

УДК 616.153.96:618.4

С-РЕАКТИВНЫЙ БЕЛОК КРЫС И ИХ ПОТОМСТВА ДО И ПОСЛЕ РОДОВ

Овсянников В. Г., Абрамова М. В., Алексеев В. В., Лабушкина А. В., Алексеева Н. А.,
Бойченко А. Е., Алексеева Н. С.

ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия, e-mail: nataalexeeva@gmail.com

Исследование содержания с-реактивного белка имеет большое клиническое значение. Он исследован почти при всех патологических процессах и заболеваниях. На сегодняшний день физиологическая роль С-реактивного белка недостаточно изучена. Целью настоящего исследования явилось изучение содержания С-реактивного белка крыс и их потомства до и после нормальных родов и родов, которым предшествовало болевое воздействие. Боль при родах носит висцеральный и соматический характер. Острая боль моделировалась 3–4 степени интенсивности в соответствии с общепринятыми критериями. Содержание СРБ в крови определяли методом иммуноферментного анализа. Установлено, что беременность не сопровождалась увеличением содержания С-реактивного белка у крыс, которым производилась болевая стимуляция. У потомства крыс до и после рождения С-реактивный белок также не изменяется.

Ключевые слова: беременность, роды, боль, С-реактивный белок.

C-REACTIVE PROTEIN IN RATS AND THEIR PROGENY BEFORE AND AFTER LABOUR

Ovsyannikov V. G., Abramova M. V., Alekseev V. V., Labushkina A. V., Alekseeva N. A.,
Boychenko A. E., Alekseeva N. S.

Rostov state medical university, Rostov-on-Don, Russia, e-mail: nataalexeeva@gmail.com

Research of quantity of C-reactive protein has a great clinical importance. It studied for almost all diseases and pathological processes. Nowadays, the physiological role of C-reactive protein is studied not enough. The purpose of this study was to examine the content of C-reactive protein in rats and their progeny before and after normal labour and labour with painful stimulation. Pain in labour has visceral and somatic character. Acute pain was modelled with 3–4 level of intensity according to conventional criteria. C-reactive protein in the blood was determined by enzyme immunoassay. It was found that pregnancy was not associated with an increase in C-reactive protein in rats with painful stimulation. C-reactive protein in rat's progeny was not changed before and after labour.

Keywords: pregnancy, labour, pain, C-reactive protein.

С-реактивный белок (СРБ) занимает прочное место среди субстратов, имеющих большое клиническое значение. Он исследован практически при всех патологических процессах и заболеваниях, имеющих в своей основе тканевое повреждение. Но как справедливо замечают в своей обзорной статье Наумов А.В. с соавторами, физиологическая роль СРБ не выяснена до конца [6].

Имеются публикации, отражающие динамику СРБ и при физиологическом процессе – беременности.

Установлено, что у здоровых беременных женщин уровень СРБ в крови возрастает с 16-ой до 28-ой недели, потом снижается. Вторая волна повышения содержания СРБ отмечается непосредственно перед родами [9]. Есть и иная точка зрения, что беременность не влияет на содержание СРБ [5].

Немногочисленны сведения о реакции СРБ на раздражители неантигенной природы, не приводящие к повреждению тканей, в частности на болевое раздражение.

Самостоятельный интерес представляет феномен боли при родах. Является ли боль тяжким испытанием или имеет в своей основе позитивное содержание, в частности, активацию факторов врожденного иммунитета?

Цель исследования: изучение содержания СРБ крыс до и после нормальных родов, и родов, которым предшествовало аллогенное воздействие, а также у приплода, находящегося в утробе матери и после рождения, как в первой, так и во второй группе подопытных животных.

Материал и методы исследования

Боль при родах носит висцеральный и соматический характер [3]. Поэтому острую боль 3–4 степени интенсивности моделировали путем электрокожного раздражения рецепторной зоны корня хвоста крыс с одновременным раздражением прямой кишки через параллельно включенные электроды электрическим током, генерируемым электростимулятором ЭСУ-2 со следующими параметрами: частота тока – 100Гц; амплитуда тока – 30 В; длительность импульса – 500 мс; задержка импульса – 2 мс и время стимуляции – 2 минуты. Электростимуляцию проводили трижды с интервалом 3 часа на 21 день беременности.

