

ISSN 2225-6016

# ВЕСТНИК

*Смоленской государственной  
медицинской академии*

*Том 18, №2*

2019



УДК 616-092.12:612.6

## ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАЦИИ Т-КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА БЕЛЫХ КРЫС В ПЕРВУЮ ПОЛОВИНУ БЕРЕМЕННОСТИ НА РАЗВИТИЕ ПЛОДОВ

© Лис Р.Е., Молько Т.Л.

Гродненский государственный медицинский университет, 230009, Беларусь Гродно, ул. Горького, 80

### Резюме

**Цель.** Определить возможный тератогенный и эмбриотоксический эффект действия конканавалина А и циклофосфамида и сочетанного действия конканавалина А и циклофосфамида при введении их самкам белых крыс во время беременности.

**Методика.** Определение показателей пре- и постимплантационной гибели зародышей, измерение краниокаудальных размеров и закладок окостенения плодов крыс, обработанных по методу Даусона-Дыбана и окрашенных ализариновым красным.

**Результаты.** Сочетанное действие конканавалина А и циклофосфамида в первую половину беременности приводит к достоверному увеличению постимплантационной гибели зародышей и уменьшению длины закладок окостенения нижнечелюстной, плечевой, локтевой, подвздошной, седалищной костей у плодов крыс. Раздельное действие конканавалина А и циклофосфамида не вызывает такого эффекта в выбранных дозах.

**Заключение.** Так как сочетанное действие конканавалина А и циклофосфамида моделирует Т-клеточный иммунодефицит, то дисфункция Т-клеточного иммунитета матери является тератогенной для плода.

**Ключевые слова:** конканавалин А, циклофосфамид, крысы, антенатальное развитие

## EFFECT OF THE MODIFICATION OF T-CELL IMMUNITY OF WHITE RATS IN THE FIRST HALF OF PREGNANCY ON THE DEVELOPMENT OF FETUSES

Lis R.E., Molko T.L.

Grodno State Medical University, 80, Gor'kogo St., 230009, Grodno, Belarus

### Abstract

**Objective.** To determine the possible teratogenic and embryotoxic effect of concanavalin A and cyclophosphamide and the combined action of concanavalin A and cyclophosphamide when administered to female white rats during pregnancy.

**Methods.** Determination of indicators of pre- and post-implantation death of embryos, measurement of craniocaudal sizes and ossification of the fetuses of rats, processed according to the Dawson-Dyban method and stained with alizarin red.

**Results.** The combined effect of concanavalin A and cyclophosphamide in the first half of pregnancy leads to a significant increase in the post-implantation death of embryos and a decrease in the length of ossification of the mandibular, brachial, ulnar, iliac, and sciatic bones in the fetuses of rats. The separate action of concanavalin A and cyclophosphamide does not cause such an effect in selected doses.

**Conclusion.** Since the combined effect of concanavalin A and cyclophosphamide simulates T-cell immunodeficiency, the dysfunction of the mother's T-cell immunity is teratogenic to the fetus.

**Keywords:** Concanavalin A, cyclophosphamide, rats, antenatal development

### Введение

В настоящее время иммунная система рассматривается как система контроля, обеспечивающая индивидуальность и целостность организма, то есть генетический гомеостаз. Её действие основывается на способности отличать собственные структуры организма от генетически чужеродных, а также перерабатывать и элиминировать последние. Как при иммунологических

процессах, так и при защитных реакциях, иммунологические реакции тесно связаны с другими биохимическими, клеточными и фармакологическими механизмами. При этом сама иммунная реакция часто вызывает последующую цепь процессов в организме. Из вышесказанного следует, что различные нарушения в иммунной системе должны приводить к нежелательным последствиям для организма [2].

Известно, что развитие зародыша и плода происходит в генетически чуждом организме матери. Обычно генетически чуждый материал отторгается за счет иммунологических реакций, поэтому нормально протекающая беременность выглядит парадоксально. Исходя из этого, иммунная система матери должна играть одну из важнейших ролей, как в нормальном протекании беременности, так и в её нарушении. Модификация иммунной системы во время беременности бактериальными и вирусными антигенами, а также лекарственными иммунотропными препаратами, вакцинами создает риск для развития плода [5, 7, 8, 10].

