

УДК 577.112.3+677.15+618.46+612.649+618.396+618.3-06+618.396
©Коллектив авторов

ДИСБАЛАНС СИСТЕМЫ ГЛУТАМИН-ГЛУТАМИНОВАЯ КИСЛОТА В ПЛАЦЕНТЕ И ОКОЛОПЛОДНЫХ ВОДАХ ПРИ ПЛАЦЕНТАРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Т.Н. Погорелова, В.О. Гунько, В.А. Линде*

Ростовский научно-исследовательский институт акушерства и педиатрии,
334012 Ростов-на-Дону, Мечникова, 43; тел.: (863)227-50-77;
факс: (863)232-57-63; эл.почта: miiar@yandex.ru

Изучены особенности метаболизма глутамина и глутаминовой кислоты в плаценте и околоплодных водах при плацентарной недостаточности. Установлено, что плацентарная недостаточность развивается на фоне повышения содержания глутаминовой кислоты и снижения содержания глутамина в обоих объектах исследования. Выявленные нарушения сопровождались изменением активности ферментов, участвующих в метаболизме этих аминокислот. Обнаружено снижение активности глутаматдегидрогеназы и повышение активности глутаминазы при одновременном уменьшении активности глутаминсинтетазы. Установленное понижение активности глутамин-кетокислотной аминотрансферазы, несомненно, очевидно, компенсаторный характер, не предотвращает падение уровня глутамина. Более глубокие нарушения в системе глутаминовая кислота-глутамин наблюдаются при преждевременном развитии родовой деятельности.

Ключевые слова: глутаминовая кислота, глутамин, плацента, околоплодные воды, плацентарная недостаточность.

ВВЕДЕНИЕ

Внутриутробный онтогенез сопровождается глубокими биохимическими изменениями не только в материнском организме, но и в плаценте, во многом обеспечивающей гомеостаз системы мать-плацента-плод, и, как следствие, нормальное развитие гестации на всем ее протяжении. Возникновение нарушений в течение пренатального периода зачастую обусловлено развитием плацентарной недостаточности (ПН), которая включена в Международную классификацию болезней (МКБ-10, О36.5.0) как основной диагноз патологического состояния плода. Последствия метаболических повреждений в плаценте сказываются не только на развитии плода и новорожденного, но могут обнаруживаться

даже в отдаленные этапы постнатального онтогенеза [1, 2]. В функционировании фетоплацентарной системы существенную роль играют также околоплодные воды – сложная биологически активная среда, модификация состава которой отражает изменения, происходящие в данной системе, особенно в организме плода [3, 4].

Среди химических соединений плаценты одно из ведущих мест занимают аминокислоты, прежде всего как структурные компоненты белковых молекул, поскольку плацента, являясь быстроразвивающимся органом, характеризуется чрезвычайно высокой скоростью синтеза белков [5]. Кроме участия в биосинтезе плацентарных белков, аминокислоты используются плодом как пластический материал, включаются

Использованные сокращения: ПН – плацентарная недостаточность; ГДГ – глутаматдегидрогеназа; ГКТ – глутамин-кетокислотная аминотрансфераза; ФАГ – фосфат-активируемая глутаминаза; ГС – глутаминсинтетаза.

* - адресат для переписки

в энергетический обмен, некоторые из них выполняют многочисленные самостоятельные функции, в том числе в качестве индукторов пролиферативных процессов, интенсивно протекающих в развивающейся плаценте [6, 7]. К числу аминокислот, выполняющих интегрирующую роль в азотистом обмене, относится глутаминовая кислота и её амид – глутамин, на долю которых в различных тканях приходится от 30 до 60% общего количества аминокислот [8]. В аминокислотном пуле плаценты глутаминовая кислота и глутамин занимают особенно важное место, участвуя во многих регуляторно-метаболических процессах, направленных на обеспечение роста и нормальных физиологических функций плода [9, 10].

Учитывая вышеизложенное, можно полагать, что нарушения обмена указанных аминокислот будет сопровождаться дальнейшими биохимическими изменениями в плацентарной ткани и нарушением функциональных связей между организмами матери и плода. В то же время сведения о динамике содержания глутаминовой кислоты, глутамина и активности ферментов их обмена в плаценте человека малочисленны и неоднозначны, что обусловило проведение настоящего исследования.

