



УКРАЇНА

(19) UA (11) 62029 (13) U
(51) МПК
G09B 23/28 (2006.01)МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ МОДЕЛЮВАННЯ АКУШЕРСЬКОГО АНТИФОСФОЛІПІДНОГО СИНДРОМУ

1

2

(21) u201100372

(22) 12.01.2011

(24) 10.08.2011

(46) 10.08.2011, Бюл.№ 15, 2011 р.

(72) ПРОКОПЮК ВОЛОДИМИР ЮРІЙОВИЧ, ПРО-
КОПЮК ОЛЬГА СТЕПАНІВНА, ТРІФОНОВ ВІКТОР
ЮРІЙОВИЧ, ЗАЙЧЕНКО ГАННА ВОЛОДИМИРІВ-
НА, ФАЛЬКО ОКСАНА ВАЛЕРІЇВНА(73) ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІО-
МЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК
УКРАЇНИ(57) Спосіб моделювання акушерського антифос-
фоліпідного синдрому шляхом імунізації мишей
лінії BALB/c препаратом, що містить кардіоліпін,
який **відрізняється** тим, що імунізацію здійснюють
кардіоліпіновим антигеном, суспендованим в фізі-
ологічному розчині, який вводять внутрішньовенно
в дозі 30 мкг кардіоліпіну на одну тварину, 4 рази з
інтервалом 14 діб.

Корисна модель належить до експеримента-
льної медицини, переважно до патофізіології, екс-
периментальної імунології, і може бути використа-
на для розробки нових і удосконалення існуючих
методів лікування антифосфоліпідного синдрому
(АФС).

Відомий спосіб моделювання акушерського
АФС під час вагітності у мишей лінії MRL/lpr та
NZB, що заснований на спонтанному розвитку сис-
темного червоного вовчка з виробленням антифо-
сфоліпідних антитіл (аФА) з клінічними проявами,
характерними для АФС (резорбція плодів, плацен-
тарна недостатність і затримка внутрішньоутроб-
ного розвитку плоду)

Недоліком цього способу є те, що моделюєть-
ся вторинний АФС, який зустрічається у невеликої
кількості пацієнток, коли існують інші механізми
ураження плоду при червоному вовчаку, ніж при
АФС. Крім цього є технічні складнощі при розве-
денні мишей з вовчаком.

Відомий спосіб моделювання акушерського
антифосфоліпідного синдрому під час вагітності,
згідно з яким, мишам лінії BALB/c вводять моно-
клональні або поліклональні антифосфоліпідні
антитіла (аФА) [2].

Недоліками способу є, по перше, те, що меха-
нізм виникнення АФС відрізняється від механізму
розвитку АФС у пацієнток, у яких проходить імуні-
зація фосфоліпідами, а не антитілами, які призво-
дять до виникнення анти-антитіл. По друге, при
застосуванні способу проходить спочатку пасивна
імунізація, яка не характерна для пацієнток, а по-
тім вже активна імунізація. Крім того спосіб потре-
бує складних гібридних технологій.

Відомий спосіб моделювання акушерського
АФС з застосуванням інактивованих бактеріальних
антигенів, взятих від жінок, хворих на АФС [3].

Недоліками цього способу є те, що в ньому ві-
дтворено інфекційний механізм розвитку АФС,
коли з фосфоліпідними антигенами тварина отри-
мує інші антигенні детермінанти клітинних стінок
бактерій, та імунізується до багатьох інших моле-
кул, не пов'язаних з АФС.

Найбільш близьким до способу, що заявляєть-
ся, є спосіб моделювання акушерського АФС, в
якому мишей лінії BALB/c імунізують кардіоліпіном
емульгованим в 75 мкл повного ад'юванту Фрейн-
да, який вводять в дозі 25 мкг, чотирикратно з ін-
тервалом в 2 тижні [4].

Недоліком способу є те, що він не дозволяє
створити модель акушерського АФС, близьку до
клінічного перебігу захворювання.

Це обумовлено тим, що застосування ад'юва-
нту Фрейнда для підвищення імуногенності, який
привносить до організму лабораторних тварин
сторонні речовини (масла та елементи клітинних
стінок бактерій), призводить до з'явлення осередку
асептичного запалення та загальної неспецифіч-
ної сенсibiliзації тварин, що є нехарактерним для
клінічного перебігу АФС. Крім цього не завжди мо-
жливе виникнення патологій, характерних для
АФС в другій половині вагітності (внутрішньоутро-
бна загибель плоду, передчасні пологи, гіпотрофія
плоду).

В основу корисної моделі поставлено задачу
створити такий спосіб моделювання акушерського
АФС, в якому би забезпечувалась можливість на-

(13) U
(11) 62029
(19) UA

близити експериментальну модель до клінічного перебігу захворювання.

Ця задача вирішується тим, що в способі моделювання акушерського АФС шляхом імунізації мишей лінії BALB/c препаратом, що містить кардіоліпін, згідно з корисною моделлю, імунізацію здійснюють кардіоліпіновим антигеном, суспендованим в фізіологічному розчині, який вводять внутрішньовенно в дозі 30 мкг кардіоліпіну на одну тварину, 4 рази з інтервалом 14 діб.

Кардіоліпіновий антиген містить кардіоліпін, лецитин та холестерол в співвідношенні 1:10:30. Відомий як препарат для лабораторної діагностики сифілісу (реакції Вассермана, або мікропреципітації).