На основании анализа поведенческих и вегетативных реакций подопытных животных оценивали интенсивность болевого раздражения в соответствии с общепринятыми критериями [1, 2, 7].

С целью получения сыворотки крови декапитировались интактные животные, интактные беременные животные накануне родов, и после болевой стимуляции накануне родов, а также на первые, третьи и пятые сутки после родов, а также особи приплода, находящиеся в чреве матери, новорожденные крысята на первые, третьи и пятые сутки после рождения от самок обеих подопытных групп. В связи с дефицитом крови у плодов крыс и новорожденных крысят, кровь собиралась в одну пробирку от всех особей одного помета.

Содержание СРБ в крови определяли методом иммуноферментного анализа, с помощью наборов фирмы BD Biosciences (USA). Растворы стандартов конъюгата промывочного буфера приготавливали по инструкции, прилагаемой к набору. Во все лунки рабочего планшета, покрытого моноклональными кроличьими антителами к СРБ крыс, вносили по 100 мкл стандартных растворов и предварительно разведенных образцов сыворотки крови крыс (1:4000). Планшет накрывали, инкубировали при комнатной температуре 30 минут. По окончании инкубации лунки планшета промывали пять раз промывочным буфером с помощью устройства MULTIWASH LABSYSTEMS (Finland).

После промывки во все лунки планшета вносили по 100 мкл конъюгата и инкубировали 30 минут при комнатной температуре. Далее во все лунки вносили по 100 мкл ТМБ субстратного раствора, инкубировали 10 минут в темноте при комнатной температуре, останавливали цветную реакцию добавлением в каждую лунку по 100 мкл раствора фосфорной кислоты. Измерение оптической плотности опытных проб 450 нм и обсчет результатов проводили на фотометре MULTISCAN MS LABSYSTEMS (Finland). В компьютерное обеспечение прибора вводили численное значение концентрации СРБ в стандартных растворах и после измерения и пересчета в соответствии разведением 1:4000 получили концентрацию исследуемого вещества в опытных пробах нг/мл.

Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакетов программ MS Office Excel 2010 Pro, STATISTICA 8.0. Числовые данные представлены в виде средних значений со стандартной ошибкой среднего ($M \pm m$). Для сравнения двух независимых выборок использовался критерий Манна – Уитни. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