Механизмы, обеспечивающие выживание плода, до конца не выяснены. Остаётся открытым вопрос и о характере иммунологических взаимоотношений между материнским организмом и организмом зародыша и плода. При этом иммунная система матери находится в разном функциональном состоянии до- и после имплантации зародыша. Поэтому модификация иммунной системы матери в доимплантационный период и после имплантации зародыша может приводить к разным эффектам относительно зародыша и плода. Для ответа на поставленные вопросы мы модифицировали Т-клеточный иммунитет матери во время беременности с помощью лектина конканавалина А (Кон А) и сочетанного действия конканавалина А и циклофосамида (ЦФ) на основании разработанной биологической модели. Кон А вызывает неспецифическую пролиферацию Т-лимфоцитов, а ЦФ, как цитостатик, останавливает пролиферативные процессы, вызывая угнетение Т-клеточного иммунитета [3, 4, 6].

Цель исследования – определить возможный тератогенный и эмбриотоксический эффект действия Кон А и ЦФ и сочетанного действия Кон А и ЦФ в выбранных дозах при введении их самкам белых крыс во время беременности.

## Методика

В эксперименте было использовано 22 беременных самок белых крыс и плоды от них. Масса самок составляла 200–250 г. Животные подопытных и интактной групп содержались в стандартных условиях вивария. Для моделирования Т-клеточного иммунодефицита беременным самкам белых крыс вводился Кон А в дозе 100 мкг/кг и через двое суток ЦФ в дозе 10 мг/кг.

В первую половину беременности раздельное введение препаратов животным подопытных групп осуществлялось следующим образом: Кон А вводился на 3-й день беременности (ДБ), а ЦФ – на 5-й ДБ (Первым днём беременности считался день обнаружения сперматозоидов во влагалищном мазке). При сочетанном воздействии эти препараты вводились животным одной той же подопытной группы по вышеприведённой схеме: Кон А вводился на 3-й ДБ, а ЦФ – на 5-й ДБ.

Так как предварительные исследования показали, что введение физиологического раствора (изотонического раствора NaCl) не изменяет уровня исследуемых показателей, поэтому контролем служили интактные животные. Интактные животные не подвергались никаким воздействиям.

Для определения тератогенного и эмбриотоксического эффекта Кон А, ЦФ и сочетанного действия Кон А и ЦФ беременных самок подопытных и интактной групп декапитировали на 20-й день беременности под эфирным наркозом.

После вскрытия маток подсчитывали количество мест имплантации и живых плодов. В яичниках определяли количество желтых тел. Эмбриотоксическое действие препаратов оценивали с помощью показателей пре- и постимплантационной гибели [1]. Под лупой МБС-1 с двойным увеличением производили внешний осмотр плодов с целью выявления врожденных пороков развития и признаков нарушения кровообращения в виде кровоизлияний. Определяли массу плодов и плацент.

Часть плодов (по одному-два плода) из помёта фиксировали в 96% этиловом спирте и обрабатывали по методу Даусона-Дыбана с окраской закладок окостенения ализариновым красным [1]. После окраски проводили измерение кранио-каудальных размеров. Окрашенные скелеты плодов дефрагментировали и под лупой МБС-1 производили измерение закладок окостенения следующих костей: теменной, нижнечелюстной, лопаточной, ключичной, плечевой, локтевой, лучевой, подвздошной, седалищной, лонной, бедренной, большой и малой берцовых.

Полученные цифровые данные от каждого животного анализировали методами непараметрической статистики посредством программы Statistica 6.0 для Windows (StatSoft, Inc., США) в связи с небольшими объемами выборок. В описательной статистике для каждого показателя определяли значения медианы (Me), границы процентилей (от 25 до 75). Количественные результаты представлены в виде Me – медиана, LQ – верхняя граница нижнего квартиля; UQ – нижняя граница верхнего квартиля. Достоверными считали различия между контрольной и опытной группами при значениях  $p < 0,05$  (Mann-Whitney U-test). Цифровые показатели представлены в виде таблиц (табл. 1, 2).

