

ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ АКАДЕМИИ НАУК СССР

На правах рукописи

Семченкова Светлана Александровна

УДК 576.312.31:612.014.1:618.39-021.3

**ЦИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ХРОМАТИНА  
ЛИМФОЦИТОВ ПРИ НЕВЫНАШИВАНИИ БЕРЕМЕННОСТИ**

03.00.17 — Цитология

**А в т о р е ф е р а т**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Ленинград 1987

Работа выполнена в лаборатории цитологии Научно-исследовательского института акушерства и гинекологии Министерства здравоохранения Казахской ССР.

Научные руководители:

доктор биологических наук профессор Ю.Б. Вахтин,  
кандидат биологических наук В.С. Толмачев.

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук Г.Д. Головачев,  
кандидат технических наук Ю.М. Розанов.

Ведущее учреждение - Институт медицинской генетики,  
лаборатория молекулярной биологии.

Защита диссертации состоится "17" апреля 1987 г. в 13 час.  
на заседании специализированного совета Д.002.73.01 при Институте цитологии АН СССР по адресу: 194064, Ленинград, Тихорецкий пр., д. 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии АН СССР.

Автореферат разослан "9" марта 1987 г.

Ученый секретарь  
специализированного совета  
канд. биол. наук

Л.Н. Писарева

Институт цитологии АН СССР

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В последние годы проблема изучения интерфазного ядра при разном функциональном и пролиферативном статусе клеток привлекает все большее внимание исследователей. Лимфоциты периферической крови играют важную роль в поддержании иммунологического статуса организма и активно реагируют на изменения его внутренней среды. Нормальное протекание беременности сопряжено с изменениями иммунологической и гормональной ситуаций в организме, в которые прямо или косвенно вовлечены лимфоциты (Ильин, 1978; Головистиков и др., 1983; Garazek et al., 1977; Garewal et al., 1978; Roda et al., 1983). Сказанное справедливо и для осложненного течения беременности, в том числе для ее невынашивания (Булиенко и др., 1979; Фогел и др., 1980; Захарова и Василенко, 1984; Джанибекова и др., 1986; Derick et al., 1981; Stites et al., 1983; Gerhard, 1983).

В настоящее время разработан комплекс цитохимических методов, с помощью которых можно охарактеризовать различные свойства хроматина клеток (Зеленин, 1977, 1982; Vaserga, Nicolini, 1976). Применение подобных методов может дать важные сведения о функциональных перестройках хроматина лимфоцитов при невынашивании беременности и тем самым внести вклад в биологический аспект решения этой проблемы, которая, по данным последних лет, приобретает все большую значимость (Игнатьева, 1973; Maroni, 1984). Это обуславливает актуальность цитохимического изучения структурно-функциональных особенностей генетического аппарата лимфоцитов при невынашивании беременности.

Цель и задачи исследования. Цель настоящей работы заключалась в сравнительном изучении свойств хроматина лимфоцитов периферической крови женщин при нормальном и угрожающем течении беременности, а также женщин вне беременности с привычным невынашиванием в анамнезе, и в разработке новых диагностических цитохимических методов.

В связи с этим были поставлены следующие задачи:

I. Определить доступность ДНК хроматина для связывания реактива типа Шиффа риванола- $S O_2$  в реакции Фельгена при

разных режимах кислотного гидролиза и после воздействия депротенизирующими солевыми растворами у женщин с нормальным и осложненным угрозой прерывания течением беременности;

2. Исследовать изменение связывания красителей ДНК, РНК и гистонами в малых лимфоцитах в условиях стимуляции фитогем-агглютинином (ФГА) у беременных и небеременных женщин с нормальной детородной функцией и при невынашивании беременности;

3. Провести сравнительное исследование изменения цитохимических характеристик хроматина в зависимости от срока беременности, этиологии невынашивания и этапа лечения и на этой основе рекомендовать цитохимические тесты для акушерской диагностики.

Научная новизна и практическая ценность работы. Впервые дана сравнительная характеристика свойств хроматина лимфоцитов периферической крови *in situ* и *in vitro* у женщин при нормальном течении беременности и угрозе ее прерывания. Показано *in situ*, что связывание риванола- $\text{B}$   $\text{O}_2$  с ДНК хроматина лимфоцитов здоровых беременных женщин после 1,5-минутного кислотного гидролиза в реакции Фельгена на протяжении всей беременности снижено по сравнению с таковым небеременных женщин с нормальной детородной функцией и женщин с угрозой прерывания беременности. Впервые показано, что воздействие 2 М раствором хлористого натрия (+4 $^{\circ}\text{C}$ , 4 ч) сопровождается большим повышением чувствительности ДНК хроматина к кислотному гидролизу в малых лимфоцитах женщин при физиологической беременности, чем при угрозе ее прерывания. При этом различие в связывании акридинового оранжевого (АО) между этими группами нивелируется.

Впервые обнаружены при угрозе прерывания беременности характерные изменения состояния хроматина малых лимфоцитов *in vitro*: спонтанное увеличение связывания красителей с ДНК в отсутствие ФГА и уменьшение связывания с ДНК, РНК и гистонами при воздействии ФГА.

Полученные данные о связи структурно-функциональных особенностей хроматина лимфоцитов при угрозе прерывания беременности с показателями акушерского статуса важны для совершенствования диагностических методов. Результаты работы были использованы для разработки "Способа диагностики беременности" (ав-

торское свидетельство № 945724) и рационализаторского предложения "Способ диагностики угрозы прерывания беременности".