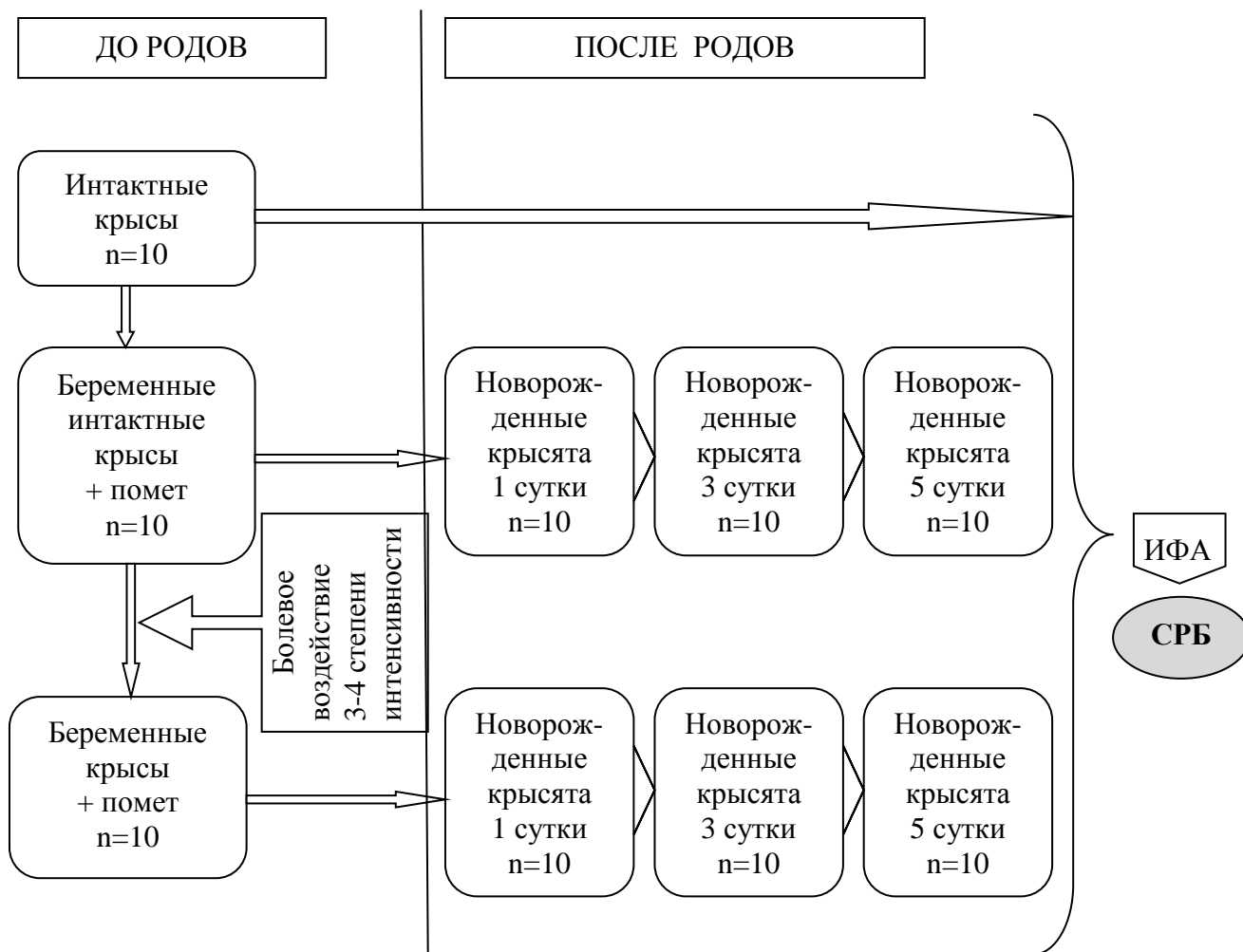


Рис. 1. Структура эксперимента

Результаты исследования и их обсуждение

Содержание С-реактивного белка у интактных крыс, не получавших болевую стимуляцию до родов и после них

Содержание С-реактивного белка в крови интактных не беременных крыс составляет $442,400 \pm 28,310$ нг/мл.

У беременных самок в крови накануне родов содержание С-реактивного белка составляет $433,800 \pm 20,631$ нг/мл.

Статистический анализ показал, что сам факт беременности у крыс не вызывает существенного изменения в содержании С-реактивного белка. По литературным данным у женщин к концу беременности содержание СРБ повышается [9]. Не исключено, что сохранение содержания СРБ стабильным является особенностью крыс.

Первые сутки после родов ознаменовались некоторым увеличением содержания СРБ у самок. Его уровень составил $529,200 \pm 23,316$ нг/мл ($0,05 < p < 0,1$). Такое различие не является существенным, тем не менее статистическая обработка материала позволяет говорить о тенденции повышения изученного субстрата.

На третьи сутки содержание СРБ составило $575,200 \pm 19,218$ нг/мл, имеется очевидное увеличение определяемого протеина ($p < 0,05$), которое является значимым.

На пятые сутки содержание СРБ составляет $402,400 \pm 16,233$ нг/мл. Это самое низкое значение из всех определенных, тем не менее расценивать его как снижение СРБ оснований нет, ($p > 0,05$) по отношению к контрольной группе. Статистический анализ показывает, что содержание СРБ возвращается к контрольным значениям.

Содержание С-реактивного белка у стимулированных крыс до родов и после них.

Как было описано выше, содержание С-реактивного белка у интактных не беременных крыс составляет $442,400 \pm 28,310$ нг/мл.

После болевой стимуляции накануне родов содержание С-реактивного белка в крови беременных крыс составляет $438,800 \pm 18,552$ нг/мл ($p > 0,05$).

