

На правах рукописи

БУТЕНКО
Елена Викторовна

**ДИНАМИКА ГРЕЛИНА, ЛЕПТИНА И ГОРМОНОВ
РОСТА В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ ЧЕЛОВЕКА**

03.03.05 – биология развития, эмбриология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Ставрополь – 2011

Работа выполнена в
ФГАОУ ВПО «Южный федеральный университет».

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Шкурат Татьяна Павловна.

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, доцент
Джандарова Тамара Исмаиловна;

доктор биологических наук
Друккер Нина Александровна.

Ведущая организация: ГБОУ ВПО «Ростовский государственный
медицинский университет» Минздравсоц-
развития России.

Защита диссертации состоится _____ 2012 г. в
_____ часов на заседании диссертационного совета ДМ 212.256.09 при
Ставропольском государственном университете по адресу: 355009, г. Ставро-
поль, ул. Пушкина, д. 1, корп. 2, комн. 506.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ставропольского госу-
дарственного университета.

Автореферат разослан _____ 2011 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Ржепаковский И.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Ведущую роль в интеграции процессов роста и клеточной дифференцировки в онтогенезе играет система гормона роста. После открытия в 1999 г грелина и его регуляторных функций было сформировано четкое представление о месте грелина в гипоталамо-гипофизарной оси (Kojima M., 1999). Далее в широком ряде работ рассматривались многочисленные эффекты грелина при разных функциональных состояниях организма, в том числе и при беременности. В большинстве случаев авторы рассматривали беременность, протекающую на фоне соматических патологий, например сахарного диабета, ожирения и других, или проводили исследования на небольшом клиническом материале (Крапивина Н.А., 2007, Fuglsang J., 2005).

Остается открытым вопрос о референсных значениях концентрации грелина в крови матери во время эмбрионального развития человека. Существуют единичные данные о содержании грелина и факторов роста на том или ином сроке гестации, но систематизированные исследования динамики гормонов роста и энергетического баланса не проводились. Для российской популяции практически отсутствуют данные о динамике содержания грелина, лептина и гормонов роста при беременности в норме.

Поскольку в литературе имеется мало работ, посвященных комплексному изучению грелина, лептина и гормонов роста в процессе эмбриогенеза, актуальным представляется изучение их регуляторных функций в процессе развития т.к. именно грелин и лептин, возможно, выполняют роль связующего звена между процессами питания и формирования и функционирования репродуктивной системы человека, а также развитием эмбриона и плода.

Цель работы – изучение динамики концентраций грелина, лептина и гормонов роста в крови матери на последовательных стадиях эмбриогенеза человека при нормальном развитии и при спонтанной гибели эмбриона, а также при функциональных состояниях, угрожающих жизни плода.

Задачи исследования:

1. Изучить концентрации соматотропного гормона, инсулиноподобного фактора роста, грелина, лептина и инсулина в крови беременных женщин на разных этапах эмбрионального развития в норме.
2. Проанализировать изменения в содержании исследуемых гормонов в крови беременных при спонтанной гибели эмбриона в первом триместре.
3. Изучить содержание грелина, лептина, соматотропина, инсулина и инсулиноподобного фактора роста – 1 в сыворотке крови женщин с истинной угрозой потери плода.
4. Проанализировать соотношение концентраций соматотропного гормона, инсулиноподобного фактора роста, грелина, лептина и инсулина у матери и плода.
5. Определить диагностическую значимость исследуемых молекулярных маркеров для оценки эмбрионального развития.

Научная новизна. Впервые проведено комплексное изучение факторов депонирования и мобилизации энергетических субстратов – грелина, лептина и инсулина, и гормонов роста – соматотропного гормона и инсулиноподобного

фактора роста – 1 в крови матери на протяжении всего периода эмбрионального развития человека. Впервые для российской популяции установлены референсные нормы содержания грелина в плазме крови для здоровых небеременных женщин в зависимости от фазы менструального цикла и для женщин на разных сроках гестации. Впервые показано снижение уровня грелина, гормонов роста, инсулиноподобного фактора роста – 1 и повышения концентрации инсулина в крови матери при истинной угрозе потери плода.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. При нормальном эмбриональном развитии человека концентрация грелина и лептина в крови матери постепенно нарастает на протяжении всего периода гестации при сохранении неизменным соотношения грелин / лептин.
2. При гибели эмбриона на сроке до 8 недель развития в крови матери не происходит изменений в содержании грелина, лептина, соматотропина, инсулиноподобного фактора роста – 1 и инсулина.
3. При истинной угрозе прерывания беременности на 16-20 неделе развития плода происходит снижение уровня грелина, гормона роста, инсулиноподобного фактора роста – 1 и повышение концентрации инсулина.
4. Сохранение постоянным соотношения грелина и лептина в крови матери является важным условием для нормального развития эмбриона и плода.
5. Во время эмбрионального развития человека в крови матери наблюдается изменение регуляторных взаимосвязей в системе грелин-соматотропин-инсулиноподобный фактор роста – 1.