Цель работы: изучение особенностей обмена глутаминовой кислоты и глутамина в плаценте и околоплодных водах при физиологической и осложнённой беременности.

МЕТОДИКА

Исследованы плаценты 55 женщин 23-29-летнего возраста. Из них 20 женщин с ПН, доносивших беременность (39-40 недель), составили 1-ю группу. 13 женщин с ПН, у которых беременность закончилась преждевременными родами в 35-37 недель, составили 2-ю группу. Контрольная группа была представлена 22 условно здоровыми женщинами с неосложнённой беременностью и родами. Диагноз ПН поставлен на основании комплексного динамического обследования, включающего гормональные, ультразвуковые, доплерометрические исследования, определение активности специфических плацентарных изоферментов щелочной фосфатазы и глутаматдегидрогеназы [11]. По возрасту, индексу массы тела, времени наступления менархе, регулярности цикла, паритету беременностей и родов, экстрагенитальной и гинекологической патологии обследуемые

группы беременных были сопоставимы. Критериями исключения из исследования являлись декомпенсированные формы соматических заболеваний, антенатальная гибель плода, применение пациентками препаратов глутаминовой кислоты с витаминными добавками, отсутствие информированного согласия женщины участвовать в исследовании. Материалом исследования служили также околоплодные воды, полученные при вскрытии плодного пузыря в первом периоде родов у женщин 1-й и контрольной групп. Все обследованные женщины дали информированное согласие на расширенный алгоритм обследования.

В 0,5 мл безбелковых экстрактов плаценты и околоплодных вод определяли содержание свободных аминокислот на автоматическом анализаторе ААА-400 (“Microtechna”, Чехия). Подготовку тканей и анализ проводили согласно инструкции к анализатору по стандартной программе с использованием трёх натрий-цитратных буферных растворов рН 3,25, 4,25, 5,28. Полный цикл анализа 150 мин. Идентификацию глутаминовой кислоты и глутамина, расчёт площадей пиков и определение концентрации осуществляли по результатам анализа соответствующих стандартов (“Sigma-Aldrich”, США) для калибровки анализатора.

Активность глутаматдегидрогеназы (ГДГ; КФ 1.4.13) оценивали по приросту NADH при 340 нм [12]. Инкубационная смесь содержала 10 мМ фосфатный буфер (рН 7,8), 0,5 мМ глутамат натрия, 0,5 мМ NAD, 100 мкг белка. Об активности фосфат-активируемой глутаминазы (ФАГ; КФ 3.5.1.2) судили по снижению количества глутамина [13]. Инкубационная смесь содержала 1 мМ глутамин, 10 мМ калий-фосфатный буфер (рН 8,1), 100 мкг белка. Активность глутамин-кетокислотной аминотрансферазы (ГКТ; КФ 2.6.1.15) определяли по накоплению количества аммиака, оцененного спектрофотометрическим методом с помощью реакции несслеризации (при 430 нм) [14]. В состав инкубационной смеси входили 1,0 мМ глутамин, 1,0 мМ щавелевая кислота, 10 мМ, рН 8,3 фосфатный буфер, 100 мкг белка. Активность глутаминсинтетазы (ГС; КФ 6.3.1.2) оценивали по приросту содержания глутамина [15]. Основные компоненты инкубационной смеси: 2 мМ глутамат натрия, 0,5 мМ АТР, 1,5 мМ, рН 7,2 трис-НСl буфер, 1,0 мМ NH₄Cl, 100 мкг белка.

Время инкубации при определении всех ферментов 30 мин при 37°C. После окончания инкубации в контрольные пробы добавляли один из основных субстратов. Результаты относили к 1 мг белка. Содержание общего белка определяли по методу Лоури [16].

