

**РАЗРАБОТКА ПРОТОТИПА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ИММУНОАНАЛИЗА АНТИТЕЛ ДЛЯ
ВЫЯВЛЕНИЯ ВЕРОЯТНОСТИ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ВРОЖДЁННЫХ ПОРОКОВ
РАЗВИТИЯ ПЛОДА НА РАННИХ СРОКАХ БЕРЕМЕННОСТИ.&NBSP;**

Красильникова Ксения Сергеевна

научный сотрудник ФИЦ УУХ СО РАН, РФ, г. Кемерово

Аверьянов Антон Викторович

инженер-биолог ФИЦ УУХ СО РАН, РФ, г. Кемерово

Гуров Евгений Александрович

инженер-биолог ФИЦ УУХ СО РАН, РФ, г. Кемерово

**Development of a prototype of test system of immunoassay of antibodies for identification
of probability of congenital malformations of fetus on early terms of pregnancy**

Ksenia Krasilnikova

research officer of FRC CCH SB RAS, Russia, Kemerovo

Anton Averianov

engineer-biologist of FRC CCH SB RAS, Russia, Kemerovo

Evgeny Gurov

engineer-biologist of FRC CCH SB RAS, Russia, Kemerovo

Аннотация. Современные неинвазивные методы диагностики врождённых пороков развития плода в последнее время всё чаще подвергаются критике из-за несвоевременности и узкой специфичности. В статье описывается проект создания прототипа тест-системы раннего выявления вероятности пороков развития плода, обладающей полиспецифичностью по отношению к формируемым порокам. Выявлены маркёрные антитела к ксено- и эндобиотикам и их диагностические границы. Рассчитана вероятность возникновения пороков при высоких уровнях антител.

Abstract. Modern noninvasive methods of diagnosis of congenital malformations of a fetus even more often are exposed to criticism because of inopportuneness and narrow specificity. In article the project of development of a prototype of test system of early identification of the probability of malformations of a fetus having polyspecificity in relation to the formed malformations has described. Marker antibodies to kseno- and endobiotics and their diagnostic levels were revealed. The probability of identification of defects at high levels of antibodies were calculated.

Ключевые слова: антитела, бензо[а]пирен, эстрадиол, прогестерон, врождённые пороки развития плода.

Keywords: antibodies, benzo[a] pyrene, estradiol, progesterone, congenital malformations of a fetus.

Наиболее частыми индуцирующими факторами врождённых пороков развития плода (ВПП) являются различные химические вещества и их соединения, широко используемые на производстве и в народном хозяйстве [1]. На территории Кемеровской области большое распространение получили низкомолекулярные соединения, образующиеся в процессе сжигания и переработки угля – полициклические ароматические углеводороды (ПАУ). Они представляют наибольшую опасность из-за обладания мутагенными, канцерогенными и тератогенными свойствами, и способностью вызывать соответственно наследственные и онкологические заболевания, а также ВПП [3]. Существующие в настоящее время в акушерской практике «стандарты медицинской помощи беременным при поражениях плода» разработаны ещё в 2006 г. и не подвергались пересмотру. А включённые в них скрининговые неинвазивные исследования проводятся лишь после 12 недель беременности, и не оправдывают надежды по эффективному выявлению и прогнозированию патологий беременности.

Целью данной работы явилось создание прототипа тест-системы иммуноанализа антител (АТ) для выявления ВПП до 12 недель беременности.

Материалы и методы. В исследование были включены 61 беременная женщина. Забор биоматериала – 30 мкл. сыворотки венозной крови – проводился дважды за беременность – в I триместре (до 12 недель) и во II триместре (13–27 недель). Анкетирование женщин проводилось в начале беременности 1 раз. Сбор гинекологического анамнеза проводился дважды (в I и во II триместрах). По результатам УЗИ на сроках 20–24 недели, женщины были разделены на 2 группы: в группу с ВПП вошли 25 женщин, вынашивающие плод с патологиями развития. Таковыми оказались патология пуповины, ВПП лицевой части черепа, гидроцефалия, ВПП сердечно-сосудистой системы, кисты сосудистых сплетений мозга. 36 женщин, не имеющих патологии плода, составили группу контроля. Средний возраст пациентов составил $23,2 \pm 2,3$ года.

Исследование уровня АТ проводилось методом непрямого неконкурентного ИФА [2]. Уровень АТ, специфичных к ксенобиотику бензо[а]пирену (Вр) и эндобиотикам эстрадиолу (Es) и прогестерону (Pg), рассчитывается по формулам:

$$Ig\text{-}Bp = (OD_{(Bp\text{-}BSA)} - OD_{(BSA)}) / OD_{(BSA)},$$

$$Ig\text{-}X = (OD_{(X\text{-}BSA)} - OD_{(BSA)}) / OD_{(BSA)},$$

где: OD – значение оптической плотности в соответствующих лунках, Ig-Bp – антитела к Вр, X – эндобиотики Es и Pg, и соответственно Ig-X – антитела к данным эндобиотикам.