Теоретическое и практическое значение работы. В общетеоретическом плане, выполненная работа расширяет существующие представления о роли грелина, лептина и гормонов роста в обеспечении нормального эмбриогенеза человека, в частности процессов имплантации бластоцисты и развития плаценты. Полученные результаты показывают изменения в концентрациях и корреляции содержания изучаемых гормонов при развитии патологических состояний, связанных с нарушением имплантации и плацентации. Данные, представленные в работе, позволяют, как количественно, так и качественно, оценить отношение грелин / лептин как прогностический маркер в оценке развития плода. Результаты работы расширяют представления о биохимических процессах в ходе эмбрионального развития человека и открывают новые перспективы их практического применения в пренатальной диагностике плода.

Полученные в работе данные используются при чтении лекций на кафедре генетики факультета биологических наук Южного федерального университета в спецкурсах «Эмбриология человека», «Предиктивная медицина», «Медико-генетическое консультирование», «Биология индивидуального развития», а так же в практической деятельности клинко-диагностической лаборатории ЗАО «Наука», г. Ростов-на-Дону.

Работа выполнена в рамках тематического плана Минобрнауки России единого заказ нарядом НИИ биологии ЮФУ на оборудовании Центра коллективного пользования «Высокие технологии» и Центра коллективного пользования «Биотехнология, биомедицина, и экологический мониторинг», и в рамках гранта Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры

инновационной России 2009-2012» по теме «Разработка технологии мониторинга репродуктивной функции человека и развития плода с использованием новых геномных и постгеномных маркеров», государственный контракт № 02.740.11.0501 от 18.11.2009 г.

Апробация работы. Результаты работы докладывались на Международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине» (г. Санкт-Петербург, 23-26 ноября 2010 г.); на научной конференции Ростовского общества генетиков и селекционеров им. Н.И. Вавилова (г. Ростов-на-Дону, 7 февраля 2011 г.); на XLIX Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» (г. Новосибирск, 16-20 апреля 2011 г.); на всероссийской научной конференции «Модернизация науки и образования» (г. Махачкала, 26-27 апреля 2011 г.); на 65-й итоговой научной конференции молодых ученых РостГМУ с международным участием (г. Ростов-на-Дону, 22 апреля 2011 г.); на IV Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биотехнологии, нанотехнологии и медицины» (г. Ростов-на-Дону, 22-25 сентября 2011 г.); на XV научно-практическом форуме «Национальные дни лабораторной медицины России – 2011» (г. Москва, 4-6 октября 2011 г.).

Публикация результатов исследования. По теме диссертационного исследования опубликовано 11 работ, в том числе 3 из них в периодических изданиях из перечня ведущих рецензируемых журналов, утвержденных ВАК Министерства образования и науки России и рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертации на соискание искомой ученой степени.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 119 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования, обсуждения результатов исследования, заключения, выводов, списка использованной литературы, включающего 41 отечественных и 238 зарубежных источника. Работа содержит 18 таблиц, иллюстрирована 30 рисунками.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальная работа выполнена на кафедре генетики и в лаборатории биомедицины НИИ биологии Южного федерального университета.

Материалом служили образцы сыворотки и плазмы крови беременных женщин и новорожденных. Материал для исследования был получен на базе муниципального лечебно-профилактического учреждения здравоохранения «Родильный дом № 5» и клинико-диагностической лаборатории «Наука» (г. Ростов-на-Дону). От всех пациенток было получено информированное добровольное согласие на обследование. Исследования одобрены комитетом по биоэтике Южного федерального университета (протокол № 1 от 29.09.2011 г.).

В исследовании участвовало 202 женщины в возрасте от 22 до 37 лет, большинство из которых проживают на территории Ростовской области. Также были изучены 35 образцов пуповинной крови новорожденных. Для каждой па-

циентки собирались анкетные данные, включающие информацию о состоянии здоровья матери, а также результаты акушерско-гинекологического анамнеза, ультразвуковой диагностики, биохимическим исследованием содержания альфафетопротеина, хорионического гонадотропина и свободного эстриола. Исходя из анамнеза и гестационного срока беременности были сформированы группы обследованных. Описание групп приведено в таблице 1.