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью лицензионного пакета программ Statistica (версия 6.0 фирмы "StatSoft. Inc."). Однородность дисперсий проверяли по критерию Фишера. Достоверность различий между сравниваемыми показателями определяли по критерию Стьюдента (t-критерий) и его аналогу для непараметрических распределений – критерию Манна-Уитни. Результаты оценивали как статистически значимые при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведённые нами исследования свидетельствуют о значительных отличиях в содержании глутаминовой кислоты и её амида

в плаценте и околоплодных водах (табл. 1 и 2). Если соотношение глутаминовой кислоты и глутамина в плаценте при физиологической беременности равно 4,0, то в околоплодных водах оно составляет 0,7. Высокое содержание глутамина в околоплодных водах подтверждает его особое значение в процессах развития эмбриона и плода. Известно, что глутамин более необходим для оптимального роста клеток, чем любая другая аминокислота [17]. Определённые отличия характерны также для соотношения ферментов обмена глутамина. Активность ГС в околоплодных водах, в большей степени чем в плаценте, превышает таковую ФАГ, что может отражать преобладание синтеза глутамина в тканях плода по сравнению с плацентой. В то же время уровень глутаминовой кислоты в околоплодных водах почти в 2 раза ниже плацентарного. Такое различие, очевидно, объясняется относительно низким транспортом глутамата из плаценты к плоду, в связи с необходимостью поддержания стабильного уровня этой аминокислоты в плаценте.

Таблица 1. Содержание глутаминовой кислоты, глутамина и активность ферментов их обмена в плаценте при физиологической беременности и ПН.

Показатель	Контрольная группа	1-я группа	2-я группа
Глутаминовая кислота, мкмоль/г ткани	2,03±0,15	2,49±0,17*	2,73±0,20**
Глутамин, мкмоль/г ткани	0,51±0,04	0,40±0,02**	0,34±0,03***
Глутаматдегидрогеназа, нмоль/мин·мг белка	4,94±0,32	3,86±0,21**	3,54±0,21***
Глутамин-кетокислотная аминотрансфераза, нмоль/мин·мг белка	0,88±0,05	0,73±0,04**	0,69±0,04**
Глутаминаза, нмоль/мин·мг белка	1,24±0,08	1,49±0,08*	1,68±0,12**
Глутаминсинтетаза, нмоль/мин·мг белка	1,71±0,11	1,44±0,07*	1,25±0,10**

Примечание. Здесь и в таблице 2: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ по сравнению с контролем. Данные представлены в виде средней величины ± ошибка средней.

Таблица 2. Содержание глутаминовой кислоты, глутамина и активность ферментов их обмена в околоплодных водах при физиологической беременности и ПН.

Показатель	Контрольная группа	1-я группа
Глутаминовая кислота, мкмоль/л	1,03±0,07	1,29±0,08*
Глутамин, мкмоль/л	1,48±0,10	1,13±0,08**
Глутаматдегидрогеназа, нмоль/мин·мг белка	2,14±0,12	1,75±0,10**
Глутаминаза, нмоль/мин·мг белка	0,74±0,04	0,86±0,04*
Глутаминсинтетаза, нмоль/мин·мг белка	1,15±0,09	0,90±0,07*

В плацентарной ткани (синцитиотрофобласте) женщин с ПН, доносивших беременность, наблюдаются изменения содержания глутамата и глутамина, а также активности ферментов их обмена (табл. 1). Так, содержание глутаминовой кислоты повышено на 23% по сравнению с контрольной величиной. Аналогичная направленность и степень изменения характерны и для ГДГ, катализирующей окислительное дезаминирование глутаминовой кислоты. Последнее, очевидно, является одной из главных причин избыточного накопления глутаминовой кислоты в плаценте, отражающегося на многих метаболических процессах: синтезе других аминокислот, нуклеиновых кислот, биоактивных соединений, течении ряда ферментативных реакций, сопряжённых с циклом трикарбоновых кислот. Кроме того, изменение содержания глутаминовой кислоты нарушает состояние буферных систем, в которых она выполняет функции аниона, а также модифицирует баланс NAD и NADH, являющихся кофакторами в процессах обратимого окисления глутаминовой кислоты.

В свою очередь, снижение активности ГДГ может быть связано с гормональной дисфункцией, имеющей место у женщин с ПН, в частности с уменьшением секреции эстрогенов и прогестерона [18]. Помимо непосредственного влияния этих гормонов на структуру ГДГ в опытах *in vitro*, установлено их воздействие на синтез кофакторов данного фермента [19].

Для плацентарного глутамина в этих условиях характерно снижение концентрации на 22% относительно нормальной величины, что нарушает физиологические процессы не только в самой плаценте, но и у плода, к которому глутамин активно поступает из плаценты. Известно, что около 20% азота плода приходится именно на глутамин [17]. В связи с этим полноценное обеспечение потребностей быстрорастущего плода зависит от количества, поступающего к нему глутамина, участвующего в различных метаболических реакциях и являющегося структурным компонентом ряда важных клеточных соединений, в том числе нуклеотидов.