## Результаты исследования и их обсуждение

При внешнем осмотре плодов не выявлено врожденных пороков развития и признаков нарушения кровообращения в виде кровоизлияний. При статистической обработке численных показателей выявлено, что показатели предимплантационной гибели животных всех подопытных групп достоверно от интактных показателей не отличаются (табл. 1). По показателям постимплантационной гибели достоверные различия с интактными показателями наблюдаются у животных с сочетанным действием Кон А и ЦФ. У этих животных происходит увеличение постимплантационной гибели потомства (табл. 1).

Плод, развивающийся в организме матери, всегда аллогенен по отношению к ней. Это обстоятельство должно давать матери возможность развивать иммунные клеточные и гуморальные реакции против плода, как ксенотрансплантата. Однако этого парадоксально не происходит. Имеется множество механизмов обеспечивающих выживание плода в организме матери. И, по-видимому, именно иммунологические механизмы являются определяющими. С одной стороны зародыш представляет свои антигены, с другой – материнская иммунная система распознаёт их и реагирует.

Известно, что при беременности меняется соотношение Th1 и Th2 в сторону увеличения последних, что может определять супрессию иммунного ответа на плодные антигены. Сочетанное действие Кон А и циклофосфана может снижать количество Th2, а значит может изменяться это соотношение в сторону относительного увеличения Th1, что и приводит к отмене толерантности иммунной системы матери к зародышу и прерыванию беременности [9].

Кроме того, в возникновении толерантности к плоду могут принимать участие дельта/гамма Т-лимфоциты. Трофобласт не вызывает трансплантационный иммунитет и противостоит НК- и CTL-опосредованному лизису *in vitro*. Это определяется отсутствием экспрессии генов главного комплекса гистосовместимости А и В класса I в нём. Однако неполиморфные молекулы главного комплекса гистосовместимости G класса Ib экспрессируются в экстравиллёзных клетках цитотрофобласта, в эндотелиальных клетках сосудов плода в ворсинках хориона, в клетках амниона и амниотической жидкости. Именно гамма/дельта-Т-лимфоциты распознают консервативные молекулы млекопитающих на трофобласте без полиморфного главного комплекса гистосовместимости класса I. Это и приводит к запуску механизмов толерантности иммунной системы матери к антигенам плода. Сочетанное действие Кон А и циклофосфана может уменьшать количество активированных гамма/дельта-Т-лимфоцитов с последующим нарушением толерантности иммунной системы матери к антигенам плода и прерыванием беременности [9].

Кранио-каудальные размеры несколько уменьшены только у плодов при сочетанном введении КонА и ЦФ – на 5,2%. Однако статистически достоверных различий с контрольными показателями не наблюдается (табл. 1). Масса тела плодов у животных подопытных и интактной групп практически одинакова, достоверных различий между этими показателями не наблюдается. Масса плацент у плодов подопытных животных несколько выше, чем у интактных животных, но различия с интактными показателями также статистически недостоверны (табл. 1).

При анализе длины закладок окостенения практически всех костей выявляется общая тенденция уменьшения этого показателя у животных подопытной группы при сочетанном введении Кон А и ЦФ по сравнению с животными интактной и других подопытных групп. При этом достоверные различия у плодов подопытной группы при сочетанном введении Кон А и ЦФ и плодов интактной группы наблюдаются между размерами закладок окостенения нижнечелюстной (уменьшение на 3,23%), плечевой (уменьшение на 13,25%), локтевой (уменьшение на 6,18%), подвздошной (уменьшение на 16,13%), седалищной (уменьшение на 40 %) костей (табл. 2).