Таблица 1

Антропометрическая характеристика групп обследованных женщин

Неделя беременности	Течение беременности	n	Средний возраст (полных лет)	Рост (см)	Вес (кг)	Индекс массы тела
Небеременные	Физиологическое	29	26,3±0,7	165,0±1,1	58,5±2,0	21,5±0,8
4-6	Физиологическое	11	27,1±1,2	164,4±1,8	62,9±2,9	23,2±1,0
7-10	Физиологическое	12	27,8±0,8	162,9±1,7	62,4±3,7	23,6±1,6
4-9	Гибель эмбриона	18	26,1±1,9	163,4±1,4	59,4±2,3	22,1±1,2
15-17	Физиологическое	39	29,2±0,9	168,0±1,0	63,2±1,6	22,2±0,5
18-22	Физиологическое	13	28,8±1,6	166,0±1,5	63,7±3,0	23,2±1,1
18-22	Угроза прерывания	17	28,4±1,1	166,3±1,3	61,7±1,5	22,2±0,5
36-38	Физиологическое	56	29,1±1,4	164,0±1,1	69,9±1,2	25,8±0,4
Новорожденные	Физиологическое	56	0	-	3,47±0,52	-

Забор крови для исследования проводили натощак в утренние часы с применением вакуумной системы. Подготовку образцов сыворотки и плазмы крови проводили по стандартной методике. До исследования образцы хранили в морозильной камере при температуре минус 20°С.

Исследования уровня грелина, лептина, инсулиноподобного фактора роста-1 и соматотропного гормона в сыворотке и плазме крови проводили методом иммуноферментного анализа на автоматическом иммуноферментном анализаторе «Alisei» (Италия), с использованием тест-систем производства Peninsula Laboratories, LLC (США), DRG (Германия) и DBC (Канада), в соответствии с инструкциями производителя.

Полученные результаты обработаны статистически с применением пакета программ Statistica 6.0 и MedCalc v. 12.0. Использовались стандартные показатели вариационной статистики, такие как среднее значение, квадратическая ошибка среднего значения, коэффициент корреляции, построение характеристической кривой (Рос-анализ). Для определения достоверности различий использовали Т-критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование содержания инсулиноподобного фактора роста – 1, соматотропина, грелина, лептина и инсулина в крови небеременных женщин

Как основные звенья гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси, изучаемые гормоны влияют на развитие и формирование репродуктивной системы женщины. Их изменения могут обуславливать способность яйцеклеток к оплодотворению, а также влиять на характеристике тканей матки и яичников.

В результате проведенных исследований было показано, что концентрация грелина, лептина, соматотропина (СТГ), инсулиноподобного фактора роста-1 (ИФР-1) и инсулина в крови женщин не зависит от фазы менструального цикла, соответственно не отражает степень зрелости яйцеклетки. Показатели групп небеременных женщин представлены в таблице 2.

Таблица 2

Содержание гормонов роста и трофики в сыворотке крови небеременных женщин в зависимости от фазы менструального цикла (n=29)

Гормоны	Фаза цикла	Среднее значение концентрации (M±m)	Абсолютный диапазон значений	p
ИФР-1 (нг/мл)	фолликулярная	111,36±6,47	84,68 – 142,45	0,39
	лютеиновая	120,73±8,95	73,45 – 145,07	
СТГ (нг/мл)	фолликулярная	1,8±0,72	0,06 – 4,79	0,7
	лютеиновая	2,19±0,69	0,09 – 4,43	
Грелин (нг/мл)	фолликулярная	0,398±0,098	0,1 – 0,89	0,85
	лютеиновая	0,299±0,107	0,06 – 0,94	
Лептин (нг/мл)	фолликулярная	11,06±2,91	2,6 – 26,41	0,71
	лютеиновая	9,68±1,79	4,07 – 18,1	
Грелин / Лептин	фолликулярная	0,05±0,01	0,01 – 0,09	0,5
	лютеиновая	0,06±0,03	0,004 – 0,11	
Инсулин (мкМЕ/мл)	фолликулярная	9,56±0,88	4,26 – 13,77	0,95
	лютеиновая	9,47±0,81	7,42 – 13,81	

Исследование динамики содержания ИФР-1, СТГ, грелина, лептина и инсулина в крови беременных при нормальном течении эмбриогенеза

Были изучены изменения показателей гормонов роста и трофики в крови беременной при нормальном течении эмбриогенеза. На рисунке 1 представлена динамика изученных гормонов по этапам развития эмбриона и плода в соответствии с акушерским сроком беременности. В преэмбриональном периоде концентрации грелина, лептина, инсулина и соматотропина в крови беременных не отличались при $p < 0,05$ от содержания в крови небеременных женщин. Концентрация ИФР-1 достоверно увеличивалась. Показатели в группе эмбрионального периода развития были сходны с показателями преэмбрионального развития (p от 0,38 до 0,96). Для второго триместра беременности характерен повышенный уровень лептина. Среднее значение его концентрации во втором триместре составило $14,8 \pm 1,65$ нг/мл, что было выше верхней границы референтных значений для небеременных.

