

УДК 618.2:612.273.2-092.4

## РОЛЬ ОСТРОЙ ГИПОКСИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ В ПОВЫШЕНИИ КОНЦЕНТРАЦИИ КОМПОНЕНТОВ АМНИОТИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ У КРОЛЬЧИХ НА ПОЗДНИХ СРОКАХ БЕРЕМЕННОСТИ

<sup>1</sup> Алтайский государственный медицинский университет, г. Барнаул<sup>2</sup> Государственный университет штата Нью-Йорк в Олбани, Политехнический институт, Колледж нанонаук, Олбани, г. Нью-ЙоркСузопов Е.В.<sup>1</sup>, Поповцева А.В.<sup>1</sup>, Лытгарь И.А.<sup>1</sup>, Кинан Л.А.<sup>2</sup>, Кореновский Ю.В.<sup>1</sup>

*Цель исследования:* оценить влияние острой гипоксической гипоксии продолжительностью 60 мин. на объем и состав амниотической жидкости (АЖ) первобеременных крольчих на 27-28-е сутки беременности. *Методика:* Крольчихи случайно были разделены на опытную ( $n = 9$ ) и контрольную группы ( $n = 6$ ). Определялись объем АЖ, ее осмоляльность, концентрации электролитов –  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , неорганического фосфата ( $\text{P}_i$ ),  $\text{Ca}^{2+}$  и органических компонентов (креатинин, мочевины, белок). *Результаты:* Острая гипоксическая гипоксия повышает осмоляльность, концентрацию электролитов и органических компонентов в АЖ. *Заключение:* Полагаем, что описанные изменения параметров АЖ обусловлены повышением ее образования и усилением реабсорбции воды оболочками плода или почками плода из первичной мочи. Обнаружено, что повышение осмоляльности АЖ сопровождается повышением концентрации нормальных компонентов АЖ. Таким образом, одним из подходов к нормализации концентрации компонентов АЖ может быть использование пересчета концентрации диагностически значимых соединений на осмоляльность или концентрацию естественного компонента АЖ (в частности креатинина).

**Ключевые слова:** амниотическая жидкость, беременность, плод, гипоксическая гипоксия, кролики

*The purpose of research:* The influence of 60 minutes' exposure to acute hypoxic hypoxia ( $10,0 \pm 2,0\% \text{O}_2$ ) on the amniotic fluid (AF) of first-pregnant rabbits on the 27-28th day of gestation was investigated.

*Material and methods:* An experimental (9 rabbits) and control (6 rabbits) group each were used in this study. Volume of amniotic fluid, osmolality and concentration of electrolytes –  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , non-organic phosphate ( $\text{P}_i$ ),  $\text{Ca}^{2+}$  and organic components (creatinine, urea, protein) in AF were measured.

*Results:* We found that acute hypoxic hypoxia caused an increase in volume and osmolality of AF, as well as an increase in AF's electrolytes and organic components. We postulate that changes in AF parameters were caused by an increase of AF formation and an acceleration of water resorption in fetus kidneys or fetus membranes.

*Conclusion:* We found that an increase in AF osmolality during hypoxia is associated with an increasing concentration of normal components of AF, and it is possible that this phenomenon may increase the concentration of diagnostic biomolecules. We hypothesize that correcting the concentration of diagnostic biomolecules in AF according to its osmolality (especially in hypoxia) could provide a more precise diagnostic technique than using raw concentrations.

**Key words:** amniotic fluid, pregnancy, fetus, hypoxic hypoxia, rabbits

Объем и состав амниотической жидкости (АЖ) отражает гомеостаз матери и плода, поэтому представляется полезным его мониторинг в ходе беременности с определением ряда важных параметров [1]. Однако изучение регуляции объема и состава АЖ затрудняется наличием целого ряда источников ее формирования и оттока [2].

В регуляции объема и состава АЖ участвуют несколько механизмов: диурез плода, интрамембранный путь (переход воды и электролитов из АЖ в сосуды плода), заглатывание АЖ плодом, секреция легкими и носоглоткой плода, трансмембранный путь (всасывание жидкости через амнион в организм матери), чрескожный путь и всасывание через эпителий

пуповины [3]. Следует учитывать, что к 20-му дню беременности кожа плода и поверхность пуповины кератинизированы, вследствие чего чрескожный и пуповинный пути практически не обеспечивают транспорт компонентов АЖ [4]. Оставшиеся шесть путей можно разделить на пути формирования (моча плода, секрет легких и секрет носоглотки), ведущие к увеличению объема АЖ, и пути оттока (интрамембранный путь, заглатывание и трансмембранный путь), ведущие к его уменьшению.

