

УДК 618.346.-008.8+616-037

ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ L-АРГИНИНА И L-ПРОЛИНА В ОКОЛОПЛОДНЫХ ВОДАХ ПРИ ЗАДЕРЖКЕ РОСТА ПЛОДА

© 2011 г. И.И. Крукиер¹, Е.В. Нарежная², В.В. Авруцкая¹, А.А. Никашина¹

¹Ростовский научно-исследовательский институт
акушерства и педиатрии,
ул. Мечникова, 43, г. Ростов н/Д, 344012,
biochem@rniir.ru

²Южный федеральный университет,
ул. Р. Зорге, 7, г. Ростов н/Д, 344058

¹Rostov Scientific Research Institute
of Obstetrics and Pediatrics
Mechnikov St., 43, Rostov-on-Don, 344012,
biochem@rniir.ru

²Southern Federal University,
R. Zorge, St., 7, Rostov-on-Don, 344058

Проведено сравнительное изучение уровня аминокислот (L-аргинина и L-пролина) в околоплодных водах женщин при физиологической и осложненной беременности. Сопоставление характера изменений в содержании вышеуказанных аминокислот в околоплодных водах женщин с осложненной беременностью позволило установить их участие в формировании синдрома задержки внутриутробного плода. Показано, что определение уровня L-аргинина и L-пролина в амниотической жидкости может быть использовано в качестве дополнительного критерия для оценки состояния плода.

Ключевые слова: L-аргинин, L-пролин, задержка роста плода, околоплодные воды, оксид азота, капиллярный электрофорез, плацентарная недостаточность.

A comparative research was carried out to determine the level amino acids (L-arginine, L-proline) in amniotic fluid of physiological and complicated pregnancy. Changes of these amino acids show that they make a great influence on fetus status. It has been suggested that amino acids in amniotic fluid may be used an additional criterion to estimate fetus status.

Keywords: L-arginine, L-proline, intrauterine growth restriction, amniotic fluid, nitric oxide, capillary electrophoresis, placental insufficiency.

В последние годы исследования, направленные на изучение механизмов формирования основных видов акушерской патологии, позволили по-новому взглянуть на ряд вопросов, требующих безотлагательного ответа [1, 2].

Несмотря на ряд достижений в акушерстве и перинатологии, основными из которых являются снижение материнской и перинатальной заболеваемости и смертности, отмечена постоянная тенденция к увеличению числа врожденных заболеваний, прежде всего у матерей с отягощенным акушерско-гинекологическим и соматическим анамнезом, а также осложненным течением беременности [3].

Согласно данным ВОЗ, в мире ежегодно рождается около 21 млн детей, имеющих малую массу тела. При этом, если в развитых странах только меньшая часть из них (1/3–1/4) является отстающими в развитии, то в развивающихся странах таких детей большинство [4].

Неослабевающий интерес к такому серьезному осложнению беременности, как задержка роста плода (ЗРП), со стороны акушеров-гинекологов связан с высокой перинатальной заболеваемостью и смертностью новорожденных, неблагоприятным течением адаптационного периода в первые дни жизни [2]. Частота этого осложнения беременности по данным ряда авторов колеблется от 4,5 до 39 %, занимая в структу-

ре причин перинатальной заболеваемости и смертности третье место [5].

ЗРП представляет весьма важную проблему не только для современного акушерства, но и для ряда других специальностей, поскольку события, связанные с развитием внутриутробного плода, заявляют о себе спустя десятки лет. В последующем эти дети отстают в физическом и интеллектуальном развитии значительно чаще, чем доношенные и недоношенные, имеющие массу, нормальную для своего гестационного срока [6]. Эти дети в большинстве случаев требуют повышенного внимания педиатров, невропатологов, психоневрологов и других специалистов. Их воспитание и лечение представляют существенную проблему для общества и семьи, требующую немалых моральных и финансовых затрат. У этих детей, кроме задержки физического развития, отмечаются также особенности становления многих органов и систем. Так, частота неврологических нарушений, по данным различных исследователей, варьирует от 10 до 45 % [7]. Лечебные мероприятия при диагностируемой, как правило, в конце II-III триместров беременности задержке развития плода крайне не эффективны и направлены не на её преодоление, а лишь на пролонгирование беременности. В связи с этим актуальным представляется выяснение ранних диагностических маркеров данного осложнения беременности с целью проведения своевременных лечебных мероприятий.