Проведённый корреляционный анализ выявил тесную связь между содержанием плацентарных глутамина и глутаминовой кислоты ($r=-0,81$), позволяющую полагать, что одной из причин снижения концентрации данного амида при ПН является повышение активности глутаминазы, подтвержденное в наших исследованиях. Как следует

из таблицы 1, активность ФАГ в плаценте женщин 1-й группы увеличена на 20%, противоположная направленность изменения характерна для процесса синтеза глутамина под действием ГС, активность которой снижена на 16%. В то же время активность ГКТ, также приводящей к отщеплению амидной группы глутамина, уменьшена в плаценте указанной группы женщин на 17%, что возможно имеет компенсаторный характер. Однако, снижение активности ГКТ не предотвращает падения уровня глутамина, поскольку происходит на фоне повышения дезамидирования в реакции, катализируемой ФАГ, и угнетения его синтеза под действием АТР-зависимой ГС. Биохимическая ситуация усугубляется значительным уменьшением количества АТР в плаценте при её недостаточности [20].

У женщин 2-й группы, не доносивших беременность, дисбаланс в системе глутамат – глутамин более выражен. Содержание глутаминовой кислоты в плаценте выше контрольного показателя на 35%. Значительная степень увеличения по сравнению с показателями при доношивании осложненной беременности имеет место также для ГДГ, активность которой увеличена почти на 30%, что коррелирует с усилением гормонального дефицита при преждевременных родах [21].

Содержание глутамина в плаценте женщин 2-й группы на 17% и 33% ниже, чем в 1-й и контрольной группах соответственно. Подобное нарастание отрицательной динамики обнаруживаются и для основных ферментов обмена глутамина. Так, плацентарная активность ФАГ при недоношенной беременности повышена относительно нормальной величины на 35%. В большей степени, чем при доношенной гестации, снижается активность ГС (на 27%) и ГКТ (на 22%). Следовательно преждевременное развитие родовой деятельности у женщин с ПН происходит на фоне более глубоких изменений в обмене глутаминовой кислоты и глутамина, которые, по-видимому, являются важными звеньями в общей цепи повреждений, наблюдающихся в плаценте при данной патологии [22].

Наряду с вышеописанными нарушениями в плаценте, при ПН нами установлены достоверные изменения в системе глутаминовая кислота – глутамин в околоплодных водах, которые, как указывалось, во многом отражают функционально-метаболические особенности состояния плода (табл. 2). Содержание глутаминовой кислоты в околоплодных водах

женщин 1-й группы на 25% выше, чем в контрольной. Учитывая роль глутаминовой кислоты как возбуждающего нейромедиатора [23], способного усиливать функциональную нагрузку нейронов, можно полагать, что повышение количества этой аминокислоты будет влиять на состояние ещё незрелого головного мозга плода. Поэтому уровень глутаминовой кислоты в околоплодных водах является дополнительным маркером перинатальной энцефалопатии.