Таблица 1. Показатели предимплантационной и постимплантационной гибели зародышей, кранио-каудальные размеры плодов, массы плодов и плацент на 20-й день беременности (ДБ) подопытных и контрольных животных при введении Кон А и ЦФ в первую половину беременности (Ме (Q<sub>1</sub>; Q<sub>2</sub>))

Показатель	Интактные (n=4)	Кон А 3-й ДБ (n=8)	ЦФ 5-й ДБ (n=3)	Кон А 3-й ДБ + ЦФ 5-й ДБ (n=7)
Предимплантационная гибель	0,05 (0ч0,10)	0,11 (0ч0,56)	0 (0ч0)	0,09 (0ч0,22)
Постимплантационная гибель	0 (0ч0)	0 (0ч0,045)	0 (0ч0,09)	0,11* (0ч0,29)
Кранио-каудальный размер, мм	29,0 (29 ч30)	29,0 (28 ч 30)	29,5 (29 ч30)	27,5 (26,5ч29)
Масса плода, г	1,93 (1,8; 2,3)	1,96 (1,86ч1,97)	1,96 (1,86ч1,97)	1,96 (1,78ч1,99)
Масса плаценты, г	0,55 (0,54ч0,56)	0,61 (0,53ч0,7)	0,60 (0,5ч0,6)	0,58 (0,5ч0,62)

Примечание: \* – статистически достоверные различия с контрольными показателями при  $p < 0,05$

Задержке ossификации скелета свидетельствует об общей задержке развития потомства. Если исходить из предпосылки, что под влиянием сочетанного действия КонА и циклофосфана происходит нарушение толерантности иммунной системы матери по отношению к плоду, то задержка развития потомства является логичным ответом на это воздействие.

Таблица 2. Размеры закладок окостенения костей в мм: теменной, нижнечелюстной, лопаточной, ключичной, плечевой, локтевой, лучевой, подвздошной, седалищной, лонной, бедренной, большой и малой берцовых у плодов на 20-й день беременности (ДБ) подопытных и интактных животных при введении Кон А и ЦФ в первую половину беременности (Ме (Q<sub>1</sub>; Q<sub>2</sub>))

Показатель	Интактные (n=6)	Кон А 3-й ДБ (n=10)	ЦФ 5-й ДБ (n=6)	Кон А 3-й ДБ + ЦФ 5-й ДБ (n=10)
Теменная	4,65(4,5;4,7)	4,65(4,5;4,8)	4,6(4,5;4,6)	4,3(4;4,7)
Нижнечелюстная	6,4(6,4;6,7)	6,5(6,3;6,7)	6,4(6,4;6,5)	6,2(5,7;6,4) *
Лопаточная	2,15(2,1;2,2)	2,2(2,1;2,3)	2,25(2,1;2,3)	2,0(1,8;2,2)
Ключичная	2,55(2,2;2,7)	2,65(2,5;2,8)	2,5(2,4;2,5)	2,45(2,2;2,55)
Плечевая	2,45(2,3ч2,5)	2,35(2,2ч2,5)	2,4(2,3ч2,4)	2,15(1,9ч2,3) *
Локтевая	2,35(2,3ч2,5)	2,3(2,2ч2,4)	2,3(2,3ч2,4)	2,2(2,0ч2,3) *
Лучевая	1,8(1,7ч1,9)	1,8(1,7ч1,8)	1,8(1,8ч1,8)	1,75(1,55ч1,85)
Подвздошная	1,55(1,5ч1,6)	1,4(1,4ч1,5)	1,4(1,4ч1,5)	1,3(1,2ч1,45) *
Седалищная	0,5(0,4ч0,6)	0,5(0,4ч0,55)	0,5(0,5ч0,6)	0,3(0,1ч0,5) *
Лонная	0(0ч0,1)	0,05(0ч0,2)	0(0ч0,2)	0(0ч0,175)
Бедренная	1,55(1,5ч1,8)	1,5(1,4ч1,6)	1,55(1,5ч1,6)	1,5(1,25ч1,6)
Большая берцовая,	1,9(1,7ч2,0)	1,85(1,7ч2,0)	1,9(1,9ч1,9)	1,75(1,55ч1,95)
Малая берцовая	1,65(1,5ч1,8)	1,7(1,6ч1,8)	1,65(1,6ч1,7)	1,5(1,3ч1,65)

Примечание: \* – статистически достоверные различия с контрольными показателями при  $p < 0,05$

## Заключение

Таким образом, угнетение Т-клеточного иммунитета у беременных крыс в первую половину беременности до имплантации путём сочетанного действия КонА и ЦФ приводит к нарушению формирования костного скелета у плодов крыс и увеличению постимплантационной гибели потомства. Нарушение формирования внутренних органов является признаком тератогенности данного воздействия. При этом раздельное введение препаратов КонА и ЦФ в используемых дозах к тератогенному эффекту не приводит.