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета прикладных программ STATISTICA 6.0 с использованием критерия χ^2 с поправкой Йетса для непрерывной вариации. Диагностические границы – пороговый уровень АТ между нормой и патологией – определяли при помощи ROC-анализа [4].

Результаты и обсуждение. Исследования АТ в I триместре беременности проходили без учёта наличия/отсутствия ВПП, так как соответствующее заключение УЗИ пациенты получают лишь во II триместре.

По окончании исследований было выявлено, что медианы уровней АТ к Вр, Es и Pg в I триместре значительно превышают таковые во II триместре беременности как в группе ВПП, так и в контрольной группе (табл.1)

Таблица 1.

Медианы уровней антител (Me) к бензо[а]пирену, эстрадиолу и прогестерону у женщин контрольной группы и с ВПРП в I и II триместре беременности

АТ	Me (L.Q.-U.Q.) контроль I	Me (L.Q.-U.Q.) контроль II	p (M.-W. test)	Me (L.Q.-U.Q.) ВПРП I	Me (L.Q.-U.Q.) ВПРП II
IgA-Bp	6,8 (4,2-10,4)	2,1 (1,4-3,4)	0,00001	8,7 (7,5-12,8)	2,4 (1,5-4,2)
IgA-Es	8,1 (4,1-9,9)	1,7 (0,8-3,3)	0,00001	5,7 (5,4-13,5)	1,3 (0,7-2,8)
IgA-Pg	8,4 (6,4-12,4)	1,6 (0,9-2,9)	0,00001	9,3 (8,2-12,1)	0,9 (0,6-1,9)
IgG-Bp	11,03 (7,7-14,8)	1,6 (1-2,9)	0,00001	18,7 (12,7-26,9)	1,8 (0,8-2,9)
IgG-Es	13,3 (6,7-18,4)	1,7 (0,8-3,4)	0,00001	22,5 (13,2-26,6)	1,2 (0,8-2,8)
IgG-Pg	10,6 (5,4-15,9)	0,9 (0,5-1,7)	0,00001	22,7 (17,8-24,6)	0,8 (0,3-1,7)
IgM-Bp	16,8 (13,5-27,7)	5,7 (3,6-10,1)	0,00001	29,5 (24,9-43,1)	8,6 (5,1-11,8)
IgM-Es	7,6 (5,9-12,3)	1,9 (1,2-4,2)	0,00001	11,1 (6,3-22,5)	1,8 (1,1-3,9)
IgM-Pg	20,7 (15,2-35)	3,8 (2-6,6)	0,00001	30,3 (19,9-44,1)	2,6 (1,6-4,2)

Коль скоро необходимо было найти возможность прогнозирования ВПРП на ранних сроках беременности, нами были выявлены статистически значимые различия уже в I триместре беременности между группой контроля и группой с ВПРП. Уровень АТ у женщин с ВПРП значимо превышал уровень АТ в контроле в 1,5-2 раза. Однако не все значения имели высокий уровень достоверности. Так, значимыми можно считать только различия между группами по Me уровней IgA-Bp, IgG-Bp, IgG-Es, IgG-Pg и IgM-Bp ($p < 0,05$) (табл.2).

Таблица 2.

Медианы уровней антител (Me) к бензо[а]пирену, эстрадиолу и прогестерону у женщин контрольной группы и с ВПРП в I триместре беременности

АТ	Me(L.Q.-U.Q.) контроль I	Me (L.Q.-U.Q.) ВПРП I	p(M.-W)
IgA-Bp	6,8(4,2-10,4)	8,7(7,5-12,8)	0,00001
IgA-Es	8,1(4,1-9,9)	5,7(5,4-13,5)	0,00001
IgA-Pg	8,4(6,4-12,4)	9,3(8,2-12,1)	0,00001
IgG-Bp	11,03(7,7-14,8)	18,7(12,7-26,9)	0,00001
IgG-Es	13,3(6,7-18,4)	22,5(13,2-26,6)	0,00001

IgG-Pg	10,6(5,4-15,9)	22,7(17,8-24,6)	0,0
IgM-Bp	16,8(13,5-27,7)	29,5(24,9-43,1)	0,0
IgM-Es	7,6(5,9-12,3)	11,1(6,3-22,5)	0,0
IgM-Pg	20,7(15,2-35)	30,3(19,9-44,1)	0,0

При помощи ROC-анализа [4] рассчитаны диагностические границы – пороговые уровни АТ, по которым сравниваемые группы имели наибольшие различия. Так, при возрастании уровней АТ выше обозначенных границ вероятность возникновения ВПРП увеличивается. В свою очередь, при низких относительно диагностических границ уровнях АТ можно говорить об увеличении вероятности благополучного развития плода. Рассчитанный критерий AUC показывает, на сколько информативен предложенный маркер ВПРП. Условно значение AUC до 0,3-0,35 свидетельствует о том, что показатель вообще не является маркером, от 0,4 до 0,6 маркер имеет среднюю силу значимости, и выше 0,7 показатель является отличным маркером патологии. Таким образом, из всего набора показателей нами были выбраны наиболее сильные маркеры - IgG-Bp, IgG-Es и IgG-Pg. Полученные результаты представлены в табл.4.