Таким образом, накануне родов содержание СРБ как у стимулированных крыс, так и у не стимулированных остается неизменным.

На первые сутки после родов отмечается увеличение уровня СРБ до $556,200 \pm 20,727$ нг/мл. Прирост подтверждается статистически, он значим ($p < 0,05$).

На третьи сутки после родов присутствие С-реактивного белка в крови животных достигает $629,200 \pm 20,727$ нг/мл. Это увеличение по сравнению с контрольными значениями статистически значимо ($p < 0,05$).

На пятые сутки отмечается «обвальное» снижение исследуемого субстрата. Уровень СРБ составил $356,800 \pm 26,645$ нг/мл – это снижение очевидно по отношению к значениям зарегистрированных на первые и третьи сутки после родов. По отношению к значениям контрольной группы, это снижение следует расценивать лишь как тенденцию ($p < 0,05 < 0,1$). Таким образом, полученный фактический материал и сравнение его результатов между группой интактных беременных крыс и группой крыс, испытавших аллогенное воздействие накануне родов, свидетельствует о том, что сам факт беременности не сопровождается нарастанием содержания СРБ в периферической крови вне зависимости от того, получили ли беременные крысы болевую стимуляцию или нет.

После же родов, при сохранении вектора реакции в обеих группах сравнения, следует отметить, что у стимулированных крыс содержание С-реактивного белка нарастает на первые сутки, тогда как у интактных крыс намечается лишь тенденция этого увеличения.

На третьи сутки в обеих группах подопытных животных зарегистрирован очевидный прирост содержания СРБ. На пятые сутки у интактных крыс содержание СРБ не отличается от контрольных значений, а у стимулированных животных отмечается даже тенденция к падению уровня СРБ по сравнению с контрольными значениями.

Общее заключение сводится к двум позициям.

Первая беременность не сопровождается увеличением содержания СРБ.

Вторая, имеет место увеличение содержания СРБ после родов. У интактных животных это увеличение менее интенсивно и к пятым суткам возвращается к исходным значениям. У стимулированных крыс прирост наблюдается более стремительно, а к пятым суткам отмечено снижение содержания СРБ ниже конкретных значений.

Содержание С-реактивного белка у приплода, рожденного от крыс, не получавших болевую стимуляцию накануне родов

У приплода, находившегося в чреве матери, накануне родов содержание С-реактивного белка составило $29,60 \pm 7,66$ нг/мл.

Вопреки сведениям, опубликованным в литературе, это почти на порядок ниже, чем у взрослых животных. Принято считать, что печень как новорожденных, так и взрослых особей одинаково подготовлена к биосинтезу С-реактивного белка [8]. В наших экспериментах это не нашло подтверждения, во всяком случае для потомства крыс.

В первые сутки после рождения уровень СРБ выше, чем перед родами, и составляет $60,00 \pm 27,90$ нг/мл. Казалось бы, это очевидное увеличение показателя, но оно не находит своего статистического подтверждения. Различия незначимы ($p > 0,05$).

На третьи сутки после родов содержание СРБ в крови новорождённых несколько снижается. Оно равно $49,10 \pm 20,62$ нг/мл ($p > 0,05$). На пятые сутки цифровые значения

содержания СРБ выше контрольных и предыдущих. Они составляют $121,60 \pm 44,99$ нг/мл, но и в том и другом случае различие по сравнению с контрольными значениями не существенно ($p > 0,05$).

Таким образом, у приплода, рожденного интактными животными, статистически значимых колебаний в уровне СРБ как во внутриутробном состоянии, так и после родов не отмечено.

Содержание С-реактивного белка у приплода, рожденного от крыс, получивших накануне родов болевую стимуляцию

Содержание С-реактивного белка в крови приплода, находящегося в чреве матери до ее электроболевой стимуляции, составляет $29,60 \pm 7,66$ нг/мл. У приплода, матери которых непосредственно перед родами получили электроболевую стимуляцию, содержание С-реактивного белка в крови повысилось до $56,40 \pm 17,96$ мг/мл, однако, статистический анализ этот факт не подтверждает ($p > 0,05$).