Активность ГДГ в околоплодных водах, подобно динамике в плаценте, при ПН снижена, хотя и в меньшей степени. Наблюдается также изменение реакции амидирования глутаминовой кислоты: активность ГС при ПН снижается на 21%, по-видимому, в результате её модификации, прежде всего, в печени плода. Одновременно происходит усиление дезамидирования глутамина в реакции, катализируемой ФАГ, активность которой повышается на 17%. Противоположные изменения активности основных ферментов, участвующих в синтезе и дезамидировании глутамина, приводят к снижению его содержания на 24%. Важная роль глутамина в фетальном метаболизме позволяет полагать, что даже не очень значительное уменьшение количества амида в результате снижения синтеза и поступления из плаценты влияет на развитие органов и тканей плода. Сопоставление биохимических показателей в плаценте и околоплодных водах с состоянием плода позволило выявить, что при синдроме задержки роста плода изменения в содержании глутамина более выражены, чем при его отсутствии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные свидетельствуют о том, что при ПН в плаценте и околоплодных водах происходят разнонаправленные изменения в обмене глутаминовой кислоты и глутамина, необходимых для обеспечения функционально-метаболической полноценности плаценты, нормального роста и развития плода. Наиболее выраженные отклонения в балансе между глутаминовой кислотой и её амидом обнаружены при преждевременных родах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Jansson T., Powell T.L. (2007) Clin. Sci. (Lond.), **113**, 1–13.
2. Fowden A., Giussani D., Forhead A. (2006) Physiology, **21**, 29–37.
3. Погорелова Т.Н., Гунько В.О., Друккер Н.А., Линде В.А. (2010) Биомед. химия, **60**, 616–620.
4. Погорелова Т.Н., Крукиер И.И., Линде В.А. (2012) Биохимия амниотической жидкости. LAP LAMBERT Academic Publishing.
5. Chard T. (1986) Clin. Obstet. Gynecol., **13**, 447–467.
6. Grillo M.A., Lanza A., Colombatto S. (2008) Amino Acids, **34**, 517–523.
7. Cleal J.K., Lewis R.M. (2008) J. Neuroendocrinol., **20**, 419–426.
8. Tapiero H., Mathé G., Couvreur P., Tew K.D. (2002) Biomed. Pharmacother., **56**, 446–457.
9. Battaglia F.C., Regnault T.R. (2001) Placenta, **22**, 145–161.
10. Neu J. (2001) J. Nutr., **131**, 2585S–2589S.
11. Погорелова Т.Н., Крукиер И.И., Длужевская Т.С. (1991) Открытия, изобретения, **6**, 43.
12. Асатиани В.С. (1965) Новые методы биохимической фотометрии, Наука, М.
13. Gella F.J., Pascual M.A. (1982) Anal. Biochem., **127**, 322–325.
14. Петрунь Н.М., Мигаль Л.А. (1975) Лаб. дело, №6, 352–353.
15. Remesar X., Arola L., Palou A., Alemany M. (1982) Horm. Metab. Res., **14**, 419–21.
16. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) J. Biol. Chem., **193**, 265–275.
17. Battaglia F.C. (2000) J. Nutr., **130**, 974S–977S.
18. Klimek J., Makarewicz W., Swierczynski J., Bossy-Bukato G., Zelewski L. (1993) Troph. Res., **7**, 77–86.
19. Borompokas N., Papachatzaki M.M., Kanavouras K., Mastorodemos V., Zaganas I., Spanaki C., Plaitakis A. (2010) J. Biol. Chem., **285**, 31380–31387.
20. Погорелова Т.Н., Друккер Н.А., Линде В.А. (2010) Пробл. репродукции, **16**, 86–89.
21. Савельева Г.М., Федорова М.В., Клименко П.А., Сичинава Л.Т. (1991) Плацентарная недостаточность, Медицина, М.
22. Погорелова Т.Н., Линде В.А., Крукиер И.И., Гунько В.О., Друккер Н.А. (2012) Молекулярные механизмы регуляции метаболических процессов в плаценте при физиологически протекающей и осложнённой беременности, Гиппократ, СПб.
23. Luján R., Shigemoto R., López-Bendito G. (2005) Neuroscience, **130**, 567–580.

Поступила: 14. 03. 2014.

**IMBALANCE OF SYSTEM OF GLUTAMIN – GLUTAMIC ACID IN THE PLACENTA
AND AMNIOTIC FLUID AT PLACENTAL INSUFFICIENCY**

T.N. Pogorelova, V.O. Gunko, V.A. Linde

Rostov Scientific-Research Institute of Obstetrics and Pediatrics, ul. Mechnikova, 43, Rostov-on-Don,
344012 Russia; tel.: (863)227-50-77; fax: (863) 232-57-63; e-mail: mniap@yandex.ru

Metabolism of glutamine and glutamic acid has been investigated in the placenta and amniotic fluid under conditions of placental insufficiency. The development of placental insufficiency is characterized by the increased content of glutamic acid and a decrease of glutamine in both placenta and amniotic fluid. These changes were accompanied by changes in the activity of enzymes involved in the metabolism of these amino acids. There was a decrease in glutamate dehydrogenase activity and an increase in glutaminase activity with the simultaneous decrease of glutamine synthetase activity. The compensatory decrease in the activity of glutamine keto acid aminotransferase did not prevent a decrease in the glutamine level. The impairments in the system glutamic acid-glutamine were more pronounced during the development of premature labor.

Key words: glutamic acid, glutamine, placenta, amniotic fluid, placental insufficiency.