## Литература (references)

1. Дыбан А.П., Баранов В.С., Акимова И.М. Основные методические подходы к тестированию активности химических веществ // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. –1970. – № 10. – С. 89-100. [Dyban A.P., Baranov V.S., Akimova I.M. *Arhiv anatomii, gistologii i embriologii*. Archive of Anatomy, Histology and Embryology. –1970. – N10. – P. 89-100. (in Russian)]
2. Йегер Л. Клиническая иммунология и аллергология. – М.: Медицина, 1990. – Т.3. – 586 с. [Jeger L. *Klinicheskaja immunologija i allergologija*. Clinical immunology and allergology. – Moscow: Medicine, 1990. – V.3. – 586 p. (In Russian)]
3. Кондратьева Т.К., Михеева Н.В., Фонталин Л.Н. Природа иммунодефицита, индуцированного инъекциями лектинов и циклофосфамида // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1988.– № 8. – С. 195-198. [Kondrat'eva T.K., Miheeva N.V., Fontalin L.N. *Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny*. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 1988. – N8. – P. 195-198. (in Russian)]
4. Леонтьева Т.И., Гладкова Н.Е., Утешев Б.С. Исследование иммуностропной активности циклофосфана // Фармакология и токсикология – 1988. – Т.51, №6. – С. 60-65. [Leont'eva T.I., Gladkova N.E., Uteshev B.S. *Farmakologija i toksikologija*. Pharmacology and Toxicology. – 1988. – V.51, N6. – P. 60-65. (in Russian)]
5. Лис Р.Е., Бандажевский Ю.И. Влияние бактериального липополисахарида продигиозана на антенатальный нейрогенез коры больших полушарий плодов белых крыс // Известия АН БССР. Серия биологических наук. – 1986. – №4. – С. 76-79. [Lis R.E., Bandazhevskij Ju.I. *Izvestija AN BSSR. Serija biologicheskijh nauk*. News of the Academy of Sciences of the BSSR. A series of biological sciences. 1986. – N4. – P. 76-79. (in Russian)]
6. Фонталин Л.Н., Кондратьева Т.К., Михеева Н.В. Т-клеточный иммунодефицит у мышей, получивших лектин и циклофосфамид // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1988.– №7. – С. 75-78. [Fontalin L.N., Kondrat'eva T.K., Miheeva N.V. *Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny*. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 1988. – N7. – P. 75-78. (in Russian)]
7. Robbins J., Bakardjiev A. Pathogens and the placental fortress // *Current Opinion in Microbiology*. –2012. – V.15, N1. – P. 36-43.
8. Soumiya H., Fukumitsu H., Furukawa S. Prenatal immune challenge compromises the normal course of neurogenesis during development of the mouse cerebral cortex // *Journal of Neuroscience Research*. – 2011. – V.89, N10. – P. 1575-1585.
9. Szekeres-Bartho J Immunological relationship between the mother and the fetus. *International // Reviews of Immunology*. – 2002. – V.21. – N6. – 471-495.
10. Tang A., Quenby S. Recent thoughts on management and prevention of recurrent early pregnancy loss // 2010. – V.22, N6. – P. 446-451.

## Информация об авторах

Лис Руслан Евгеньевич – кандидат биологических наук, доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии УО «Гродненский государственный медицинский университет» Минздрава Беларуси. E-mail: r.lis@mail.ru

Молько Татьяна Леонидовна – лаборант второй категории кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии УО «Гродненский государственный медицинский университет» Минздрава Беларуси. E-mail: aladyevatl@mail.ru