Диурез плода – основной путь формирования АЖ [5]. Показана прямая корреляция скорости тока мочи плода и объема АЖ [6], которая образует приблизительно три четверти объема АЖ, являясь основным источником ее ионно-

го и органического состава [2]. Известно также, что протекание беременности в значительной степени зависит от обеспечения нормального газообмена между организмом матери и плодом. Последние исследования показывают, что хроническая гипоксия не вызывает изменения в объеме АЖ [7].

Целью настоящего исследования было изучение влияния острой гипоксической гипоксии на объем и электролитный состав амниотической жидкости крольчих на 27-28-е сутки беременности.

### Материал и методы

Исследование проведено на первобеременных крольчихах (n = 15) массой 4-5 кг на сроке беременности 27-28 суток (при нормальной длительности беременности – 31 сутки). Оплодотворение проводили разными случайно выбранными самцами, после чего крольчихи находились в одиночных клетках на свободном питании. Крольчихи случайно были разделены на две группы: опытную (n = 9) и контрольную (n = 6).

Крольчих из опытной группы на 60 мин. помещали в индивидуальную герметичную проточную камеру, куда компрессором нагнеталась газовая смесь, содержащая  $10 \pm 2$  % кислорода и  $90 \pm 2$  % азота. Контроль газового состава в камере производили при помощи газоанализатора Microlux O<sub>2</sub>+CO<sub>2</sub> (ООО «Микролюкс», Екатеринбург, Россия). Крольчихи из контрольной группы помещались в эту же камеру на 60 мин., содержащую атмосферный воздух.

После этого животных забивали методом цервикальной дислокации и через 15 мин. проводили срединную лапаротомию и удаляли матку. Из полости матки выделяли и извлекали амниотические мешки с плодами и разделяли материнскую и плодную части плаценты, не нарушая целостности амниотического мешка. Одноразовым шприцем из амниотического мешка извлекалась амниотическая жидкость.

Критериями включения крольчих в исследование: 1) срок беременности 27-28 суток; 2) масса беременных крольчих 4-5 кг. Критерий исключения плодов из исследования – вес плода менее 20 г. Общая характеристика крольчих и их плодов представлена в табл. 1.

Таблица 1

Масса плода и плаценты на 27-28-е сутки жизни

	Гипоксия (n = 43)	Контроль (n = 40)	P
Масса плода, г	37,8 (30,6—50,3)	38,4 (31,0—41,8)	P = 0,280
Масса плодной части плаценты, г	3,37 (2,79—3,71)	3,47 (3,10—4,22)	P = 0,180

Примечание: данные представлены в виде — медиана (25-75 %), P – достоверность межгрупповых различий по U-тесту Манна-Уитни.

Были получены образцы амниотической жидкости у крольчих опытной группы (n = 43) и контрольной группы (n = 40). Образцы центрифугировали в течение 15 мин. при 1200 g, замораживали и хранили при температуре минус 20°C не более одного месяца до проведения биохимического исследования. В образцах амниотической жидкости определяли концентрации ионов Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, неорганического фосфата (P<sub>i</sub>) и Ca<sup>2+</sup>, креатинина, мочевины, белка и осмоляльность.

Биохимические исследования проводили на автоматическом биохимическом анализаторе Dimension Xpand (Siemens, Германия). Концентрацию ионов Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> и Cl<sup>-</sup> определяли потенциометрическим методом с использованием модуля QuikLyte Integrate Multisensor (Siemens, кат. № S600, США); общую концентрацию Ca<sup>2+</sup> – колориметрическим методом набором реагентов CA Calcium Flex reagent cartridge (Siemens, кат. № EA4164, США); концентрацию P<sub>i</sub> – колориметрическим методом набором реагентов PHOS Phosphorus Flex reagent cartridge

(Siemens, кат. № EA4172, США). Осмоляльность АЖ определяли при помощи осмометра Vapro (Wescor, США). Концентрацию креатинина в АЖ определяли модифицированным методом Яффе реагентами CREA Creatinine Flex reagent cartridge (Siemens, кат. № DA4254, США); концентрацию мочевины – кинетическим ферментативным (уреазным) методом реагентами BUN Urea Nitrogen Flex reagent cartridge («Siemens», кат. № EB4309, США); концентрацию белка – колориметрическим методом с пирогалловым красным с помощью набора реагентов Белок-ПГК-Ново («Вектор-Бест», кат. № В-8084, Россия) с использованием анализатора общего белка «Беллур-600» (ООО НПП «Техномедика», Россия). Настоящая работа одобрена локальным этическим комитетом ГБОУ ВПО АГМУ Минздрава России.