Кроме увеличения содержания лептина в крови беременных, для второго триместра характерно снижение концентрации инсулина. Наблюдаемые изменения, вероятно, направлены на передачу энергетических субстратов через плацентарный кровоток к плоду, который в этот период наиболее интенсивно растет. Повышенный уровень лептина способен тормозить поступление глюкозы в клетки, таким образом глюкоза дольше циркулирует в материнском кровотоке, повышается ее доступность для плода. На заключительном этапе эмбриогенеза в крови беременных наблюдался повышенная по сравнению с показателями небеременных женщин концентрация лептина, инсулина и ИФР-1. Кон-

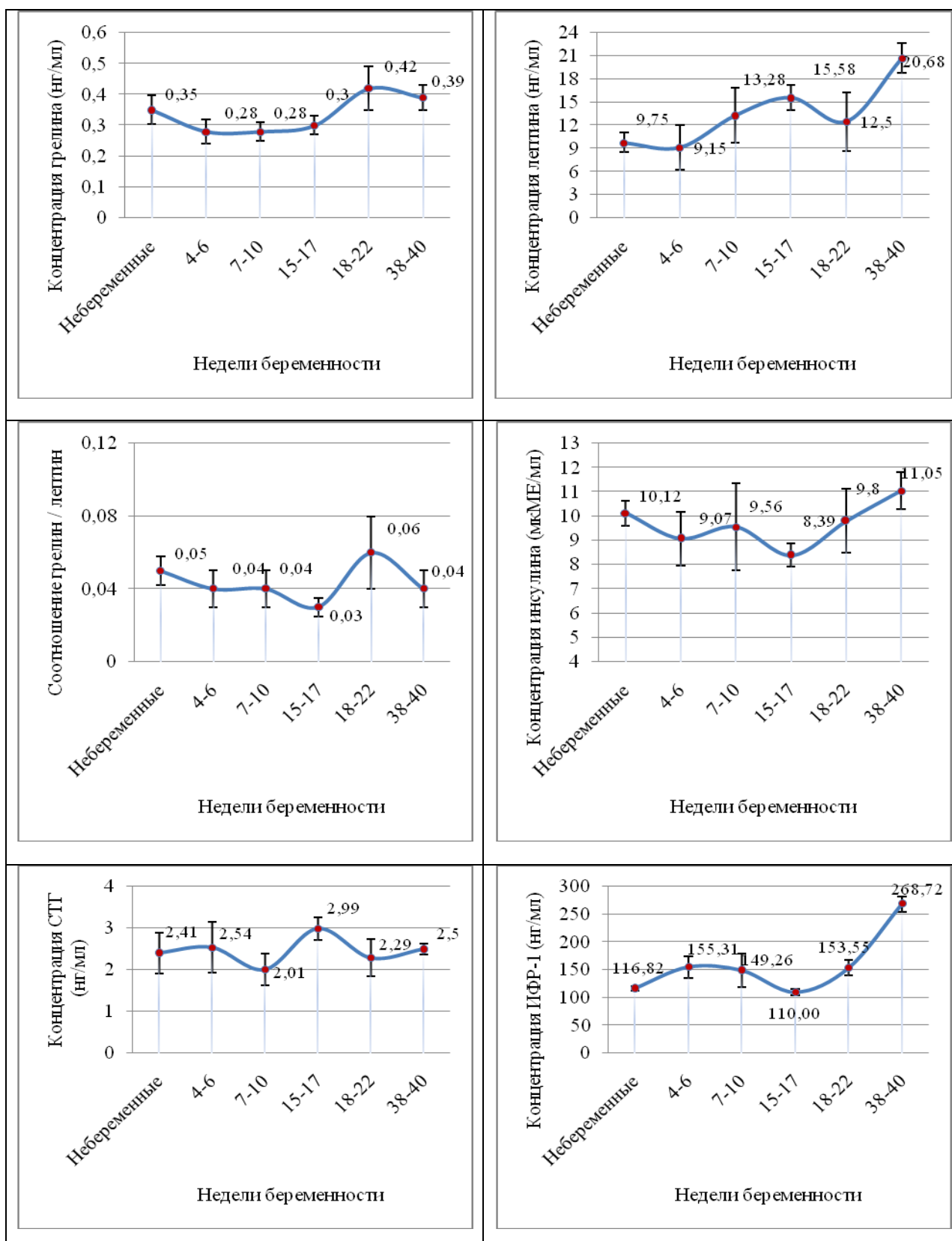


Рис. 1. Динамика концентраций грелина, лептина, соотношения грелин / лептин, инсулина, соматотропного гормона (СТГ), инсулиноподобного фактора роста – 1 (ИФР-1) в крови матери в течение нормального эмбрионального развития человека.

