

© Коллектив авторов

ОСТРАЯ ГИПОКСИЧЕСКАЯ ГИПОКСИЯ ПОВЫШАЕТ КОНЦЕНТРАЦИЮ ЛАКТАТА В АМНИОТИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ КРОЛЬЧИХ НА 27-28-Е СУТКИ БЕРЕМЕННОСТИ

А.В. Поповцева^{1}, Е.В. Сузопов², Ю.В. Кореновский²*

¹Федеральный центр травматологии, ортопедии и эндопротезирования,
656045, Алтайский край, Барнаул, ул. Ляпидевского, 1/3; эл. почта: popovceva@gmail.com

²Алтайский государственный медицинский университет, Барнаул

Исследовано влияние гипоксической гипоксии на концентрацию лактата, креатинина и мочевины в амниотической жидкости (АЖ) крольчих на 27-28-е сутки беременности. Крольчихи были разделены на две группы: опытную (n=9) и контрольную (n=6). Животных опытной группы помещали на 1 ч в гипоксическую камеру, содержащую 10±2% кислорода и 90±2% азота, после чего забивали и забирали амниотическую жидкость у плодов. Острая гипоксическая гипоксия не влияла на объём амниотической жидкости, но повышала в ней концентрацию лактата (в 1,4 раза), креатинина (в 1,3 раза) и мочевины (в 1,1 раза). Концентрация лактата в АЖ при гипоксической гипоксии коррелировала с концентрациями креатинина ($r=0,71$, $p<0,0001$, $n=35$) и мочевины ($r=0,81$, $p<0,0001$, $n=35$), чего не наблюдалось в контрольной группе. Полученные результаты свидетельствуют о том, что острая гипоксическая гипоксия на поздних сроках беременности вызывает изменения биохимического состава АЖ, характеризующиеся повышением концентрации лактата, источником которого может быть плод и матка.

Ключевые слова: лактат, амниотическая жидкость, гипоксия

DOI 10.18097/PBMC20176301081

ВВЕДЕНИЕ

Перинатальная асфиксия – важная причина неонатальной смертности и последующих неврологических нарушений у выживших новорождённых [1]. В результате острой интранатальной асфиксии у новорождённых наблюдаются долговременные неврологические нарушения, которые начинаются в первые дни жизни [2]. Очень важно идентифицировать высокий риск гипоксически-ишемической энцефалопатии для назначения нейропротективной терапии. Однако, большинство новорожденных с перинатальной асфиксией такую терапию не получают вследствие затруднённой диагностики этого состояния [3].

Общепринятые индикаторы (баллы по шкале Апгар, pH артериальной крови и дефицит оснований) не могут быть использованы для предсказания развития гипоксически-ишемической энцефалопатии, хотя и используются в комбинациях с другими маркерами [4]. Высокие уровни лактата в крови коррелируют с низкими pH и буферной ёмкостью (BE) и являются надёжным инструментом для оценки степени тяжести асфиксии плода [5]. Увеличение концентрации лактата после рождения является лучшим предиктором тяжёлой гипоксически-ишемической энцефалопатии [6]. Принимая во внимание, что диурез плода – основной путь формирования АЖ [7], то исследование биохимического состава АЖ может быть полезным для диагностики патологического состояния плода и/или протекания родового акта.

Уже первые минуты после рождения представляют собой наиболее критическую фазу у новорождённых и давно ведется поиск перинатальных факторов, которые обеспечивают раннюю диагностику дистресса плода. Определение лактата в амниотической жидкости

может использоваться для оценки состояния плода во время беременности и прогноза исхода родов [8].

Цель исследования: изучить влияние острой гипоксической гипоксии на концентрацию лактата в амниотической жидкости крольчих на 27-28 сутки беременности.

МЕТОДИКА

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±2% кислорода и 90±2% азота. Контроль газового состава в камере производили при помощи газоанализатора MicroLux O₂+CO₂ (ООО “Микролюкс”, Россия). Крольчих из контрольной группы помещали на 60 мин в эту же камеру, 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 извлекали амниотическую жидкость (АЖ). Общая характеристика плодов представлена в таблице 1.