Одним из достижений современного акушерства явилась возможность взятия и анализа околоплодных вод в разные сроки беременности для получения информации о состоянии внутриутробного плода.

Имеющиеся данные о функциональной взаимозависимости между состоянием плода и составом амниотической жидкости свидетельствуют о важной диагностической ценности изучения этой биологической среды как в теоретических, так и в практических целях.

Определенное значение в диагностике состояния внутриутробного плода имеет исследование оптической плотности околоплодных вод (для диагностики зрелости плода). Возможно прогнозирование срока созревания легких плода по визуальному помутнению амниотической жидкости. Определение объема околоплодных вод имеет также большое значение в диагностике состояния внутриутробного плода. Измененное количество околоплодных вод характерно для плацентарной недостаточности. Выявлена зависимость между этим параметром и патологией беременности: гестозом, гипотрофией плода, врожденными аномалиями развития. Известно, что маловодие является неблагоприятным прогностическим признаком и весьма часто сопровождается синдромом задержки развития плода, хотя и не считается специфическим его признаком [8].

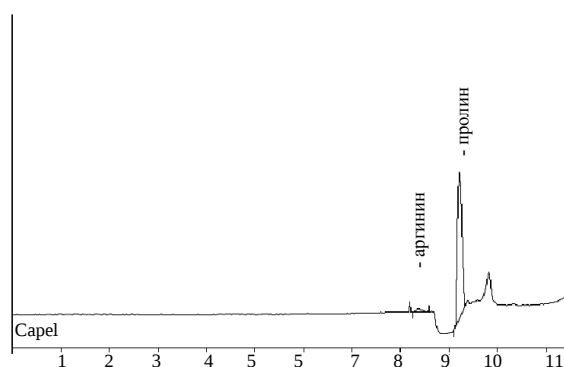
Спектр амниотической жидкости достаточно разнообразен, но одним из значимых её компонентов являются свободные аминокислоты, которые выполняют жизненно важную для организма роль строительного материала в биосинтезе специфических тканевых белков, ферментов и т.д. При осложненной беременности свободные аминокислоты эффективно используются плодом в качестве пластического материала.

В связи с вышеуказанной целью работы явилась разработка новых методов прогнозирования задержки роста плода, которые будут способствовать её профилактике и проведению своевременной терапии.

Обследовано 70 женщин, из которых 45 с неосложнённым течением беременности составили первую группу (контрольную) и 25 с плацентарной недостаточностью – вторую (основную группу). У всех беременных второй группы была установлена задержка роста плода. Диагноз ЗРП и плацентарной недостаточности основывался на данных ультразвуковой фето- и плацентометрии, доплерометрии, кардиотокографии, гормональных исследованиях и определении активности специфических плацентарных изоферментов щелочной фосфатазы и глутаматдегидрогеназы.

Идентификацию и количественное определение свободных форм аргинина и пролина в околоплодных водах, полученных в асептических условиях трансабдоминальным доступом в сроки 16–22 недели, осуществляли методом капиллярного электрофореза с использованием не модифицированного кварцевого капилляра с внешней полиамидной пленкой общей длиной 60 см и внутренним диаметром 75 мкм. Перед началом работы капилляр последовательно промывали 1 М раствором соляной кислоты, дистиллированной водой, 0,5 М раствором гидроксида натрия и буферным раствором (20 мМ боратный буфер, pH–9,15). Время ввода пробы: 15 с при давлении 30 мбар. Температура определения – 30 °С. Прямое спектрофотометрическое детектирование при 200 нм.