Внедрение. Разработанное изобретение "Способ диагностики беременности" (авторское свидетельство № 945724) и рационализаторское предложение "Способ диагностики угрозы прерывания беременности" внедрены в клиническую работу НИИ акушерства и гинекологии и консультации "Брак и семья" г.Алма-Аты. Результаты исследования включены в материалы лекций и семинарских занятий со студентами в Целиноградском медицинском институте. Материалы диссертационной работы экспонировались на выставках: НТТМ-80 (ВДНХ СССР), выставке, посвященной 60-летию Казахской ССР (ВДНХ КазССР, 1981), на Всемирной выставке достижений молодых изобретателей "Болгария-85" в г.Пловдиве.

Апробация работы и публикации. Результаты работы были доложены на II Всесоюзном съезде врачей-лаборантов (Ворошиловград, 1979), на пленуме правления Всесоюзного общества акушеров-гинекологов (Махачкала, 1980), на III объединенном съезде гигиенистов, эпидемиологов, микробиологов и инфекционистов Казахстана (Алма-Ата, 1980), на заседаниях в институте медицинской генетики АМН СССР (1981, 1985), на конференции молодых ученых г.Алма-Аты (Алма-Ата, 1982).

По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 165 страницах машинописного текста, состоящего из введения, обзора литературы, разделов: материалы и методы исследования, результаты собственных исследований и их обсуждение, заключения и выводов. Работа содержит 11 рисунков, 19 таблиц. Список цитированной литературы включает 386 источников, из них 267 на иностранных языках.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Культивирование лимфоцитов периферической крови женщин после двукратного отмывания в среде I99 проводили по прописи Самойлиной (1970). Инкубационной средой служила среда I99 с добавлением аутологичной плазмы (20%). Концентрация лейкоцитов составляла  $1 \times 10^6$  клеток в 1 мл среды. ФГА-Р фирмы "Reanal" добавляли в концентрации 70 мкг/мл, подобранной опытным путем по выходу показателей бласттрансформированных лимфоцитов на

плато после 72 ч культивирования.

Для проведения флуориметрического варианта реакции Фельгена лейкоциты фиксировали этанол-ледяной уксусной кислотой (3:1) в течение 1 ч и подвергали гидролизу в 1 н. HCl при 60°C.

Доступность ДНК для связывания с флуорохромом акридиновым оранжевым определялась по методу Риглера (Rigler, 1966) в модификации Колесникова (Колесников и др., 1973). Фиксация препаратов - в смеси этанола и ацетона (1:1).

Способность РНК связывать риванол- $SO_2$  определяли по методу Хачатурова (1968), способность гистонов связывать примулин O- по методу Сухаревой-Немаковой и Хачатурова (1969).

Флуоресценция связанных красителей измерялась на зондовом цитофлуориметре (Толмачев и Нисанов, 1978) при  $\lambda = 530$  нм.

Депротеинизация ДНК-структур проводилась с применением растворов 0,3 М; 0,45 М; 0,6 М; 2 М n aCl или 2 М NaCl с 5 М мочевиной (Myles et al., 1978; Kushch et al., 1980; Adolph et al., 1980). Белки экстрагировали при +4°C, экспозиция в одном растворе 4 ч. Поэтапная экстракция включала проведение препаратов через все растворы возрастающей концентрации NaCl (по 2 ч). В последнем растворе время воздействия NaCl доводилось в общей сложности до 24 ч.

Препараты лимфоцитов при всех исследованиях окрашивали и анализировали сериями, в которые одновременно был включен материал в следующих вариантах: 1) от небеременных доноров, женщин при физиологической беременности и угрозе ее прерывания в тот же триместр беременности; 2) от небеременных доноров и небеременных женщин с привычным невынашиванием в анамнезе.

Сопоставление цитохимических показателей и данных анамнеза женщин при угрозе прерывания беременности проводилось на ЭВМ. Все результаты обрабатывались статистически с применением критерия Фишера-Стьюдента (Урбах, 1975).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Чувствительность ДНК хроматина лимфоцитов к кислотному гидролизу в реакции Фельгена. Интенсивность флуоресценции риванола- $SO_2$ , связанного с ДНК, у доноров (10), у женщин с

нормальным течением беременности (IО) и угрозой ее прерывания (IО) зависела от времени гидролиза. Кривые гидролиза имели максимальный подъем после 8-10 мин и были совместимы после 20 мин. Достоверное различие между группой с нормальным и осложненным течением беременности наблюдалось при 1,5 мин гидролизе и было наиболее резко выражено в малых лимфоцитах:  $110.1 \pm 2.6$  и  $123.7 \pm 4.2$ , соответственно. Поэтому дальнейшее сопоставление проводилось при 1,5 мин гидролиза на малых лимфоцитах.

Связывание риванола-  $SO_2$  с ДНК малых лимфоцитов при 1,5 мин гидролизе изучено у 392 женщин (8I донор, 70 здоровых беременных женщин, 127 - с клиническими признаками угрозы прерывания беременности, 114 - после проведения сохраняющей терапии). У здоровых беременных женщин связывание риванола-  $SO_2$  во все сроки беременности было ниже, чем у небеременных доноров (рис. I). У женщин с угрозой прерывания во все сроки беременности связывание флуорохрома было больше, чем у здоровых беременных, и его значение достигало уровня показаний доноров. Была изучена чувствительность ДНК хроматина к кислотному гидролизу у женщин с различной этиологией невынашивания в сроке до 28 недель беременности при явлениях угрозы выкидыша и после лечения. Угроза прерывания беременности была вызвана инфекционными заболеваниями матери у 4I женщины, травматическими повреждениями матки - у 36, нейроэндокринными нарушениями - у 26, невыясненной причиной - у 24 женщин. У женщин с невыясненной причиной угрозы выкидыша и при нейрогормональных нарушениях интенсивность флуоресценции риванола-  $SO_2$ , связанного с ДНК, превышала не только показания в контрольной группе (с физиологической беременностью), но и данные, полученные при изучении других вышеуказанных причинных факторов. Проведение сохраняющей терапии сопровождалось снижением чувствительности хроматина к кратковременному гидролизу до показаний, определенных при нормальном течении беременности.