* - адресат для переписки

ЛАКТАТ В АМНИОТИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ

Таблица 1. Масса плода и плаценты на 27-28 сутки жизни

	Гипоксическая гипоксия (n=35)	Контроль (n=35)	p
Масса плода, г	36,7 (28,8÷42,3)	39,6 (31,0÷44,3)	0,388
Масса плодной части плаценты, г	3,14 (2,70÷3,72)	3,47 (3,12÷3,90)	0,144

Примечание. Здесь и в таблице 2 данные представлены в виде ÷ – медиана (25-75%); p - достоверность межгрупповых различий по критерию Манна-Уитни.

Образцы АЖ центрифугировали в течение 15 мин при 1200 g, замораживали и хранили при температуре -20°C не более одного месяца до проведения биохимического исследования. В образцах АЖ определяли концентрации лактата, креатинина, мочевины.

Концентрацию лактата определяли энзиматическим, амперометрическим методом с использованием анализатора глюкозы и лактата “Biosen C line” фирмы “EKF” (Германия). Концентрацию креатинина в АЖ определяли модифицированным методом Яффе реагентами CREA Creatinine Flex reagent cartridge (“Siemens”, кат. № DA4254, США) на автоматическом биохимическом анализаторе Dimension Xpand (“Siemens”, Германия), концентрацию мочевины определяли кинетическим ферментативным (уреазным) методом реагентами фирмы “Siemens” (США) “BUN Urea Nitrogen Flex reagent cartridge” (кат. № B4309) на автоматическом биохимическом анализаторе “Dimension Xpand” (“Siemens”, Германия).

Статистическую обработку данных проводили в программе JMP 7.0 (“SAS Institute”, США). Рассчитывали медиану, 25 и 75 перцентили, достоверность межгрупповых различий по критерию Манна-Уитни, множественный корреляционный анализ по критерию Спирмена. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Настоящая работа одобрена локальным этическим комитетом Алтайского государственного медицинского университета.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Острая гипоксическая гипоксия вызывала повышение концентрации лактата, креатинина и мочевины (табл. 2). Учитывая, что единственным источником мочевины в организме плода является печень, соответственно, единственным источником мочевины в АЖ является моча плода, то причиной повышения концентрации мочевины в АЖ (в 1,1 раза) при гипоксической гипоксии при сохранении её объема является небольшое повышение продукции мочевины за счёт увеличения диуреза. Принимая во внимание, что гипоксическая гипоксия вызвала повышение концентрации лактата (в 1,4 раза) аналогичное повышение концентрации креатинина (в 1,3 раза), а также тот факт, что буферным источником энергии в матке является креатинфосфат [9-11], то при гипоксической гипоксии важным источником лактата и креатинина может быть матка.

Таблица 2. Влияние острой гипоксической гипоксии на объём амниотической жидкости, концентрацию лактата, креатинина, мочевины в амниотической жидкости крольчих на 27-28 сутки беременности

	Гипоксическая гипоксия (n=35)	Контроль (n=35)	p
Объём амниотической жидкости, мл	0,550 (0,175÷0,840)	0,380 (0,220÷0,810)	0,957
Лактат, ммоль/л	20,8 (13,4÷25,3)	15,0 (11,8÷21,1)	0,019
Креатинин, ммоль/л	0,200 (0,156÷0,231)	0,155 (0,142÷0,167)	<0,001
Мочевина, ммоль/л	7,8 (6,5÷8,7)	7,0 (6,3÷7,7)	0,012