Використання кардіоліпінового антигену дозволяє отримати модель акушерського АФС, наближену до клінічного перебігу захворювання, без загальної сенсibilізації, введення сторонніх речовин і з ураженнями, характерними для АФС як в першій половині вагітності (переривання вагітності - резорбції), так і в другій (передчасні пологи, внутрішньоутробна загибель плоду, гіпотрофія плоду, плацентарна недостатність).

Спосіб пояснюється наступним прикладом.

Приклад. В експерименті застосовували 40 мишей лінії BALB/c, яких розділяли на 2 групи: I група (20 тварин) - основна, II група (20 тварин) - контрольна, інтактні миші.

Мишам I групи здійснювали імунізацію кардіоліпіновим антигеном, суспендованим в 0,1 мл фізіологічного розчину, який вводили внутрішньовенно в дозі 30 мкг кардіоліпіну на одну тварину, 4 рази з інтервалом 14 діб.

Через 14 і 30 діб після останньої ін'єкції кардіоліпінового антигену проводили дослідження імунологічних показників (реакція мікропреципітації (РМП), реакція бласттрансформації лімфоцитів (РБТЛ), рівень комплементу), показників коагулограм (кількість тромбоцитів, згортання крові за

Моровіцем) та гістологічне дослідження ендометрію.

Було визначено, що миші I групи мали позитивну РМП з кардіоліпіновим антигеном одразу після формування моделі та через 30 діб.

Показник РБТЛ був вірогідно підвищений в I групі, тоді як рівень комплементу знижувався (Табл. 1), що свідчить про розвиток АФС.

При дослідженні показників коагулограм спостерігали прискорення згортання крові та тромбоцитопенію (Табл. 2), що демонструє характерну для АФС коагулопатію.

При гістологічному дослідженні ендометрію у тварин з АФС спостерігали атрофічні явища, мікротромбози, деяку десквамацію ендометрію, чого не було у здорових тварин.

При подальшому дослідженні інтактних самок та з моделлю АФС спарювали з самцями. Виводили з експерименту на 20 добу вагітності, підраховували кількість плодів, резорбцій, мертвих плодів, вагу плодів, плаценти (Табл. 3). Виділяли 2 групи: I - з АФС, II - контрольну.

Завагітніло 8 самок з кожної групи, однак кількість плодів у мишей з АФС була вірогідно нижча. Зустрічалися тварини з резорбцією плодів і з мертвими плодами. Середня вага плодів зменшувалася, середня вага плацент не змінювалася (Табл. 3). У однієї миші відбулися передчасні пологи на 18 добу вагітності.

При гістологічному дослідженні плацент відмічали мікротромбози в плаценті, збільшення кількості фібриніду, атрофічні явища, які є ознаками АФС та плацентарної недостатності.

Таким чином продемонстровано, що заявлений спосіб дозволяє отримати модель акушерського АФС, наближену до клінічного перебігу захворювання, з характерними змінами в імунній системі та системі коагуляції, без загальної сенсibilізації, введення сторонніх речовин і з ураженнями, характерними для акушерського АФС як в першій, так і в другій половині вагітності.

Таблиця 1

Імунологічні показники в досліджуваних групах (M±m)

Група	РБТЛ, %		Комплімент, CH50	
	Через 14 діб	Через 30 діб	Через 14 діб	Через 30 діб
I (n=101)	22,0±1,6	16,8±2,1	47,1±2,3	48,6±3,2
II (n=10)	10,5±0,8*	10,4±0,5*	64,5±3,3*	62,8±1,43*

* - вірогідність різниці з I групою (p<0,05)

Таблиця 2

Показники коагулограми в досліджуваних групах (M±m)

Група	Згортання за Моровіцем, хв		Тромбоцити, x10 ³ /мл	
	Через 14 діб	Через 30 діб	Через 14 діб	Через 30 діб
I (n=10)	3,5±0,6	5,4±0,54	92,3±18,2	84,8±12,5
II (n=10)	8,9±2,0*	7,8±0,46*	234,3±17,5*	227,2±19,1*

* - вірогідність різниці з I групою (p<0,05)

Таблиця 3

Показники репродуктивної функції у експериментальних тварин (M±m)

	I n=8	II n=8
Кількість плодів	5,5±0,7*	8±0,9
Тварини з резорбцією, %	75	0
Тварини з мертвими плодами, %	20	0
Середня вага плоду	0,7±0,05*	1,08±0,05
Середня вага плаценти	0,17	0,2

* - відмінність від контролю (p<0,05)

Джерела інформації:

1. Gharavi A.E., Mellors R.C., Elkon K.B. IgG anti-cardiolipin antibodies in murine lupus // Clin Exp Immunol. - 1989. - №78. - P. 233-238.,

2. Radway-Bright E.L., Inane M, Isenberg D.A. Animal models of the antiphospholipid syndrome // Rheumatology. - 1999. - V. 38. - P. 591-601.

3. Пат. №6131 Україна, МКІ 7 А61 В17/00 Спосіб моделювання антифосфоліпідного синдрому.

4. Shanmugan V., Govindaraju A., Kumbalingam B. Placental Thrombosis in Experimental Anticardiolipin Antibodies-Mediated Intrauterine Fetal Death //American Journal of Reproductive Immunology. - 2007. - V. 57. - P. 270-276.