Описанные выше достоверные различия средних показателей связывания риванола-  $SO_2$  ядрами малых лимфоцитов исследованных групп наблюдались на фоне широкой изменчивости индивидуальных показателей в пределах каждой группы. Например, связывание риванола-  $SO_2$  у 8I доноров колебалось от 119.5 до

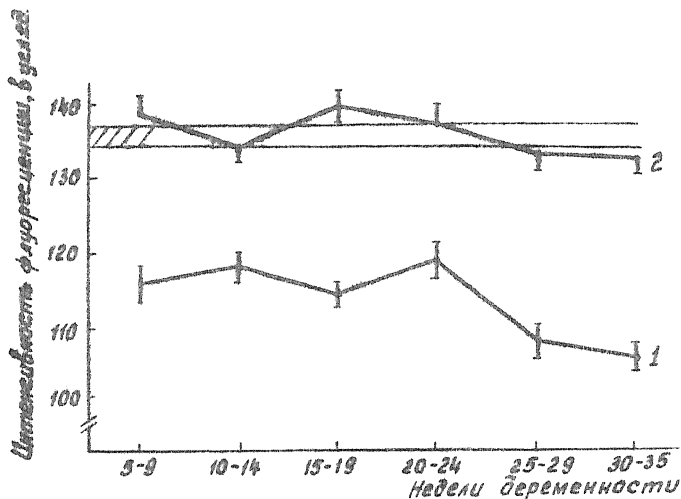


Рис. 1. Интенсивность флуоресценции риванола- $SO_2$ , связанного с ДНК, в малых лимфоцитах после 1.5-минутного кислотного гидролиза.

- ▨ - величина среднего значения с доверительными интервалами у доноров;
- I - при физиологической беременности;
- II - при угрозе прерывания беременности.

147.2 усл. ед. ( $M = 136.1 \pm 0.6$ ), а у 18 женщин с 5-9 неделями физиологической беременности - от 100.6 до 128.9 ( $M = 114.8 \pm 1.8$ ). Поэтому показатель связывания риванола- $SO_2$  ядрами малых лимфоцитов сам по себе недостаточно информативен для постановки диагноза "физиологическая беременность" или "угроза прерывания беременности". Информативность показателя повышается, если проводить попарное сравнение препаратов лимфоцитов сравниваемых групп, фиксация и окраска которых проводилась одновременно и в одних и тех же реактивах. При попарном сопоставлении донор-здоровая беременная женщина оказалось,



что в большинстве случаев лимфоциты беременных женщин давали более низкие показатели флуоресценции сорбированного риванола- $\text{SO}_2$ , чем лимфоциты небеременных доноров. Клиническая апробация показала, что указанный тест позволяет в 83% случаев точно диагностировать наличие или отсутствие беременности у пациенток.

Таким образом, с развитием физиологической беременности наблюдалось уменьшение чувствительности хроматина к кратковременному кислотному гидролизу, выявленной с помощью окраски риванолом- $\text{SO}_2$ , в то время как при угрозе прерывания-возрастание чувствительности до показаний, характерных для доноров. Наибольшие различия по изученному показателю между нормальным и осложненным течением беременности наблюдались в малых лимфоцитах, особенно при угрозе прерывания беременности нейроэндокринной этиологии.

Влияние солевой депротеинизации на чувствительность ДНК хроматина малых лимфоцитов к кислотному гидролизу в реакции Фельгена и на связывание акридинового оранжевого. После частичной солевой депротеинизации связывание ДНК с риванолом- $\text{SO}_2$  и акридиновым оранжевым у женщин с физиологической беременностью и у женщин с угрозой ее прерывания возрастало в разной степени (рис.2). Холодная (+ 4°C) солевая обработка растворами  $\text{NaCl}$  в концентрациях 0,4 М и 0,6 М в течение 4 ч не снимала различий в чувствительности хроматина к кислотному гидролизу при физиологической беременности ( $n = 6$ ) и угрозе ее прерывания ( $n = 6$ ). Воздействие 2 М  $\text{NaCl}$  (4 ч) повышало величину интенсивности флуоресценции риванола- $\text{SO}_2$ , связанного с ДНК лимфоцитов здоровых беременных женщин, относительно показаний лимфоцитов женщин с угрозой прерывания беременности ( $p < 0,01$ ). Поэтапная (24 ч) обработка солевыми растворами  $\text{NaCl}$  (0,3; 0,45; 0,6; 2 М), а также в сочетании с 5 М мочевиной, сближала показания в кислоточувствительности хроматина у женщин при физиологической и осложненной угрозой прерывания беременности. У этих же больных ДНК малых лимфоцитов связывала акридиновый оранжевый меньше, чем ДНК лимфоцитов женщин с нормальным течением беременности. (рис.2,Б). Это различие исчезало после обработки препаратов 2 М  $\text{NaCl}$  или в сочетании с 5 М мочевиной (4 ч).