На это также указывают результаты корреляционного анализа. Так, концентрация лактата в АЖ крольчих, подвергшихся гипоксии, коррелировала с концентрацией креатинина ($r=0,71$, $p<0,0001$, $n=35$) и мочевины ($r=0,81$, $p<0,0001$, $n=35$). При этом в контрольной группе крольчих такой корреляции не отмечено: лактат – креатинин ($r=0,16$, $p=0,338$, $n=35$) и лактат – мочевина ($r=0,14$, $p=0,418$, $n=35$). Отсюда следует, что продукция креатинина и лактата при гипоксической гипоксии повышалась синхронно, по-видимому, в результате активации анаэробных процессов в миометрии крольчих при гипоксической гипоксии, сопровождающихся распадом креатинфосфата. В поддержку этой гипотезы свидетельствует то, что клетки миометрия при гипоксии могут продуцировать лактат и выделять его во внеклеточную среду [12]. В таких анаэробных условиях, продуцируемый в процессе гликолиза пируват превращается под действием лактатдегидрогеназы в лактат. Накапливаемый лактат посредством монокарбоксилатных транспортеров [13] поступает из миометрия, оболочек плода или кровеносных сосудов в амниотическую жидкость [14]. Поэтому повышение концентрации лактата в АЖ в родах может свидетельствовать о гипоксии миометрия, например, при нерегулярных сокращениях. В то же время, одновременное определение концентрации лактата в амниотической жидкости и крови у беременных лошадей во время родов выявило взаимосвязь этих показателей с уровнем лактатемии у новорождённых жеребят [15], что указывает на возможный вклад плода в процесс накопления лактата в АЖ.

Повышенная концентрация лактата в АЖ как индикатора внутриутробной гипоксии может быть предиктором гипоксических нарушений у плода и новорождённого [16]. В исследовании на собаках показано, что самые высокие концентрации лактата в амниотической жидкости наблюдались при мертворождении, обусловленном внутриутробной гипоксией; при этом концентрации лактата в АЖ были выше в случае естественных родов (прохождение родовых путей обуславливает физиологическую гипоксию плода), чем при оперативном

родоразрешении [17]. У человека в случаях родов с патологическими результатами кардиотокографии за 30 мин до родов и неблагоприятным исходом у новорожденного, у 80% наблюдался повышенный уровень лактата в амниотической жидкости (более 10,1 ммоль/л) [18]. В связи с этим для диагностики гипоксии плода в родах разработана экспресс-методика определения концентрации лактата в АЖ [19]. Исследования, проведенные в нашей лаборатории, показали достаточную согласованность результатов определения концентрации лактата в АЖ с референсным методом [20]. Однако, клинические данные указывают на недостаточную связь между степенью гипоксии плода и накоплением лактата в АЖ, поскольку матка может быть важным и, возможно, главным источником лактата в АЖ. На это также указывает, что большее диагностическое значение имеет не абсолютная концентрация лактата, а отношение концентрации лактата к концентрации креатинина [21]. Однако, даже в таких условиях связь между гипоксией плода и концентрацией лактата в АЖ остаётся не прямой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Определение концентрации лактата в амниотической жидкости может дать возможность мониторировать метаболический статус матки и плода в течение родов, поскольку высокие концентрации лактата свидетельствуют о нарушениях сократимости матки и гипоксии плода. В настоящем исследовании с использованием экспериментальной модели перинатальной гипоксии плода мы выявили повышение концентрации лактата в АЖ в условиях гипоксической гипоксии. Учитывая равновеликое повышение концентрации креатинина и лактата в АЖ, можно полагать, что источником лактата в АЖ в равной степени является плод и матка. Поскольку лактат в АЖ может иметь как плодное, так и маточное происхождение, то простое определение его в АЖ нельзя использовать для диагностики гипоксии плода. Для дифференцировки источника лактата в АЖ требуются дополнительные исследования с использованием биомаркеров, специфичных для матки и/или плода.