Перед проведением анализа образцы амниотической жидкости обрабатывали 10%-м раствором трихлоруксусной кислоты с целью депротеинизации, далее пробы центрифугировали в течение 15 мин при 5500 об/с. Полученный надосадочный раствор использовали для проведения анализа. Пример электрограммы представлен на рисунке.



Электрофореграмма определения свободных форм L-аргинина и L-пролина в амниотической жидкости

Исследования проводили на аппарате («Капель-105», «Люмэкс», С-Петербург, Россия). Сбор и обсчет данных выполняли при помощи IBM PC с программным обеспечением «Мультихром» (АО «Амперсэнд») [9].

Эндогенный уровень оксида азота в форме нитрита (NO_2^-) после энзиматического восстановления нитратов в нитриты определяли с помощью классической реакции Грисса и обозначали как NO_x .

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием лицензионного пакета программ Statistica (версия 5.1, фирмы StatSoft Inc.). Однородность дисперсий проверяли по критерию Фишера. Достоверность различий между сравниваемыми показателями определяли по критерию Стьюдента и его аналогу для непараметрических распределений – критерию Манна–Уитни. Результаты оценивали как статистически значимые при $p < 0,05$.

Результаты исследований, представленные в таблице, свидетельствуют о существенных изменениях в уровне свободных аминокислот (аргинина и пролина) в околоплодных водах, полученных у женщин основной группы.

Содержание оксида азота, мкмоль/л, L-аргинина и L-пролина, мкг/мл, в околоплодных водах женщин при физиологической и осложненной беременности ($M \pm m$)

Группа	Оксид азота (NO_x)	Аргинин	Пролин
1-я	$0,94 \pm 0,6$	$30,2 \pm 2,6$	$24,2 \pm 1,8$
2-я	$2,13 \pm 1,06^*$	$65,6 \pm 3,4^*$	$9,8 \pm 1,3^*$

* – достоверность различий с показателями при физиологической беременности.

Уровень пролина у женщин с ЗРП снижен в 2,4 раза ($p < 0,01$), а содержание аргинина увеличено в 2 раза ($p < 0,05$) по сравнению с данными у пациенток контрольной группы. Также повышен и уровень оксида азота (в 2,3 раза, $p < 0,01$), субстратом которого является аргинин.

Одной из причин такого дисбаланса в концентрации изученных аминокислот может быть нарушение плацентарной продукции и/или модификация их трансплацентарного перехода в околоплодную среду.

Аргинин – не только предшественник и активатор синтеза оксида азота, но и важный регулятор многих физиологических и биохимических процессов [10], он также участвует в коммуникации между нервными клетками [11]. Являясь условно незаменимой кислотой для взрослых и незаменимой для новорожденных и детей, аргинин достаточно эффективно стимулирует продукцию соматотропного гормона гипофиза (гормона роста) и позволяет поддерживать его концентрацию на верхних границах нормы, а недостаток аргинина приводит к замедлению роста детей [12]. Кроме того, гормон роста в детстве и юности обеспечивает рост и развитие организма, а в зрелом возрасте поддерживает все жизненно важные функции и препятствует процессу старения [13, 14].

В свою очередь пролин наряду с другими аминокислотами является строительным материалом клеточных белков и входит в состав основного белка соединительной ткани – коллагена, который в высоких концентрациях содержится в мышечной и костной тканях [15].

Можно полагать, что повышение содержания аргинина и увеличение продукции оксида азота носит компенсаторный характер и способствует поддержанию плодово-плацентарной гемодинамики за счет уменьшения спазма сосудов и усиления кровотока в условиях внутриутробной гипоксии, имеющей место

у женщин с ЗРП. С другой стороны, снижение уровня пролина, очевидно, является проявлением дезадаптации и одной из причин развития этой патологии.