центрация грелина возросла по сравнению со значением, наблюдавшимся в первом триместре беременности ($p < 0,05$).

Ключевым моментом в преэмбриональный и ранний эмбриональный период является формирование зародышевых листков, имплантация, ранний органогенез эмбриона и закладка и функционирование хориона. В процессе имплантации бластоцисты и развития хориона необходима реализация трех клеточных функций: прикрепление к поверхности эндометрия, разрастания трофобласта и его инвазия. Нарушение этих процессов может приводить к невынашиванию беременности. Апоптоз – важнейший процесс, обеспечивающий изменение морфологии эндометрия в период имплантации и инвазии трофобласта. В литературе имеются данные, указывающие на участие грелина, лептина и ИФР-1 в регуляции этих функций. Грелин оказывает стимулирующее влияние на пролиферацию клеток плаценты, одновременно подавляя апоптоз в этих клетках (Rak-Mardyla A., 2010). В нашем исследовании в первом триместре беременности только уровень ИФР-1 достоверно увеличивался по сравнению с показателями, характерными для небеременных женщин. Это может быть связано с тем, что в преимплантационном периоде инсулиноподобный фактор роста – 1 стимулирует формирование бластоцисты и ее прикрепление (Kimber S.J., 2008). В экспериментальном исследовании преимплантационных зародышей человека ИФР-1 снижал экспрессию генов EOMES (начало его экспрессии означает начало дифференцировки эндодермы), ERBB4 (рецептор эпидермальных факторов роста; обеспечивает митогенез и дифференцировку клеток) и ERBB1 (рецептор эпидермальных факторов роста; обеспечивает пролиферацию) (Kimber S.J., 2008). Рецепторы ИФР-1 обнаруживаются в эктодермальных тканях эмбрионов на 28 день развития (Coppola D., 2009). Молекула инсулиноподобного фактора роста – 1 не способна преодолевать плацентарный барьер (Sferruzzi-Perri A.N., 2011).

Известно, что в плаценте инсулиноподобный фактор роста первого типа экспрессируется главным образом в синцитиотрофобласте. Самые высокие уровни мРНК ИФР-1 в плаценте зафиксированы в первом триместре беременности, а именно, в 8-9 недель, во втором триместре они незначительно снижены, и являются самыми низкими в момент родов (Hayashida T., 2002, Крукиер И.И., 2003). В нашем исследовании мы также наблюдали повышение концентрации ИФР-1 в крови беременных на сроке 4-8 недель, затем снижение концентрации на 15-17 неделях. В ходе дальнейшего развития плода концентрация ИФР-1 в крови матери вновь возрастала. На основании вышесказанного, можно сделать вывод о том, что во второй половине беременности источником ИФР-1 не является ткань плаценты. По данным разных авторов концентрация инсулиноподобного фактора роста – 1 в крови матери положительно коррелирует с весом плода, следовательно, существует механизм опосредованного влияния ИФР-1 на плаценту, связанного с регуляцией плацентарного кровотока и поступления питательных веществ плоду.

В течение беременности наблюдается постепенное нарастание концентрации грелина и лептина, в то время как содержание СТГ остается практически

без изменений. Показатели гормонов роста и трофики матери на поздних сроках развития плода представлены в таблице 3.

Таблица 3

Концентрация грелина, лептина, СТГ, ИФР-1 и инсулина в крови беременных в третьем триместре при нормальном развитии плода (n=48)

Гормоны	Среднее значение концентрации (M±m)	Абсолютный диапазон значений
ИФР-1 (нг/мл)	268,72±13,85	60,85 – 477,21
СТГ (нг/мл)	2,5±0,13	0,49 – 5,01
Грелин (нг/мл)	0,39±0,04	0,13 – 1,05
Лептин (нг/мл)	20,68±1,94	1,89 – 64,97
Грелин / лептин	0,04±0,01	0,004 – 0,240
Инсулин (мкМЕ/мл)	11,05±0,78	2,82 – 31,88