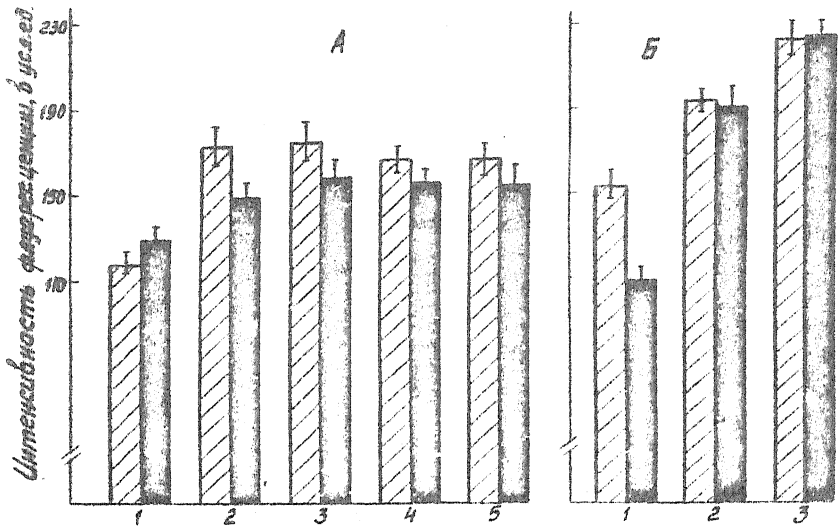


Рис. 2. Влияние солевых растворов на изменение интенсивности флуоресценции риванола-502 (А) и акридинового оранжевого (Б), связанных с ДНК ядер малых лимфоцитов.

- ▨ - физиологическая беременность;
- - угроза прерывания беременности;
- I - до экстракции;
- 2 - 2М NaCl;
- 3 - 2М NaCl с 5М мочевиной;
- 4 - 0.3М, 0.45М, 0.6М, 2М NaCl;
- 5 - 0.3М, 0.45М, 0.6М, 2М NaCl с 5М мочевиной.

Таким образом, частичная солевая депротеинизация по-разному влияет на хроматин ядер малых лимфоцитов женщин с физиологической беременностью и женщин с угрозой прерывания беременности. Подобная обработка приводила к большему связыванию риванола-502 у женщин с физиологической беременностью, чем у женщин с угрозой прерывания беременности, и к исчезновению

различий по связыванию акридинового оранжевого.

Сравнительная цитохимическая характеристика лимфоцитов женщины при физиологической беременности и ее невынашивании при культивировании их в присутствии аутологической сыворотки.

В связи с диагностической направленностью данных исследований, требующей неоднократного анализа, изучение состояния хроматина *in vitro* проводилось в малых лимфоцитах, отмытых средой I99 и культивированных в присутствии аутологичной сыворотки крови. Воздействие митогенами, в том числе ФГА, дает возможность изучать свойства хроматина в условиях его активации (обзор Елифанова и др., 1983; Rigler, Killander, 1969; Polet, Spieker-Polet, 1980). В связи с вышеизложенным проведены исследования лимфоцитов в условиях стимуляции их ФГА по способности ДНК, РНК и гистонов связывать красители.

Интенсивность флуоресценции риванола- $SO_2$ , связанного с ДНК после 8 мин гидролиза, была изучена в культурах лимфоцитов 148 женщин (18 доноров, 58 здоровых беременных женщин, 48 женщин с угрозой прерывания беременности, 24 небеременные с привычным невынашиванием в анамнезе).

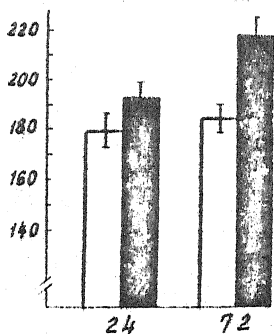


Рис. 3. Интенсивность флуоресценции риванола- $SO_2$ , связанного с ДНК в лимфоцитах доноров при оптимальном времени гидролиза.

□ - без воздействия ФГА;

■ - при воздействии ФГА.

По оси абсцисс - время культивирования, ч,

по оси ординат - интенсивность флуоресценции, усл. ед.

У доноров интенсивность флуоресценции риванола- $SO_2$  не изменялась в нестимулированных лимфоцитах в процессе культивирования (рис.3). При воздействии ФГА связывание риванола- $SO_2$  с ДНК было больше уже через 24 ч после начала культивирования и еще более возрастало к 72 ч.

В нестимулированных лимфоцитах женщин во все сроки фи-

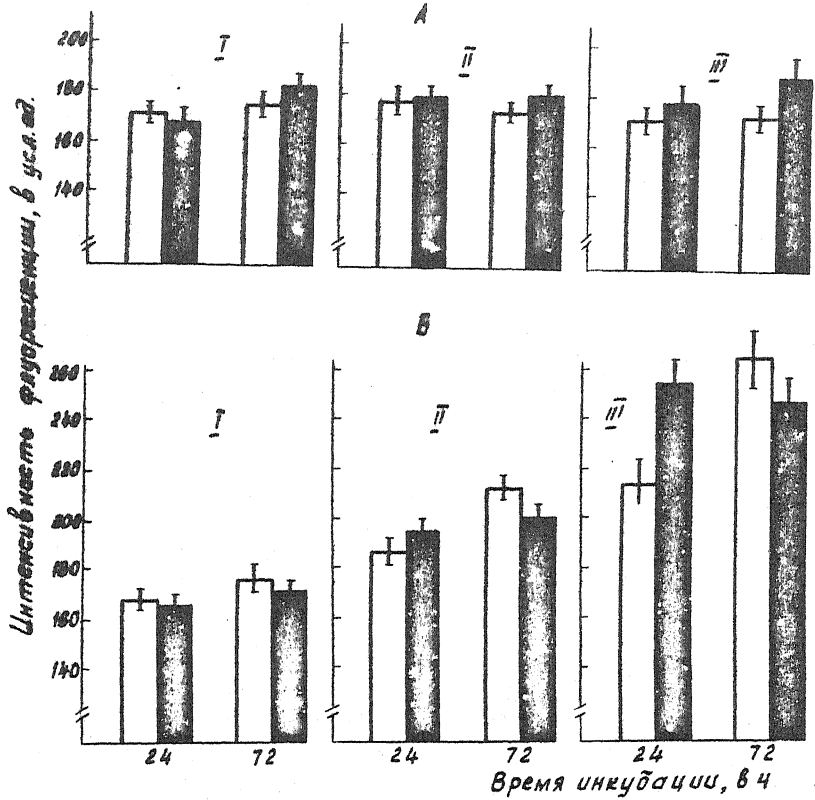


Рис. 4. Интенсивность флуоресценции риванола-SD<sub>2</sub>, связанного с ДНК в лимфоцитах женщин с нормальным течением беременности (А) и угрозой её прерывания (Б) при оптимальном времени гидролиза.

