

© Е.В.Сузопов, И.А.Лытарь, А.В.Поповцева, Ю.В.Кореновский, 2017
УДК [618.2/3-003.266]: 541.132-092.4

Е.В. Сузопов, И.А. Лытарь, А.В. Поповцева, Ю.В. Кореновский

РЕФЕРЕНТНЫЕ ПРЕДЕЛЫ КОНЦЕНТРАЦИИ ЭЛЕКТРОЛИТОВ В АМНИОТИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ КРОЛЬЧИХ НА СРОКЕ 27–28 СУТ БЕРЕМЕННОСТИ

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

E.V. Suzopov, I.A. Lytar', A.V. Popovtceva, Y.V. Korenovskii`

ELECTROLYTES CONCENTRATION REFERENCE LIMITS IN AMNIOTIC FLUID OF RABBITS ON 27-28 DAY OF GESTATION

Altai State Medical University

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ: определить референтные пределы объема, осмоляльности и концентрации ионов Na^+ , K^+ , Cl^- , неорганического фосфата (P_i) и Ca^{2+} в амниотической жидкости (АЖ) крольчих на сроке беременности 27–28 сут. **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.** В исследовании на первобеременных крольчихах ($n = 6$) получены 37 образцов АЖ, в которых определены масса плода, масса плодной части плаценты, объем, осмоляльность и концентрации ионов Na^+ , K^+ , Cl^- , P_i и Ca^{2+} . **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Установлены референтные пределы объема (0,09–1,63 мл), осмоляльности (210,0–267,0, мОсмоль/кг) и концентрации ионов Na^+ (110,0–146,0 ммоль/л), K^+ (6,0–12,4 ммоль/л), Cl^- (87,0–117,0 ммоль/л), Ca^{2+} (1,88–2,89 ммоль/л) и P_i (0,56–1,57 ммоль/л) в АЖ. Обнаружена обратная корреляция объема АЖ с массой плода ($r = -0,525$, $p < 0,001$), а также положительная корреляция между массой плода и осмоляльностью АЖ ($r = 0,375$, $p = 0,022$). Концентрации ионов Na^+ , K^+ , Cl^- коррелировали с массой плаценты ($r = 0,368$, $p = 0,025$; $r = 0,353$, $p = 0,032$; $r = 0,381$, $p = 0,020$ соответственно). Осмоляльность АЖ коррелировала с концентрациями ионов Na^+ ($r = 0,514$, $p < 0,001$) и Cl^- ($r = 0,510$, $p < 0,001$). **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Полученные результаты могут быть использованы для разработки животных моделей влияния лекарственных препаратов на объем, осмоляльность и ионный состав АЖ на поздних сроках беременности

Ключевые слова: амниотическая жидкость, беременность, кролики, плод, электролиты, осмоляльность.

ABSTRACT

THE AIM: to determine reference limits of volume, osmolality and concentration of Na^+ , K^+ , Cl^- , non-organic phosphate (P_i), and Ca^{2+} in amniotic fluid (AF) of rabbits on 27-28 day of gestation. **MATERIALS AND METHODS:** during research on first-pregnant rabbits ($n=6$), received 37 samples of AF, determined fetal mass, fetal part of placenta mass, volume, osmolality and concentration of Na^+ , K^+ , Cl^- , P_i and Ca^{2+} . **RESULTS:** obtained reference limits of volume (0,09–1,63 ml), osmolality (210,0–267,0, mOsmol/kg), concentration of ions Na^+ (110,0–146,0 mmol/l), K^+ (6,0–12,4 mmol/l), Cl^- (87,0–117,0 mmol/l), Ca^{2+} (1,88–2,89 mmol/l) and P_i (0,56–1,57 mmol/l) in AF. Reverse correlation of AF volume with fetus mass ($r = -0,525$, $p < 0,001$) and positive correlation between fetus mass and AF osmolality ($r = 0,375$, $p = 0,022$) were determined. Concentrations of Na^+ , K^+ , Cl^- are correlated with placenta mass ($r = 0,368$, $p = 0,025$; $r = 0,353$, $p = 0,032$; $r = 0,381$, $p = 0,020$, respectively). AF osmolality correlated with concentrations of Na^+ ($r = 0,514$, $p < 0,001$) and Cl^- ($r = 0,510$, $p < 0,001$). **CONCLUSION:** results could be used for developing animal models of medicamental influence on AF volume, osmolality and ion composition on late gestation.

Key words: amniotic fluid, gestation, rabbits, fetus, electrolytes, osmolality.