В первые сутки после родов у крысят в крови содержится $56,00 \pm 15,06$ мг/мл исследуемого субстрата, что также не является его увеличением по сравнению с контрольными значениями ($p > 0,05$).

На третьи сутки содержание СРБ составляет $59,60 \pm 26,39$ мг/мл, т.е. в течение трех суток после родов значения содержания СРБ достаточно монотонны.

На пятые сутки содержание СРБ у новорожденных крысят составило $145,800 \pm 47,691$ мг/мл, что втрое выше, чем в контрольной группе. Считать это реакцией прироста нельзя, так как различие не является статистически значимым ($p > 0,05$).

Результаты исследования содержания СРБ у пятисуточных крысят выявило крайнюю неоднородность показателей, различие достигало двух порядков, что и повлияло на результат статистического анализа.

Таким образом, ни болевое сопровождение родов, ни нормальные роды не повлияли на содержание С-реактивного белка у приплода, его следует считать стабильным. Обращает на себя внимание тот факт, что на пятые сутки отмечается мозаичность показателей, что делает ряд наблюдений неоднородным и не позволяющим сделать сколько-нибудь определенного заключения.

В процессе беременности, судя по научной литературе, уровень ИЛ-6 – индуктора выработки СРБ, остается неизменным, с этим очевидно связан монотонный уровень содержания СРБ до родов и сразу после них.

Следует упомянуть относительно недавно появившееся сообщение о том, что у женщин со сроком беременности 37 и более недель повышается уровень ИЛ-6 в сыворотке

крови [4]. По логике это должно приводить к нарастанию уровня СРБ, ни тот, ни другой показатель в нашей версии эксперимента статистически значимо не изменялся.

Выводы:

1. Изменение содержания СРБ у интактных самок и получивших накануне родов электроболевую стимуляцию существенных отличий не имеет.

2. У приплода до родов и после рождения содержание СРБ не меняется вне зависимости от того, получали или не получали их матери накануне родов электроболевую стимуляцию.

Список литературы

1. Вальдман А.В. Центральные механизмы боли / А.В. Вальдман, Ю.Д. Игнатов. – Л.: Наука, 1976. – 191 с.
2. Васильев Ю.Н. Анальгетические эффекты акупунктуры у крыс в свободном поведении и его изменение под влиянием морфина и налоксона/ Ю.Н. Васильев, Ю.Д. Игнатов, А.Г. Кочан и др. // Российский журнал боли. – 2010. – № 1. – С.11-14.
3. Зильбер А.П., Шифман Е.М. Акушерство глазами анестезиолога. – П.: ПГУ, 1997. – 397 с.
4. Клигуненко Е.Н. Соотношение про- и противовоспалительных цитокинов у беременных в третьем триместре / Е.Н. Клигуненко, А.О. Волков // Медицина неотложных состояний. – 2013. – № 6 (53). – С.162-164.
5. Лабораторные анализы. Сыворотка и плазма крови: краткий справочник. – Ростов-н/Д., 2012. – 113 с.
6. Наумов А.В. С-реактивный белок / А.В. Наумов, Л.Т. Арцименя, Е.Ю. Биндич, Н.В. Наумова // Журнал ГрГМУ. – 2010. – № 4. – С. 3-11.
7. Овсянников В.Г. Очерки патофизиологии боли. – Ростов н/Д.: Цветная печать, 2003. – 159 с.
8. Alt R., Willard D., Messer J. Marker proteins in inflammation. – 1982. – P.421-422.
9. Teran E., C-reactive protein during normal pregnancy and preeclampsia / E. Teran, C. Escudero, A. Calle // International Journal of gynecology and obstetrics, 2005. – Vol.89. – P.299-300.

Рецензенты:

Рымашевский А.Н., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой акушерства и гинекологии №1 ГБОУ ВПО РостГМУ Минздрава России, г. Ростов на Дону;

Харсеева Г.Г., д.м.н., профессор, заведующая кафедрой микробиологии и вирусологии №2
ГБОУ ВПО РостГМУ Минздрава России, г. Ростов на Дону.