I, II, III - триместры беременности;

□ - без воздействия ФГА;

■ - при воздействии ФГА.

физиологической беременности изученный показатель не изменялся в процессе культивирования (рис. 4, А). Под воздействием ФГА стимулированные лимфоциты по связыванию риванола-SD<sub>2</sub> после 24 ч культивирования не отличались от нестимулированных.

Через 72 ч интенсивность флуоресценции ядер была достоверно выше, чем у нестимулированных лимфоцитов, однако это различие было менее выражено, чем у небеременных доноров.

Стимулированные и нестимулированные лимфоциты женщин с угрозой прерывания беременности в ранние сроки (I триместр) не различались по интенсивности флуоресценции ни через 24 ч, ни через 72 ч после начала культивирования (рис. 4, Б). Во II триместре беременности 24-часовое воздействие ФГА не изменяло способность ДНК лимфоцитов связывать риванол- $S O_2$ , в более поздние сроки (III триместр) - сопровождалось увеличением изученного показателя в стимулированных лимфоцитах по сравнению с нестимулированными. Во II и III триместрах беременности при 72-часовом воздействии ФГА интенсивность флуоресценции ядер лимфоцитов, окрашенных риванолом- $SO_2$ , становится ниже, чем у нестимулированных лимфоцитов. В стимулированных и нестимулированных лимфоцитах связывание риванола- $S O_2$  с ДНК к концу осложненной беременности было выше, чем таковое в лимфоцитах при нормальном ее течении.

У небеременных женщин с привычными выкидышами в анамнезе при 24-часовом культивировании интенсивность флуоресценции стимулированных лимфоцитов была больше, чем нестимулированных. Однако через 72 ч различия между стимулированными и нестимулированными лимфоцитами не выявлялись. Такая особенность отличала их от лимфоцитов доноров.

Интенсивность флуоресценции примулина O, связанного с гистонами. В группе небеременных доноров (табл. I) только 24-часовая стимуляция ФГА увеличивала в лимфоцитах связывание примулина O с гистонами ( $P < 0,001$ ). В ответ на воздействие ФГА интенсивность флуоресценции не изменялась у здоровых беременных женщин и у небеременных женщин, имевших выкидыши в анамнезе, в то время как при угрозе прерывания беременности она была меньше, чем вне стимуляции (72 ч). Кроме того, в нестимулированных лимфоцитах интенсивность флуоресценции красителя, связанного с гистонами, превышала показания при физиологической беременности.

Интенсивность флуоресценции риванола- $S O_2$ , связанного с РНК. В лимфоцитах в ранние сроки физиологической беременности интенсивность флуоресценции риванола- $S O_2$ , связанного

Таблица 1

Интенсивность флуоресценции при мулине С, связанного с гистонами в малых лимфоцитах *in vitro*, усл. ед.

Группа	Кол-во	Инкубация без ФГА		Инкубация с ФГА	
		24 часа	72 часа	24 часа	72 часа
Доноры	24	73,5 ± 2,2	78,4 ± 2,8	89,4 ± 3,7	82,9 ± 2,4
С нормальным течением беременности	22	72,5 ± 1,6	70,7 ± 2,0	73,3 ± 5,3	74,4 ± 2,0
С угрозой прерывания беременности	24	86,0 ± 2,3	81,1 ± 2,1	81,0 ± 2,2	72,8 ± 1,8
Вне беременности с привычным невынашиванием в анамнезе	10	77,8 ± 1,8	60,5 ± 2,1	75,8 ± 3,3	64,5 ± 2,1

с РНК, была достоверно меньше по сравнению с таковой в культуре лимфоцитов доноров (табл. 2). В последующих триместрах (II, III) интенсивность флуоресценции была выше и достигала значения доноров. У стимулированных лимфоцитов здоровых беременных женщин к 72 ч культивирования достоверно увеличивалось связывание риванола- S O<sub>2</sub>.

При угрозе прерывания беременности изученный показатель после 72 ч стимуляции не изменялся в I триместре и уменьшался в более поздние сроки. Интенсивность флуоресценции в культивированных лимфоцитах во все сроки осложненной беременности была ниже, чем у доноров, а во II и III триместрах - ниже значений, отмеченных при физиологической беременности.

В группе небеременных женщин с привычным невынашиванием в анамнезе в культуре лимфоцитов изученный показатель был достоверно снижен по сравнению с таковым у доноров.

Следует подчеркнуть, что отмеченные выше различия наблюдались на фоне высокой вариабельности показателей интенсивности флуоресценции риванола- S O<sub>2</sub>, связанного с РНК, и очевидно, требуются дополнительные исследования прежде, чем полученные результаты можно будет использовать для диагностических целей.

В целом, изучение цитохимических характеристик состояния хроматина малых лимфоцитов *in vitro* подтверждает высказанное в литературе предположение, что в организме у женщин с физиологической беременностью и у женщин с угрозой ее прерывания лимфоциты находятся в различных функциональных состояниях.