ВВЕДЕНИЕ

В физиологической регуляции объема амниотической жидкости (АЖ) и ее состава многое остается неясным, что связано с двумя факторами: 1) существует восемь потенциальных путей

формирования и оттока АЖ (моча плода, интрамембранный путь, заглатывание, секрет легких, секрет носоглотки, трансмембранный и чрескожный пути, а также перенос через поверхность пуповины); 2) скорость перехода воды и растворенных веществ через большинство из этих путей редко измеряется одновременно [1]. Без знания нормальных значений концентрации ионов в АЖ, ее объема и осмоляльности у животных невоз-

Кореновский Ю.В. 656038, Алтайский край, г. Барнаул, пр. Ленина, д. 40, Алтайский государственный медицинский университет, кафедра биохимии и клинической лабораторной диагностики. Тел.: +7(3852)24-13-09; E-mail: timidin@gmail.com

можно создание модели для изучения патологии регуляции объема АЖ и фармакокинетики лекарственных препаратов на поздних сроках беременности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на первобеременных крольчихах ($n = 6$) массой 4–5 кг на сроке беременности 27–28 сут (при нормальной длительности беременности у кроликов 31 сут). Оплодотворение проводили разными случайно выбранными самцами, после чего крольчихи находились в одиночных клетках на свободном питании. На 27–28-е сутки беременности животных умерщвляли методом цервикальной дислокации и через 15 мин проводили срединную лапаротомию и удаляли матку. Из полости матки высекали и извлекали амниотические мешки с плодами ($n = 75$) и разделяли материнскую и плодную части плаценты, не нарушая целостности амниотического мешка. Одноразовым шприцем из амниотического мешка извлекался весь доступный объем амниотической жидкости. Измерялись масса плода, плодной части плаценты и общий объем амниотической жидкости.

Критериями включения крольчих в исследование были: 1) срок беременности 27–28 сут; 2) масса беременных крольчих 4–5 кг. Критериями исключения плодов из исследования были: 1) масса плода менее 20 г; 2) объем амниотической жидкости в амниотическом мешке менее 50 мкл; 3) наличие в амниотической жидкости визуально выявляемой крови (табл. 1). Общая характеристика плодов представлена в табл. 2. Как видно из представленных данных, только в двух третях наблюдений удалось получить достаточный для исследования объем амниотической жидкости пригодного для исследования качества.

Образцы амниотической жидкости 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 амниотической жидкости определяли концентрации ионов Na^+ , K^+ , Cl^- , неорганического фосфата (P_i) и Ca^{2+} , а также осмоляльность амниотической жидкости.

Таблица 1

Критерии исключения плодов кроликов из исследования

Критерий исключения	n (%)
Масса плода менее 20 г	7 (12,5)
Объем амниотической жидкости менее 50 мкл	8 (14,3)
Наличие в АЖ крови	4 (7,1)
Всего	19 (33,9)

Концентрации ионов Na^+ , K^+ и Cl^- определяли потенциометрическим методом на автоматическом биохимическом анализаторе «Dimension Xpand» («Siemens», Германия) с использованием модуля «QuikLyte Integrate Multisensor» («Siemens», США). Общую концентрацию ионов Ca^{2+} определяли колориметрическим методом набором реагентов «CA Calcium Flex reagent cartridge» (кат. № EA4164) («Siemens», США) на автоматическом биохимическом анализаторе «Dimension Xpand» («Siemens», Германия). Концентрацию P_i , который при физиологических значениях pH представляет собой смесь ионов HPO_4^{2-} и H_2PO_4^- , определяли колориметрическим методом набором реагентов «PHOS Phosphorus Flex reagent cartridge» (кат. № EA 4172) («Siemens», США) на автоматическом биохимическом анализаторе «Dimension Xpand» («Siemens», Германия). Осмоляльность амниотической жидкости определяли по принципу измерения давления паров при помощи осмометра «Vapro» («Wescor», США).

Статистический анализ данных проводили с использованием пакета прикладных статистических программ JMP 7.0 (SAS Institute, США). Рассчитывали среднее, стандартное квадратическое отклонение, ошибку среднего, нормальность распределения по критерию Шапиро – Уилка). Выполняли множественный корреляционный анализ с использованием коэффициента Пирсона при нормальном распределении или по коэффициенту Спирмена – при ненормальном распределении. Для определения референтных величин концентраций компонентов амниотической жидкости рассчитывали 2,5-й и 97,5-й процентиля [2]. Нулевую статистическую гипотезу об отсутствии различий и связей отвергали при $p < 0,05$.