### Обработка данных

Статистическую обработку данных проводили в программе JMP 7.0 (SAS Institute, США). Рассчитывали медиану, 25 и 75 перцентили, до-

стоверность межгрупповых различий по критерию Манна-Уитни, множественный корреляционный анализ по критерию Спирмена. Уровень статистической значимости был принят за 5% ( $p < 0,05$ ).

### Результаты и обсуждение

Острая гипоксическая гипоксия вызывала повышение осмоляльности АЖ и концентрации всех исследованных неорганических ионов и органических компонентов (табл. 2).

Таблица 2

*Влияние острой гипоксической гипоксии на объем и состав амниотической жидкости крольчих на 27-28-е сутки беременности*

	Гипоксическая гипоксия (n = 43)	Контроль (n = 40)	p
Объем амниотической жидкости, мл	0,36 (0,15–0,88)	0,46 (0,24–0,78)	0,357
Осмоляльность, мОсмоль/кг	301,0 (295,8–307,3)	237,0 (223,0–245,3)	< 0,001
Na <sup>+</sup> , ммоль/л	144,0 (142,0–148,0)	132,0 (129,0–135,3)	< 0,001
K <sup>+</sup> , ммоль/л	10,50 (9,80–11,13)	7,40 (6,68–8,93)	< 0,001
Cl <sup>-</sup> , ммоль/л	109,0 (107,0–111,0)	102,0 (100,8–106,0)	< 0,001
Ca <sup>2+</sup> , ммоль/л	2,99 (2,51–3,55)	2,13 (2,05–2,30)	< 0,001
P <sub>v</sub> , ммоль/л	1,32 (1,12–1,55)	1,00 (0,78–1,11)	< 0,001
Белок, г/л	5,15 (4,89–5,38)	3,65 (3,15–3,75)	< 0,001
Креатинин, ммоль/л	0,200 (0,162–0,231)	0,155 (0,136–0,166)	< 0,001
Мочевина, ммоль/л	8,20 (7,75–8,70)	6,50 (6,05–6,85)	< 0,001

Примечание: Данные представлены в виде — медиана (25–75 %); p – достоверность межгрупповых различий по критерию Манна-Уитни.

Обнаружено повышение концентрации всех исследованных компонентов, а также осмоляльности АЖ, включая повышение только фильтруемых компонентов – креатинина и мочевины. Это свидетельствует о том, что фильтрация в почках плода повысилась, но также усилилась реабсорбция воды либо на стадии формирования почками плода [7], либо в самом амниотическом мешке [8]. Учитывая существование двух систем транспорта в оболочках плода – транспорт воды аквапоринами [9] и транцитоз [10], а также то, что концентрация большинства исследованных компонентов (за исключением ионов Na<sup>+</sup> и Cl<sup>-</sup>) была превышена приблизительно на треть, наиболее вероятным является сочетание активации реабсорбции компонентов АЖ в оболочках плода обоими этими механизмами.

Объем АЖ коррелировал с концентрацией креатинина и Ca<sup>2+</sup> при острой гипоксической гипоксии ( $r = 0,460$ ,  $p = 0,023$ ;  $r = 0,445$ ,  $p = 0,029$  соответственно), но не коррелировал в контрольной группе ( $r = 0,093$ ,  $p = 0,597$ ;  $r = 0,187$ ,  $p = 0,286$ , соответственно), что указывает на увеличение процесса фильтрации в почках плода. Кроме того, объем амниотической жидкости в норме находился в обратной зависимости от концентрации мочевины ( $r = -0,481$ ,  $p = 0,0004$ ), при остром гипоксическом воздействии связь становилась прямой ( $r = 0,434$ ,  $p = 0,034$ ).