Следует отметить, что соотношение грелин / лептин оставалось практически неизменным на протяжении всей беременности. Его средние значения варьировали от 0,03±0,01 до 0,06±0,02 во всех изученных группах, при этом статистический анализ не выявил достоверности этих различий при $p < 0,05$. Возможно, такое постоянство необходимо для поддержания метаболического баланса, а также для поддержания баланса про- и противовоспалительных иммунных реакций, т.к. по отдельности грелин и лептин оказывают противоположные эффекты активацию Th-клеток и апоптоз лимфоцитов (Орлова Е.Г., 2010). Возможно, грелин, участвуя в дифференцировке клеток эндометрия, ингибируя апоптоз эндотелиоцитов, стимулируя ангиогенез посредством активации сигнального пути ERK-2, обеспечивает формирование децидуальной оболочки плаценты и рост сосудов ворсин (Lorenzi T., 2009, Baldanzi G., 2002, Li A., 2007). Таким образом его стабильный уровень является необходимым условием плацентации. В дальнейшем, по мере прогрессии беременности, его вазодилатационные свойства обеспечивают нормальный плацентарный кровоток и, соответственно, газообмен и трофику растущего плода (Nagaya N., 2001). Грелин способен подавлять сократительную активность матки, что было ранее доказано экспериментально (Nehir M.P., 2008). Это может играть роль при сохранении беременности.

При изучении корреляционных зависимостей между показателями нами были получены следующие результаты. В группе небеременных женщин наблюдалась умеренная положительная корреляция СТГ и грелина, что закономерно, и объясняется СТГ-релизинг свойствами грелина. Но при беременности на всех изученных нами сроках корреляция этих двух показателей отсутствовала. Наблюдаемое явление может быть связано с замещением в крови матери гипофизарного гормона роста на плацентарный. Возможно, грелин не обладает релизинг-свойствами по отношению к плацентарному гормону роста. В первом триместре беременности корреляция между уровнем ИФР-1 и соматотропина отсутствовала, далее на 15-17 неделе беременности между двумя этими показателями была зарегистрирована корреляционная зависимость. По мере развития плода корреляция концентраций ИФР-1 и СТГ изменялась со слабой отрицательной во втором триместре до умеренной положительной в третьем тримест-

ре беременности. Таким образом, хотя на протяжении всего периода эмбрионального развития человека концентрация СТГ в крови матери существенно не изменяется, наблюдается переключение систем его регуляции.

Исследование изменения концентрации ИФР-1, СТГ, грелина, лептина и инсулина в крови беременных при гибели эмбриона и развития на фоне нарушений работы системы мать-плацента-плод

При гибели эмбриона на 2-7 неделе развития не наблюдалось изменений в концентрациях изученных гормонов роста и трофики в крови беременной. При изучении данной патологии развития в группу обследованных были включены женщины с установленным диагнозом «самоаборт» (n=8) или «неразвивающаяся беременность» (n=10). Был проведен статистический анализ концентраций грелина, лептина, соматотропина, инсулиноподобного фактора роста – 1 и инсулина в подгруппах женщин с вышеуказанными патологиями. Не смотря на то, что самоаборт и неразвивающаяся беременность имеют разную этиологию, а так же различную картину нарушений в эндометрии и миометрии матки, отличия средних значений на уровне значимости $p < 0,05$ были выявлены только для концентрации грелина в плазме крови. Следовательно, содержание лептина, СТГ, ИФР-1, и инсулина в крови матери не отражает развития патологий, приводящих к прекращению развития эмбриона.

Средний уровень содержания грелина в плазме крови женщин с произошедшим самопроизвольным абортom составил $0,39 \pm 0,05$ нг/мл, с неразвивающейся беременностью – $0,29 \pm 0,016$ нг/мл. Учитывая широкий диапазон наблюдаемых значений грелина и небольшой объем изученной выборки, нельзя сделать окончательных выводов о причинах наблюдаемых различий. В то же время, имеющиеся литературные данные свидетельствуют об участии грелина в процессе эмбриональной имплантации (Tawadros N., 2007, O'Brien M., 2010). Поэтому для установления причин обнаруженных различий необходимы дальнейшие исследования.

В группе женщин с прекращением развития эмбриона, как и в группе физиологического течения беременности, а также в группе небеременных, наблюдалась сильная положительная корреляция концентрации лептина с весом женщины ($0,824$ при $p < 0,001$) и с ИМТ ($0,705$ при $p = 0,005$). Но отсутствовала корреляция инсулина с весом и индексом массы тела, в то время, как наблюдалась умеренная отрицательная корреляция концентрации соматотропного гормона и веса беременной женщины ($-0,53$ при $p < 0,05$).

Результаты исследования в группе женщин с истинной угрозой прерывания беременности представлены в таблице 4.

