancy loss were revealed. It is shown, that at high ratio meanings of levels of antibodies xenobiotic/endobiotic the relative risk (RR) of recurrent pregnancy loss grows at 3-20 of times.

Key words: *pregnancy loss, xenobiotic, endobiotic, immunoanalysis*

*Elena Polenok, Candidate of Pharmacy, Chief of the Immunobiotechnology Laboratory. E-mail: ihe@list.ru*  
*Tatiana Anosova, Research Fellow at the Laboratory of Molecular Immunochimistry of Cancerogenesis. E-mail: ihe@kemetel.ru*  
*Mikhail Anosov, Research Fellow at the Laboratory of Molecular Immunochimistry of Cancerogenesis*  
*Mikhail Kostyanko, Assistant at the Department of Organic Chemistry*  
*Andrey Glushkov, Doctor of Medicine, Director. E-mail: presidium@kemnet.ru*