Цитохимические свойства хроматина малых лимфоцитов и некоторые показатели акушерского статуса у женщин при угрозе прерывания беременности. Как было показано в предыдущих разделах, в каждой изученной группе женщин наблюдалась очень большая вариабельность всех исследованных показателей. Очевидно, особенности внутренней среды организма, связанные с особенностями протекания физиологической и осложненной угрозой прерывания беременности, являются не единственными причинами, оказывающими влияние на структурно-функциональные особенности хроматина лимфоцитов, выявляемые с помощью использованных в нашей работе цитохимических методов. Для анализа с помощью

Таблица 2.

Интенсивность флуоресценции риванола- S O<sub>2</sub>, связанного с РНК в малых лимфоцитах in vitro , усл.ед.

Группа	Три-местр (беремен)	Кол-во лиц	Инкубация без ФУА			Инкубация с ФУА		
			1 ч	24 ч	72 ч	1 ч	24 ч	72 ч
Небеременные доноры	I	11	104,9 <sup>±</sup> 2,3	105,5 <sup>±</sup> 1,6	104,8 <sup>±</sup> 2,0	93,6 <sup>±</sup> 2,4	103,7 <sup>±</sup> 2,6	103,7 <sup>±</sup> 2,2
	II	21	90,9 <sup>±</sup> 2,8	78,0 <sup>±</sup> 2,3	69,6 <sup>±</sup> 2,1	74,4 <sup>±</sup> 3,1	80,1 <sup>±</sup> 2,6	90,2 <sup>±</sup> 2,1
С нормальным течением беременности	I	20	93,9 <sup>±</sup> 2,2	104,9 <sup>±</sup> 1,9	93,8 <sup>±</sup> 2,2	90,9 <sup>±</sup> 1,8	95,3 <sup>±</sup> 1,7	106,2 <sup>±</sup> 1,7
	II	21	104,0 <sup>±</sup> 1,7	114,1 <sup>±</sup> 2,7	109,4 <sup>±</sup> 1,6	101,6 <sup>±</sup> 3,0	113,1 <sup>±</sup> 1,8	112,6 <sup>±</sup> 2,5
С угрозой прерывания беременности	I	30	86,1 <sup>±</sup> 1,6	84,6 <sup>±</sup> 1,5	84,3 <sup>±</sup> 1,5	77,3 <sup>±</sup> 1,5	83,4 <sup>±</sup> 1,5	84,9 <sup>±</sup> 1,7
	II	21	80,1 <sup>±</sup> 2,8	70,2 <sup>±</sup> 1,2	71,3 <sup>±</sup> 1,3	77,8 <sup>±</sup> 2,4	69,3 <sup>±</sup> 1,1	64,9 <sup>±</sup> 1,6
Вне беременности в анамнезе	I	14	92,3 <sup>±</sup> 2,6	85,0 <sup>±</sup> 3,0	100,5 <sup>±</sup> 2,0	81,5 <sup>±</sup> 4,2	73,1 <sup>±</sup> 3,3	90,8 <sup>±</sup> 1,3
	II	20	74,8 <sup>±</sup> 2,0	85,4 <sup>±</sup> 2,6	79,6 <sup>±</sup> 2,7	68,6 <sup>±</sup> 2,7	79,5 <sup>±</sup> 1,8	85,8 <sup>±</sup> 2,9



многомерной статистики связей между признаками, характеризующими свойства хроматина *in situ* и *in vitro*, значениями карнопикнотического индекса и некоторыми анамнестическими показателями были использованы данные, полученные при обследовании 41 женщины с угрозой прерывания беременности.

Поларное сравнение изменчивости 20 признаков привели к получению 190 коэффициентов корреляции, из которых 48 были статистически значимы. Связывание риванола-  $S O_2$  с ДНК лимфоцитов в реакции Фельгена (1,5 мин гидролиза) коррелировало со связыванием риванола-  $S O_2$  с ДНК лимфоцитов в односуточной нестимулированной ( $r = - 0.77$ ) и трехсуточной стимулированной ФГА культурах ( $r = - 0.88$ ), а также со связыванием риванола-  $S O_2$  с РНК лимфоцитов после трехсуточного культивирования в присутствии ФГА ( $r = 0.81$ ). Связывание риванола-  $S O_2$  с ДНК стимулированных и нестимулированных лимфоцитов в односуточных культурах коррелировало со связыванием флуорохрома в трехсуточных культурах ( $r = 0.70 + 0.91$ ). То же относится и к показателям флуоресценции красителя, связанного с РНК в культуре лимфоцитов. В трех случаях из пятнадцати получены достоверные корреляции между связыванием флуорохромов ДНК и РНК лимфоцитов в культуре ( $r = 0.74 + 0.97$ ).

Компонентный анализ выявил три группы достоверно связанных между собой признаков и позволил определить удельный вклад каждого из них. Первая группа включала интенсивность флуоресценции риванола-  $S O_2$ , связанного с ДНК после короткого гидролиза, и такие признаки, как количество беременностей, выкидышей, срочных родов. Вторую группу составили признаки - "продолжительность лечения" и четыре признака, характеризующие связывание риванола-  $S O_2$  с ДНК лимфоцитов в условиях культуры. Последнюю группу образовали четыре признака, характеризующие связывание риванола-  $S O_2$  с РНК в культивированных лимфоцитах.

Регрессионный анализ позволил с помощью уравнений регрессий оценить возможность использования цитохимических показателей состояния хроматина с диагностической целью. Наибольший интерес представляет связь между сорбцией риванола-  $S O_2$  лимфоцитами после 1,5 мин гидролиза и возрастом, продолжительностью лечения, а также такими показателями анамнеза, как ко-

личество беременностей, выкидышей, срочных родов.