Было проанализировано состояние 25 новорожденных основной группы, развивающихся в условиях плацентарной недостаточности, у которых отмечена внутриутробная гипотрофия плода (оценка по шкале Апгар при рождении 7–9 баллов). Среди родившихся детей у женщин этой группы выраженная гипотрофия имела место именно в тех случаях, при которых наблюдались максимальные изменения в содержании аргинина и пролина. Сопоставление выраженности выявленных метаболических изменений в околоплодных водах с клиническим состоянием новорожденных подтвердило их взаимосвязь, особенно выраженную при задержке роста плода.

Приведенные данные свидетельствуют о важности сохранения баланса в уровне изученных аминокислот для нормального функционирования фетоплацентарной системы. Изменение состава околоплодных вод в процессе физиологической и осложненной гестации, являясь отражением биохимической ситуации в системе мать–плацента–плод, в свою очередь влияет на развитие плода, определяя характер параплацентарного обмена.

Таким образом, беременность, осложненная плацентарной недостаточностью с задержкой роста плода, развивается на фоне измененной продукции свободных аминокислот. Следствием этих нарушений может явиться усиление внутриутробной гипоксии, приводящей к различным пренатальным повреждениям плода и последующим отклонениям в развитии новорожденного.

Анализ модификации продукции L-аргинина и L-пролина позволил использовать их определение в качестве информативного теста ранней диагностики задержки роста плода, так как выявленные нарушения проявляются ещё на доклинической стадии, задолго до клинической манифестации этого акушерского осложнения.

Литература

1. Курцер М. А. Перинатальная смертность и пути ее снижения: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 2001. 36 с.
2. Некоторые актуальные вопросы акушерства / Г.М. Савельева [и др.] // Акушерство и гинекология. 2006. № 3. С. 3–7.
3. Berger R., Garnier Y. Perinatal brain injury // J. Perinat. Med. 2000. Vol. 28, № 4. P. 261–285.
4. Benson W.E., Morse P.N. The prognosis of retinal detachment due to lattice degeneration // Ann. Ophthalmol. 1978. Vol. 10, № 9. P. 1197–1200.
5. Бунин А.Т., Федорова М.В. Синдром задержки развития плода: патогенез, клиника, диагностика, лечение // Акушерство и гинекология. 1998. № 7. С. 4–78.
6. Системные нарушения гемодинамики при СЗРП как фактор риска гипоксически-ишемических поражений ЦНС и отклонений психомоторного развития детей / А.Н. Стрижаков [и др.] // Акушерство и гинекология. 2003. № 1. С. 11–16.
7. Michelsson K., Noronen M. Neurological, psychological and articular impairment in five-old children with a birth weight of 2000 g or less // Eur. J. Pediatr. 1983. Vol. 141. P. 96–100.

8. Околоплодные воды. Химический состав и биологические функции / В.И. Орлов [и др.]. Ростов н/Д., 2009. 224 с.
9. Determination of L-arginine in amniotic fluid by capillary zone electrophoresis / E.V. Narezhnaya [et al.] // J. of Analytical Chemistry. 2010. Vol. 65, № 12. P. 1280–1283.
10. Hanaoka C., Asai T. Dynamics of free amino acid in human amniotic fluid // Acta Obstet. Gynec. Jap. 1989. Vol. 131, № 2. P. 226.
11. Дмитриенко Н.П., Кишко Т.О., Шандаренко С.Г. Аргинин: биологическое действие, влияние на синтез оксида азота // Укр. химиотерапевт. журн. 2008. № 1. С. 137–140.
12. Определение аминокислот в препарате «Элтацин» / М.Г. Чернобровкин [и др.] // Фармация. 2004. Т. 53, № 5. С. 18–20.
13. Эффекты L-аргинина при церебрально-спинальном болевом синдроме / Е.И. Данилова [и др.] // Бюл. эксперим. биол. и мед. 1999. № 2. С. 160–163.
14. Каменский А.А., Савельева К.В. Оксид азота и поведение. М., 2002. 156 с.
15. Фомина А.С. Влияние уровня экспрессии генов пути биосинтеза L-пролина и генов центральных путей метаболизма на продукцию L-пролина клетками *Escherichia coli*: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2005. 24 с.

Поступила в редакцию

15 ноября 2010 г.