Настоящая работа одобрена локальным эти-

Таблица 2

Масса плода и плаценты крольчат на 27–28-е сутки жизни ($n = 37$)

Масса, г	Среднее \pm стандартное квадратическое отклонение	Медиана (25–75%)	2,5–97,5%	Нормальность распределения по критерию Шапиро–Уилка
Плода	36,7 \pm 6,56	39,0 (31,0–41,9)	24,3–45,5	W = 0,906 p = 0,004
Плаценты	3,99 \pm 2,014	3,47 (3,07–4,07)	2,48–10,79	W = 0,580 p < 0,001

ческим комитетом ГБОУ ВПО АГМУ Минздрава России.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты исследования объема АЖ, а также концентрации ионов в АЖ и ее осмоляльности представлены в табл. 3. Из исследованных неорганических ионов в АЖ максимальная концентрация регистрировалась у ионов Na^+ и Cl^- , а минимальная – у ионов P_i и Ca^{2+} .

Объем амниотической жидкости обратно коррелировал с массой плода ($r = -0,525$, $p < 0,001$), что подтверждает многочисленные свидетельства уменьшения объема АЖ перед родами [3]. На активацию процессов сохранения воды перед родами также указывает корреляция осмоляльности АЖ с массой плода ($r = 0,375$, $p = 0,022$).

Концентрация ионов Na^+ , K^+ , Cl^- , но не ионов Ca^{2+} или P_i коррелировала с массой плаценты ($r = 0,368$, $p = 0,025$; $r = 0,353$, $p = 0,032$; $r = 0,381$, $p = 0,020$; $r = -0,003$, $p = 0,987$ и $r = 0,079$, $p = 0,642$ соответственно), что свидетельствует о важности ее нормальной функции в переносе ионов Na^+ , K^+ , Cl^- для водно-солевого баланса плода, а отсутствие корреляционной связи между массой плаценты и концентрациями ионов Ca^{2+} или P_i в АЖ указывает на большее значение плода в регуляции экскреции этих ионов.

Осмоляльность АЖ в значительной степени определялась концентрациями ионов Na^+ и Cl^- и в меньшей степени концентрацией ионов K^+ . На это указывает мощная корреляционная связь между осмоляльностью АЖ и концентрациями ионов Na^+ и Cl^- и менее значимая связь осмоляльности с концентрацией ионов K^+ : $r = 0,514$, $p < 0,001$, $r = 0,510$, $p < 0,001$ и $r = 0,316$, $p = 0,057$ соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ

АЖ отражает гомеостаз как плодов, так и материнского организма [4–6]. Определение нормальных биохимических параметров АЖ необходимо для изучения регуляции ее ионного состава, объема и механизма образования, что позволит разработать действующую модель для исследования фармакокинетики лекарственных препаратов в беременных организмах.

В регуляции объема и состава АЖ участвуют несколько механизмов: диурез плода, интрамембранный путь, заглатывание, секреция легкими и носоглоткой, трансмембранный путь, чрескожный путь и всасывание через эпителий пуповины [1]. Следует учитывать, что в конце беременности, когда проводилось исследование, кожа плода кератинизирована [1], вследствие чего чрескожный и пуповинный путь возможно не учитывать. 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.

Моча плода – основной путь формирования АЖ. Доказано, что объем АЖ и скорость тока мочи плода коррелируют друг с другом [7]. По-видимому, моча является источником для большинства ионов (Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} и P_i) АЖ, поскольку образует приблизительно три четверти ее объема [1].

Секрет легких – другой важный путь формирования АЖ. Его наличие доказывается наличием сурфактанта в АЖ в конце беременности [8]. Однако установить истинный вклад секрета легких затруднительно, так как его большая часть еще до выхода в АЖ заглатывается [9]. Объем секрета

Таблица 3

Ионный состав и осмоляльность амниотической жидкости (n = 37)