В целом, приведенные выше данные показывают, что состояние хроматина лимфоцитов, выявляемое использованными в данной работе цитохимическими методами, отражает комплекс системных изменений, происходящих в организме женщин с угрозой прерывания беременности. Полученные данные представляют интерес с точки зрения использования цитохимических показателей хроматина в комплексе с другими методами для выявления группы риска по невынашиванию беременности.

Выявленные корреляции между цитохимическими показателями состояния хроматина лимфоцитов и анамнестическими данными позволяют считать, что важными причинами высокой вариабельности цитохимических показателей, отмеченной в предыдущих разделах, являются возраст женщин, количество беременностей, выкидышей, родов.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Применение комплекса цитохимических методов позволило получить новые сведения о свойствах хроматина лимфоцитов при смене их функционального состояния, вызванной, по литературным данным, различным течением беременности (Булиенко и др., 1981; Джебенава и др., 1986; Roda et al., 1983). В результате удалось показать, что хроматин в малых лимфоцитах женщин, как при физиологической беременности, так и при угрозе ее прерывания, меняет свои сорбционные свойства *in situ* и *in vitro*, что обусловлено, вероятно, изменением внутренней среды организма (Запорожан, 1984; Рахматуллаева, 1986; Stites et al., 1983; Toder et al., 1984).

Уменьшение связывания риванола- $S O_2$  с ДНК в лимфоцитах после короткого кислотного гидролиза (1.5 мин) во все сроки нормального течения беременности по сравнению с небеременными донорами и увеличение этого показателя при угрозе ее прерывания не обусловлены изменениями количества ДНК, так как при оптимальном для выявления ДНК времени гидролиза (8-10 мин) отмеченные выше различия не обнаружены. Наблюдаемое при кратковременном гидролизе различие могло быть подготовлено примененной фиксирующей смесью, включавшей в свой состав уксусную кислоту, которая, по некоторым данным (Rotief, RüscheI, 1977), способна вызвать удаление некоторых

фракций гистонов. Вероятно, эти белки поддаются экстракции из ядер лимфоцитов здоровых небеременных женщин (доноров) и женщин с угрозой прерывания беременности легче, чем у здоровых беременных женщин. Однако не исключена возможность и большей защищенности альдегидных групп ДНК белками в лимфоцитах здоровых беременных женщин при воздействии кислотного гидролиза.

Меньшее связывание АО хроматином малых лимфоцитов при изученном осложнении беременности, чем при ее нормальном течении, вероятно, обусловлено стабилизацией ацетоалкоголем белков, в том числе гистонов. Об этом же свидетельствует более выраженная способность гистонов связывать примулин О у лимфоцитов женщин с угрозой прерывания беременности (культивирование в присутствии аутологичной плазмы). В целом, эти данные отражают влияние гистонов на характер связывания ДНК с красителями в лимфоцитах при угрозе прерывания беременности. Обратная корреляция между связыванием АО и окрашиваемостью гистонов не противоречит литературным данным (Auer et al., 1970; 1972; Зеленин, 1977).

Результаты по частичной депотеинизации хроматина лимфоцитов женщин при физиологической беременности и угрозе ее прерывания под воздействием 2 М раствора NaCl, показывающие исчезновение различий по связыванию АО в то время, как различие по связыванию риванола- $SO_2$  не исчезало, а принимало другой характер, свидетельствуют об особенностях взаимодействия различных групп ДНК с белками ядер лимфоцитов при беременности. Очевидно, целенаправленное изучение уровней прочности взаимодействия ДНК с белковым матриксом в лимфоцитах при различном течении беременности может дать дополнительные сведения для разрабатываемого в настоящее время направления, изучающего механизмы перестроек хроматина при различных функциональных состояниях клеток по цитохимическим показателям (Зеленин, 1982, Сьяксте и др., 1985; Nicolini et al., 1978; Traganos, 1979; Darzynkiewicz et al., 1977, 1985).

Выявленные корреляции внутри групп показателей сорбции риванола ДНК и РНК *in vitro*, а также связь этих показателей с диагностическим признаком угрозы прерывания беременности и продолжительностью лечения показывают, с одной сто-

роны, на соответствие свойств хроматина в культуре его состоянию в лимфоцитах в условиях целостного организма, что возможно, опосредовано аутологичной сывороткой крови. Об этом свидетельствуют наблюдения о влиянии присутствующих в сыворотке крови гормонов на состояние хроматина клеток (Безверщенко, Гойдаш, 1982; Константинова и др., 1982; Филатова, Шляховенко, 1982; Tsai et al., 1977; Pawlikowski, 1983). С другой стороны, наши данные свидетельствуют о возможности использования цитохимических показателей состояния хроматина лимфоцитов *in vitro* (культивированных в присутствии аутологичной сыворотки крови) для диагностических целей.

Сопоставление цитохимических показателей и анамнестических данных женщин при угрозе прерывания беременности показало влияние многих факторов на сорбционные свойства хроматина, учет которых даст возможность более эффективно прогнозировать исход беременности. Выявленные корреляции между вышеуказанными признаками показывают несомненную перспективность использования цитохимических методов изучения состояния хроматина для акушерско-гинекологической практики. Поскольку угроза прерывания беременности часто сопряжена с выраженными изменениями иммунологического статуса, изученные в настоящей работе цитохимические показатели сорбционных свойств ДНК могут представлять интерес для иммунологических исследований.