Таблица 4.

Диагностические границы антител, вероятность возникновения врождённых пороков развития плода (OR), доверительный интервал (CI) и уровень информативности маркеров (AUC)

АТ	Контроль I триместр (%)	ВПРП I триместр (%)	Вероятность возникновения (CI 95%)	ВПРП (%)
IgG-Bp ≤12	56	17	0,17(0,05-0,58)	
>12	44	83	4,8(1,5-15,6)	
IgG-Es ≤18	69	36	0,29(0,1-0,85)	
>18	31	64	3,5(1,2-9,9)	
IgG-Pg ≤13	58	20	0,14(0,04-0,46)	
>13	42	80	6(1,8-19,2)	

Из таблицы видно, что высокие уровни АТ (>12, >18, >13) чаще выявлены в группе женщин, кому позже был поставлен диагноз ВПРП. Вероятность ВПРП при превышении данных границ возрастает в 3,5-6 раз. Для облегчения трактовки результатов были рассчитаны вероятности возникновения ВПРП и для нескольких высоких уровней АТ (табл.5).

Таблица 5.

Высокие уровни антител и возрастание вероятности возникновения ВПРП (OR)

Уровни IgG-Bp	Вероятность возникновения ВПРП (OR (CI 95%))	Уровни IgG-Es	Вероятность возникновения ВПРП (OR (CI 95%))	Уровни IgG-Pg	вероятность
>13	3,5(1,22-9,9)	>19	8,5(2,6-7,8)	>14	
>14	4,5(1,5-13,7)	>20	8,5(2,6-7,8)	>15	
>15	6,5(2,2-19,5)	>21	13,5(3,6-20,7)	>16	
>16	6,5(2,2-19,5)	>22	28,5(5,6-27,1)	>17	

Таким образом, в результате исследований по проекту было выявлено:

- уровни АТ классов А, G и М к Вр, Es и Pg в I триместре значительно превышают таковые во II триместре беременности.
- разница Me АТ между женщинами с нормальным течением беременности и женщинами, которым позже будет поставлен диагноз ВПРП, видна уже в I триместре беременности.
- наибольшую диагностическую значимость приобретают маркёры IgG-Bp, IgG-Es и IgG-Pg.
- рассчитаны пороговые значения АТ, что позволяет делать прогноз о вероятности возникновения ВПРП на ранних сроках беременности (до 12 недель).

Прототип тест-системы иммуноанализа АТ для определения вероятности возникновения ВПРП представляет собой алгоритм действий:

1. Иммуноферментный анализ IgG-АТ к Вр, Es и Pg (в I и во II триместрах).
2. Математические расчёты уровней АТ (по формулам, описанным в материалах и методах исследований).
3. Интерпретация полученных результатов (на основе таблицы 5).

Стоит учесть, что разработанный прототип тест-системы является полуколичественным методом. Современные диагностические методики используют количественные методы определения необходимых маркёров. В настоящее время разрабатывается «эталонная сыворотка» с известным содержанием рекомбинантных АТ к необходимым гаптенам [5], благодаря чему появится возможность преобразовать данную тест-систему в количественный метод. Это, в свою очередь, даст возможность говорить о новом неинвазивном методе прогнозирования вероятности возникновения ВПРП на ранних сроках беременности, что может быть применимо в акушерско-гинекологических учреждениях города.

Проект поддержан Фондом общественных инноваций по программе «У.М.Н.И.К.» (№60ГУ1/2013 от 25.09.2013).

Список литературы:

1. Антонова И.В., Богачёва Е.В., Китаева Ю.Ю. Роль экзогенных факторов в формировании врождённых пороков развития (обзор) // Экология человека. – 2010. – №06. – С.30-35.
2. Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Аносова Т.П., Савченко Я.А., Баканова М.Л., Минина В.И., Мун С.А., Ларин С.А., Костянко М.В. Сывороточные антитела к бензо[а]пирену и хромосомные aberrации в лимфоцитах периферической крови у рабочих углеперерабатывающего предприятия // Российский иммунологический журнал. – 2011. – № 5(14). – Т.1. – С. 39-44.
3. Glushkov A. N. Immunological mechanisms of adaptation to the low-weight chemical compounds in ontogenesis // Medical Hypotheses. – 2003. – №61(3). – P.405-411.
4. Hajian-Tilaki K. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evalutian // Caspian J. Intern.Med. –2013. – 4(2). – P.627-635.
5. Ustinov V.A., Studennikov A.E., Vavilov V.A., Tyumentseva M.A, Morozova V.V., Tikunova N.V., Glushkov A.N. Generation and Characterization of Human Single-Chain Antibodies Against Polycyclic Aromatic Hydrocarbons // Immunol Invest. – 2015. – №44(6). – P. 536-552.