Параметр	Среднее \pm стандартное квадратическое отклонение	Медиана (25–75%)	2,5–97,5%	Нормальность распределения по W-критерию Шапиро–Уилка
Объем амниотической жидкости, мл	0,57 \pm 0,400	0,46 (0,25–0,77)	0,09–1,63	W = 0,859 p < 0,001
Na^+ , ммоль/л	132,1 \pm 6,39	132,0 (129,0–135,3)	110,0–146,0	W = 0,927 p = 0,018
K^+ , ммоль/л	7,9 \pm 1,54	7,4 (6,7 – 8,9)	6,0–12,4	W = 0,910 p = 0,006
Cl^- , ммоль/л	103,4 \pm 5,62	102,0 (100,6–106,0)	87,0–117,0	W = 0,914 p = 0,007
Ca^{2+} , ммоль/л	2,19 \pm 0,209	2,13 (2,05–2,30)	1,88–2,89	W = 0,879 p < 0,001
P_i , ммоль/л	0,97 \pm 0,231	1,00 (0,79–1,10)	0,56–1,57	W = 0,945 p = 0,069
Осмоляльность, мОсмоль/кг	236,3 \pm 15,52	237,0 (223,0–245,3)	210,0–267,0	W = 0,971 p = 0,447

легких составляет около четверти всей производимой АЖ [1].

Секрет носоглотки также является путем формирования АЖ, однако на практике отследить его динамику еще более затруднительно, так как выделения носоглотки проглатываются полностью, и отличить их от секрета легких можно только большим содержанием K^+ и слизи [10].

Интрамембранное всасывание – переход воды и растворенных веществ через амнион в сосуды плода. Интрамембранный путь имеет два компонента: пассивный и активный [11]. Пассивный компонент – двунаправленный, постоянный и соответствует простой диффузии по градиенту концентрации. В обычных условиях пассивный компонент характеризуется притоком жидкости в плод и секрецией ионов Na^+ и Cl^- из плода в АЖ [12]. Активный компонент является однонаправленным и является основным путем оттока АЖ [13, 14]. Интрамембранное всасывание обеспечивает около двух третей оттока АЖ [1].

Заглатывание АЖ плодом также является значимым путем удаления АЖ из амниотического мешка. Заглатывание обычно вызвано ответом плода на изменение объема АЖ, т.е. ответной реакцией ЦНС [15]. При увеличении объема АЖ объем заглатываемой АЖ также возрастает, а при маловодии – уменьшается [16]. Заглатывание обеспечивает около трети оттока АЖ [1].

Трансмембранный путь в конце беременности представлен в небольшом объеме, однако важен в начале гестации, так как проникаемый хорион позволяет жидкости, вырабатываемой стенкой матки, проникнуть в плодное яйцо [1]. Увеличение осмоляльности АЖ ведет к ее всасыванию в организм матери, но в небольших объемах, настолько низких по сравнению с другими потоками, что этот путь в конце беременности возможно не учитывать.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Среди описанных путей образования и удаления АЖ перед родами наибольшее значение имеет образование АЖ из компонентов мочи и секрета легких плода, а удаление – с использованием интрамембранного пути оттока и заглатывания АЖ. Полученные результаты нормальных концентраций исследованных ионов в АЖ, а также ее объема и осмоляльности являются следствием функционирования представленных путей формирования и оттока АЖ. Эти данные могут быть использованы для разработки животных моделей влияния лекарственных препаратов (в частности,