## ВЫВОДЫ

1. Цитохимические свойства хроматина лимфоцитов периферической крови женщин изменяются как при физиологической беременности, так и при угрозе ее прерывания. На основе оценки изменений цитохимических характеристик разработан метод диагностики беременности и метод определения угрозы ее прерывания.

2. Способность ДНК малых лимфоцитов связывать риванол- $\text{SO}_2$  в реакции Фельгена после 1,5-минутного гидролиза при физиологической беременности была ниже, чем у небеременных доноров; при угрозе прерывания беременности связывание риванола- $\text{SO}_2$  выше, чем у здоровых беременных женщин.

3. Способность ДНК хроматина лимфоцитов женщин при физиологической беременности и при угрозе ее прерывания свя-

зывать красители по-разному меняется после воздействия 2 М раствором NaCl. Связывание ДНК с риванолом- $SO_2$  (гидролиз 1.5 мин) у здоровых беременных женщин становится выше, чем у женщин с угрозой прерывания беременности, а наблюдающиеся различия по связыванию акридинового оранжевого исчезают. Это свидетельствует о разной защищенности различных групп ДНК белками ядер лимфоцитов от депротенизирующих воздействий.

4. Культивирование лимфоцитов в присутствии аутологической сыворотки выявило особенности связывания риванола- $SO_2$  с ДНК и РНК, связывания придулина О с гистонами при угрозе прерывания беременности: в ответ на 72-часовое воздействие ФГА изученные показатели были меньше, чем в лимфоцитах, инкубированных без ФГА; выявлены корреляции внутри групп показателей сорбции красителя ДНК и РНК в поставленных культурах и зависимость между ними и сорбцией ДНК *in situ*. В целом, результаты исследования *in vitro* показывают на соответствие свойств хроматина лимфоцитов в культуре его состоянию в лимфоцитах в условиях целостного организма, обусловленное, вероятно, особенностями гормонального и иммунологического статуса женщин при угрозе прерывания беременности.

5. Выявлены корреляции между цитохимическими особенностями хроматина лимфоцитов и данными, характеризующими акушерский статус женщин при угрозе прерывания беременности. Комплексное использование тех и других показателей необходимо при разработке более совершенных диагностических методов для акушерской практики.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Толмачев В.С., Семченкова С.А. Количественное исследование ДНК в культуре лимфоцитов при нормальном и осложненном течении беременности. - В кн.: Вопросы перинатологии, Алма-Ата, 1979, с.87-91.

2. Толмачев В.С., Семченкова С.А. Флуориметрия ДНК в лимфоцитах женщин при различном течении беременности. - В кн.: Тез. докл. 2-го съезда педиатров Казахстана, Алма-Ата, 1979, с.220-222.

3. Толмачев В.С., Семченкова С.А. О возможности применения методов цитофлуориметрии в диагностике угрозы выкиды-

ша.- В кн.: Тез.докл. 2-го Всесоюзн. съезда врачей-лаборантов. Москва, 1979, с.114-115.

4. Куватова М.Г., Толмачев В.С., Мошеева А.М., Семченкова С.А., Джаманаева К.Б. Диагностика угрозы прерывания беременности.- В кн.: Невынашивание беременности, М., 1980, с.100-101.

5. Семченкова С.А. Цитохимическое исследование нуклеинового обмена в лимфоцитах при невынашивании беременности.- В кн.: Материалы 3-го общед. съезда гигиенистов, эпидемиологов, микробиологов и инфекционистов Казахстана, Алма-Ата, 1980, т.3, с.202-203.

6. Толмачев В.С., Семченкова С.А. Способ диагностики угрозы прерывания беременности. Рационализаторское предложение № 30, 4.01.1980.

7. Толмачев В.С., Семченкова С.А., Хлюпина Т.К.Способ определения беременности. Рационализаторское предложение № 31, 4.01.1980.

8. Толмачев В.С., Семченкова С.А. Сравнительное изучение действия фитогемагглютинина на флуоресценцию ДНК в лимфоцитах женщин при физиологической беременности и угрозе ее прерывания. - Цитология и генетика, 1981, т.12, № 4, с.16-18.

9. Семченкова С.А. Влияние кратковременного кислотного гидролиза в реакции Фельгена на флуоресценцию ДНК.- В кн.: Пути улучшения методов и средств диагностики и лечения заболеваний матери, плода и новорожденного, Алма-Ата, 1981, с.124-127.

10. Семченкова С.А., Крушкова В.И., Фрязинова Т.С.Математический анализ характера изменений цитологических показателей у женщин с угрозой прерывания беременности. - В кн.: Актуальные проблемы медицины и здравоохранения, Алма-Ата, 1982, с.116-117.

11. Толмачев В.С., Семченкова С.А. Способ диагностики беременности. Авторское свидетельство № 945724, 1982 г.

12. Семченкова С.А., Сосновая В.Ю., Боровицкая Е.И., Аубанова Р.А., Толмачев В.С. Свойства хроматина клеток в зависимости от этиологии невынашивания беременности. - В кн.: Актуальные вопр.охраны здоровья женщин, матери и новорожденного. Алма-Ата, 1984, с.151-153.

13. Семченкова С.А. Перспективы использования цитохимического теста для диагностики беременности. - В кн.: Материалы третьего съезда акушеров-гинекологов Казахстана, Алма-Ата, 1985, с.193-193.

14. Толмачев В.С., Семченкова С.А., Боровицкая Е.И., Сосновая Е.Ю., Калимагамбетов А.М., Генетический аппарат клеток при невынашивании беременности. - Здоровоохранение Казахстана, 1985, № 10, с.34-36.

Подписано в печать 16.02.87.

УГ 14062. Тираж 100 экз. Заказ 308.

Типография КазНИИТИ: 480120, г.Алма-Ата, Кирова, 221.