ЛИТЕРАТУРА

1. Beken S., Aydin B., Dilli D., Erol S., Zenciroğlu A., Okumuş N. (2014) Turk. J. Pediatr., **56**, 62-68.
2. Huang C.C., Wang S.T., Chang Y.C., Lin K.P., Wu P.L. (1999) N. Engl. J. Med., **341**, 328-335.
3. Groppetti D., Martino P.A., Ravasio G., Bronzo V., Pecile A. (2015) Vet. J., **206**, 423-425.
4. Wiberg-Itzel E., Åkerud H., Andolf E., Hellström-Westas L., Winbladh B., Wennerholm U.B. (2011) Obstet. Gynecol., **118**, 135-142.
5. Lv H., Wang Q., Wu S., Yang L., Ren P., Yang Y., Gao J., Li L. (2015) Clin. Chim. Acta., **450**, 282-297.
6. Varkilova L., Slancheva B., Emilova Z., Nikolov A., Metodieva V., Hitrova S., Doicheva E. (2013) Akush. Ginekol., **52**(3), 36-43.
7. Brace R.A., Cheung C.Y. (2014) Adv. Exp. Med. Biol., **814**, 49-68.
8. Groppetti D., Pecile A., Del Carro A.P., Copley K., Minero M., Cremonesi F. (2010) Theriogenology, **74**, 1187-1196.
9. Satin A.J., Hankins G.D., Patterson W.R., Scott R.T. (1992) Am. J. Perinatol., **9**, 456-459.
10. Payne R.M., Friedman D.L., Grant J.W., Perryman M.B., Strauss A.W. (1993) Am. J. Physiol., **265**, 624-635.
11. Leiserowitz G.S., Evans A.T., Samuels S.J., Omand K., Kost G.J. (1992) J. Reprod. Med., **37**(11), 910-916.
12. Åkerud H., Ronquist G., Wiberg-Itzel E. (2009) Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., **297**, 1414-1419.
13. Halestrap A.P. (2013) Compr. Physiol., **3**(4), 1611-1643.
14. Arrowsmith S., Kendrick A., Hanley J.A., Noble K., Wray S. (2014) Exp. Physiol., **99**(3), 495-502.
15. Pirrone A., Mariella J., Gentilini F., Castagnetti C. (2012) Theriogenology, **78**, 1182-1189.
16. Wiberg-Itzel E., Pembe A., Hoesli I., Wihlbäck A.-C., Darj E., Wray S., Åkerud H. (2013) Acta. Obstet. Gynecol. Scand., **93**, 80-85.
17. Groppetti D., Martino P.A., Ravasio G., Bronzo V., Pecile A. (2015) Vet. J., **206**(3), 423-425.
18. Wiberg-Itzel E., Åkerud H., Andolf E., Hellstrom-Westas L., Winbladh B., Wennerholm U.-B. (2011) Obstet. Gynecol., **118**, 135-142.
19. Hall B., Iwasenko J., Moriatis M., Rawlinson W.D., Tracy M.B., Tracy S.K. (2013) BMC Res. Notes, **6**, 112.
20. Поповцева А.В., Кореновский Ю.В., Наумова В.В., Изумова М.Б. (2016) Клин. лаб. диагностика, **61**(9), 595-596.
21. Torrance H.L., Pistorius L., Voorbij H.A., Visser G.H. (2013) J. Matern. Fetal Neonatal Med., **26**(7), 728-730.

Поступила: 07. 11. 2016.
Принята к печати: 25. 01. 2017.

**ACUTE HYPOXIC HYPOXIA INCREASES LACTATE CONCENTRATION
IN AMNIOTIC FLUID OF RABBITS ON 27-28th DAY OF PREGNANCY**

A.V. Popovtseva¹, E.V. Suzopov², Yu.V. Korenovsky²

¹Federal Centre of Traumatology, Orthopedics and Endoprosthesis Replacement,
1/3 Lyapidevsky str., Barnaul, Altai Region, 656045 Russia; e-mail: popovtseva@gmail.com

²Altai State Medical University, Barnaul, Altai Region, Russia

We evaluated the influence of hypoxic hypoxia on lactate, creatinine and urea concentrations in the amniotic fluid (AF) of rabbits on 27-28th day of pregnancy. Rabbits were randomly subdivided into two groups: experimental (n=9) and control (n=6). Rabbits of experimental groups were placed in a hypoxic chamber containing 10±2% oxygen and 90±2% nitrogen for 1 h and then were euthanized, AF was extracted from the amniotic sacs via disposable syringe. Acute hypoxic hypoxia had no effect on the AF volume, increased (1.4-fold) lactate, (1.3-fold) creatinine and (1.1-fold) urea concentrations in AF. In contrast to animals of the control group, lactate concentration in the groups with hypoxic hypoxia correlated with the creatinine ($r=0.71$, $p<0.0001$, $n=35$) and urea concentrations in the AF ($r=0.81$, $p<0.0001$, $n=35$). These results suggest that acute hypoxic hypoxia in late pregnancy causes changes in the biochemical composition of AF; these changes are characterized by high lactate concentrations, and the fetus and uterus can be the source of increased lactate level in AF.

Key words: lactate, amniotic fluid, hypoxia