диуретиков) на объем, осмоляльность и ионный состав АЖ на поздних сроках беременности.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Brace RA, Cheung CY. Regulation of amniotic fluid volume: evolving concepts *Adv Exp Med Biol* 2014;814:49-68. DOI: 10.1007/978-1-4939-1031-1_5
2. Khan MI, Weinstock RS. (2011) in: *Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods*. – 22nd ed. (McPherson R.A., Pincus M.R.) Elsevier Saunders, Philadelphia, p. 224. DOI: 10.1016/b978-1-4377-0974-2.00016-6
3. Brace RA. Physiology of amniotic fluid volume regulation. *Clin Obstet Gynecol* 1997; 40(2):280–289. DOI: 10.1097/00003081-199706000-00005
4. Кореновский ЮВ, Калитникова ИА, Бурякова СИ и др. Регуляция объема амниотической жидкости. *Акуш и гин* 2016;(2):44–48. [Korenovsky YV, Kalitnikova IA, Buryakova SI et al. Amniotic fluid volume regulation. *Akush Ginekol (Mosk)*. 2016;(2):44-48] DOI: 10.18565/aig.2016.2.44-48
5. Ross MG, Nijland MJM. Development of ingestive behavior. *Am J Physiol* 1998;274:879-893
6. Tong X. Amniotic fluid may act as a transporting pathway for signaling molecules and stem cells during the embryonic development of amniotes. *J Chin Med Assoc* 2013;76:606–610. DOI: 10.1016/j.jcma.2013.07.006
7. 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. DOI: 10.1016/1071-5576(95)94484-c
8. Brace RA, Wlodek ME, Cock ML, Harding R. Swallowing of lung liquid and amniotic fluid by the ovine fetus under normoxic and hypoxic conditions. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171:764-770. DOI: 10.1016/0002-9378(94)90094-9
9. Robertson P, Faber JJ, Brace RA et al. Responses of amniotic fluid volume and its four major flows to lung liquid diversion and amniotic infusion in the ovine fetus. *Reprod Sci* 2009;16:88-93. DOI: 10.1177/1933719108324888
10. Brace RA, Anderson DF, Cheung CY. Ovine fetal swallowing responses to polyhydramnios. *Physiol Rep* 2014;2(3):e00279. DOI: 10.1002/phy2.279
11. Gesteland KM, Anderson DF, Davis LE et al. Intramembranous solute and water fluxes during high intramembranous absorption rates in fetal sheep with and without lung liquid diversion. *Am J Obstet Gynecol* 2009;201:85.e1-6. DOI: 10.1016/j.ajog.2009.02.018
12. Faber JJ, Anderson DF. Absorption of amniotic fluid by amniochorion in sheep. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282:850-854. DOI: 10.1152/ajpheart.00746.2001
13. 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;188:786-793. DOI: 10.1016/j.jsg.2003.09.002
14. Jellyman JK, Anderson DF, Faber JJ et al. Amniotic fluid volume and intramembranous absorption responses to tracheoesophageal shunt or esophageal ligation in fetal sheep. *Am J Obstet Gynecol* 2009;200:313.e1-6. DOI: 10.1016/j.ajog.2008.10.025
15. Ross MG, Brace RA, National Institute of Child Health and Development Workshop Participants. National Institute of Child Health and Development Conference summary: amniotic fluid biology—basic and clinical aspects. *J Matern Fetal Med* 2001;10:2-19. DOI: 10.1080/jmf.10.1.2.19
16. Brace RA, Anderson DF, Cheung CY. Fetal swallowing as a protective mechanism against oligohydramnios and polyhydramnios in late gestation sheep. *Reprod Sci* 2013;20:326-330. DOI: 10.1177/1933719112453510

Сведения об авторах:

Сузопов Егор Валерьевич

656038, Алтайский край, г. Барнаул, пр. Ленина, д. 40. Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, студент лечебного факультета, кафедра биохимии и лабораторной диагностики. Тел.: +7(3852)24-13-09; E-mail: suzopov1egor@gmail.com
Suzopov Egor Valerievich
656038, Altai Krai, Barnaul, Lenina, 40, Altai State Medical University, student, Faculty of General Medicine, Department of Biochemistry and Clinical Laboratory Diagnostics. Tel.: +7(3852)24-13-09; E-mail: suzopov1egor@gmail.com.

Лытарева Ирина Александровна

656038, Алтайский край, г. Барнаул, пр. Ленина, д. 40. Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ассистент, кафедра патофизиологии, клинической патофизиологии с курсом ФПК и ППС. Тел.: +7(3852)62-60-68; E-mail: eireen186@gmail.com
Lytar Irina Aleksandrovna
656038, Altai Krai, Barnaul, Lenina, 40, Altai State Medical University, assistant, Department of Patophysiology, Clinic Patophysiology. Tel.: +7(3852)62-60-68; E-mail: eireen186@gmail.com

Поповцева Анна Валентиновна, к.м.н.

656038, Алтайский край, г. Барнаул, пр. Ленина, д. 40. Го-

сударственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доцент, кафедра биохимии и клинической лабораторной диагностики. Тел.: +7(3852)24-13-09; E-mail: popovceva@gmail.com

Popovceva Anna Valentinovna, PhD

656038, Altai Krai, Barnaul, Lenina, 40, Altai State Medical University, associate professor, Department of Biochemistry and Clinical Laboratory Diagnostics. Tel.: +7(3852)24-13-09; E-mail: popovceva@gmail.com

Кореновский Юрий Владимирович, к.м.н.

656038, Алтайский край, г. Барнаул, пр. Ленина, д. 40. Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доцент, кафедра биохимии и клинической лабораторной диагностики. Тел.: +7(3852)24-13-09; E-mail: timidin@gmail.com

Korenovsky Yuri Vladimirovich, PhD

656038, Altai Krai, Barnaul, Lenina, 40, Altai State Medical University, associate professor, Department of Biochemistry and Clinical Laboratory Diagnostics. Tel.: +7(3852)24-13-09; E-mail: timidin@gmail.com

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию: 10.06.2016 г.

Принята в печать: 05.12.2016 г.