### Заключение и выводы

В соответствии со знаниями о путях формирования АЖ (моча плода, секреция легкими и носоглоткой, интрамембранный путь, глотание, трансмембранный путь) выявленное концентрирование АЖ на фоне острой гипоксической гипоксии, вероятно, обусловлено удалением воды из образующейся первичной мочи плода или плодными оболочками из амниотического мешка.

Эти данные показывают, что повышение концентрации биомолекул в АЖ во время гипоксии, например, лактата [11] или интерлейкина-8 [12], может быть связано с повышением осмоляльности АЖ. Для нормализации концентрации биомолекул в АЖ (особенно при гипоксии) может оказаться важным рассчитать отношения исследуемых биомолекул к осмоляльности или нормальным компонентом мочи плода, например, креатинина [3].

### Список литературы

1. Кореновский Ю.В., Калитникова И.А., Бурякова С.И. и др. Регуляция объема амниотической жидкости. Акушерство и гинекология. 2016;2:44–48.
2. Brace RA, Cheung CY. Regulation of amniotic fluid volume: evolving concepts. Adv Exp Med Biol. 2014;814:49-68.
3. Torrance HL, Pistorius L, Voorbij HA, Visser GH. Lactate to creatinine ratio in amniotic

fluid: a pilot study. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2013;26(7):728-730.

4. Maruyama T, Yoshizuka M, Fujimoto S. Light and electron microscopy of fetal rabbit skin with special reference to the role of mesenchymal cells in epidermal differentiation. *Acta Anatomica.* 1988;133:143-155.

5. Beall MH, van den Wijngaard JP, van Gemert MJ, Ross MG. Amniotic fluid water dynamics. *Placenta.* 2007;28:816-23.

6. Mann SE, Nijland MJ, Ross MG. Ovine adaptations to chronically reduced urine flow: preservation of amniotic fluid volume. *J Appl Physiol.* 1996;81:2588-2594.

7. Thurlow RW, Brace RA. Swallowing, urine flow and amniotic fluid volume responses to prolonged hypoxia in the ovine fetus. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;189:601-608.

8. Daneshmand SS, Cheung CY, Brace RA. Regulation of amniotic fluid volume by intramembranous absorption in sheep: role of passive permeability and vascular endothelial growth factor. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;188:786-93.

9. Mann SE, Dvorak N, Gilbert H, Taylor RN. Steady-state levels of aquaporin 1 mRNA expression are increased in idiopathic polyhydramnios. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;194:884-887.

10. Chen J, Braet F, Brodsky S, Weinstein T, Romanov V, Noiri E. et al. VEGF-induced mobilization of caveolae and increase in permeability of endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002;282:1053-63.

11. Wiberg-Itzel E, Pettersson H, Andolf E, Hansson A, Winbladh B, Akerud H. Lactate concentration in amniotic fluid: a good predictor of labor outcome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2010;152(1):34-38.

12. Kacerovsky M, Drahosova M, Hornychova H, Pliskova L, Bolehovska R, Forstl M, Tosner J, Andrys C. Value of amniotic fluid interleukin-8 for

the prediction of histological chorioamnionitis in preterm premature rupture of membranes. *Neuro Endocrinol Lett.* 2009;30(6):733-8.

#### Контактная информация

Автор, ответственный за переписку: Сузопов Егор Валерьевич, лаборант кафедры общей и биологической химии, клинической лабораторной диагностики Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул.

Тел.: (3852) 241309.

E-mail: suzopov1egor@gmail.com

#### Информация об авторах

Поповцева Анна Валентиновна, ассистент кафедры биохимии и клинической лабораторной диагностики Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул.

656038, г. Барнаул, проспект Ленина, 40.

Тел.: (3852) 24-13-92.

E-mail: popovseva@gmail.com

Лытарь Ирина Александровна, ассистент кафедры патологической физиологии Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул.

656038, г. Барнаул, проспект Ленина, 40.

Тел.: (3852) 24-19-71.

E-mail: eireenl86@gmail.com

Кинан Лиза Анна, сотрудник государственного университета штата Нью-Йорк в Олбани, Политехнический институт, Колледж нанонаук, Олбани, США, г. Нью-Йорк.

Тел.: +1 518-437-8686

E-mail: lisaakeenan@gmail.com

Короновский Юрий Владимирович, к.м.н., доцент, заведующий кафедрой общей и биологической химии, клинической лабораторной диагностики Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул.

Тел.: (3852) 566862.

E-mail: timidin@gmail.com