При угрозе прерывания беременности во втором триместре мы наблюдали снижение концентрации ИФР-1 в крови матери. Литературные данные свидетельствуют, что падение уровня ИФР-1 обуславливает прерывание беременности в первом триместре в результате нарастания интенсивности апоптоза в клетках хориона (Сапрунова В.Б., 2002). Сниженный уровень ИФР-1 в плаценте наблюдается на всех сроках гестации при угрозе прерывания, с максимальным

снижением в 13-19 недель, что еще раз подтверждает, что источником ИФР-1 в крови матери служит плацента (Крукиер И.И., 2003).

Таблица 4

Концентрации грелина, лептина, соматотропина, инсулиноподобного фактора роста – 1, инсулина и соотношение грелин / лептин в группах обследованных с физиологически протекающей беременностью (n=13)

и с угрозой прерывания беременности (n=17)

Исследуемые гормоны	Течение беременности	Среднее значение (M±m)	Диапазон наблюдаемых значений	p
ИФР-1 (нг/мл)	N*	153,55±13,89	104,74 – 219,79	0,065
	УП*	109,9±13,43	38,4 – 208,7	
СТГ (нг/мл)	N*	2,29±0,45	0,68 – 4,34	0,01
	УП*	0,9±0,12	0,3 – 1,6	
Грелин (нг/мл)	N*	0,42±0,07	0,25 – 1,02	0,035
	УП*	0,2±0,025	0,1 – 0,3	
Лептин (нг/мл)	N*	17,17±6,0	4,71 – 49,85	0,66
	УП*	20±1,69	10,4 – 31,3	
Грелин/лептин (нг/мл)	N*	0,06±0,02	0,007 – 0,216	0,09
	УП*	0,02±0,002	0,006 – 0,033	
Инсулин (нг/мл)	N*	9,8±1,32	6,05 – 20,66	0,001
	УП*	25,9±3,95	4,3 – 49,1	

*N – физиологическая беременность, *УП – угроза прерывания беременности

Кроме снижения концентрации ИФР-1 мы наблюдали повышение инсулина. В экспериментальных работах показано, что глюкоза снижает интенсивность синтеза ИФР-связывающего белка в плаценте (Hsieh T.T., 1997). Повышенный уровень инсулина вызывает снижение концентрации глюкозы, возможно, поэтому уровень ИФР-1 связывающего белка возрастает. Это явление можно расценивать как компенсаторную реакцию, направленную на стимуляцию роста новых ворсин плаценты (Николаева Ю.А., 2007, Chakarabarty H., 2002). С другой стороны, повышенный уровень ИФР-1-сб может снижать биодоступность ИФР-1 по аналогии с секреторной фазой менструального цикла (Corleta H., 2000).

Низкий уровень секреции ИФР-1 также может быть вызван пониженными значениями концентрации соматотропного гормона в сыворотке крови женщин с угрозой прерывания беременности.

Таким образом, для состояния, угрожающего жизни плода на 16-20 неделе развития, характерны следующие изменения в системе гормона роста: снижение уровня грелина, гормона роста, инсулиноподобного фактора роста-1 при повышенных концентрациях в крови беременной инсулина. Рос-анализ полученных результатов показал, что наибольшей диагностической чувствительностью и специфичностью в отношении истинной угрозы потери плода обладает соотношение концентраций грелина и инсулина (чувствительность 90,9%, специфичность 83,3%), и соотношение концентраций ИФР-1 и инсулина (специфичность 90,9%, чувствительность 66,7%).

Полученные концентрации ИФР-1 во втором триместре при физиологическом течении беременности отрицательно коррелировали с содержанием СТГ и

положительно – с концентрацией инсулина и лептина. Тогда как в группе с истинной угрозой прерывания беременности корреляция с СТГ и лептином отсутствовала, а с инсулином была отрицательной. В третьем триместре беременности в норме наблюдалась положительная корреляция концентрации сывороточного ИФР-1 с соматотропином, а в группе с нарушением функций плаценты связь между этими двумя показателями отсутствовала, в то время как наблюдалась положительная корреляция с содержанием инсулина. Таким образом, показаны однонаправленные изменения показателей систем регуляции апоптоза и энергетического баланса при физиологическом течении беременности во втором триместре, а при истинной угрозе прерывания беременности наблюдается разнонаправленные изменения этих показателей.

Соотношение концентрации ИФР-1, СТГ, грелина, лептина и инсулина в крови матери и новорожденного

В крови новорожденных концентрация всех исследуемых гормонов была снижена по сравнению с содержанием в крови матери ($p < 0,01$), за исключением соматотропного гормона. Уровень гормона роста в пуповинной крови был в 3,5 раза выше, чем концентрация в материнской крови ($p = 0,0002$). Гистограмма относительного изменения концентраций гормонов роста и трофики в крови новорожденных по сравнению с содержанием в крови матери представлена на рисунке 2.

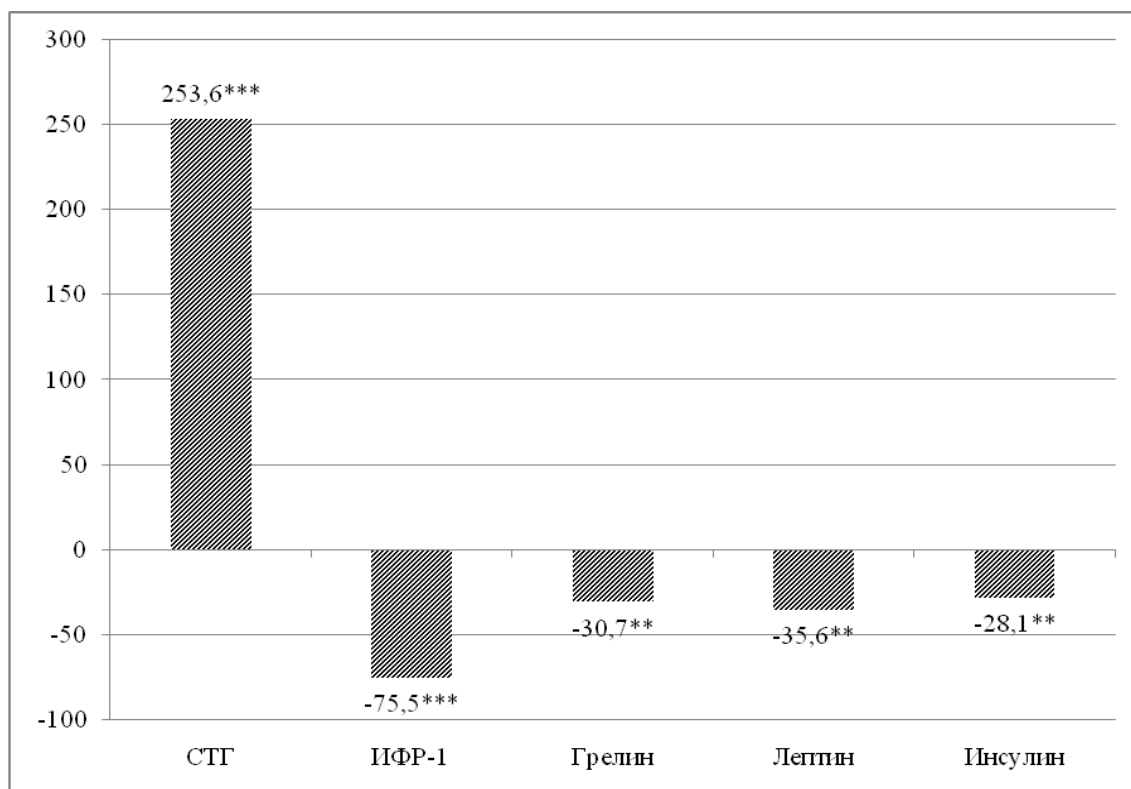


Рис. 2. Относительные различия (%) в содержании соматотропного гормона, инсулиноподобного фактора роста – 1, грелина, лептина и инсулина в пуповинной крови новорожденных по сравнению с концентрацией в материнском кровотоке.

Значение «0» соответствует содержанию гормонов в крови матери.

** – различия достоверны при $p < 0,01$. *** – различия достоверны при $p < 0,001$.

Коэффициент корреляции концентрации грелина с весом при рождении составил 0,37 ($p < 0,05$), что может быть связано с его СТГ-релизинг эффектом. Наблюдалась умеренная положительная корреляция содержания грелина в крови матери с концентрацией лептина в крови новорожденных, а также уровня инсулина в крови матери с концентрацией соматотропина в крови новорожденных. Полученные корреляции показателей связаны со взаимозависимостью процессов питания и роста в эмбриогенезе.

Из литературных данных известно, что грелин способен проходить плацентарный барьер из материнского организма к плоду (Ng P.C., 2005). Также грелин синтезируется в тканях плода (Kedzia A., 2009). Ранее было отмечено, что грелин в пуповинной крови имеет преимущественно плодное происхождение (Cortelazzi D., 2003). В исследованиях некоторых авторов показано, что у здоровых новорожденных не обнаруживается корреляции между концентрацией грелина и массой тела при рождении или содержанием грелина в крови матери (Imam S.S., 2009). В момент рождения содержание грелина в крови здоровых новорожденных не зависит от их веса, в то время как у новорожденных с задержкой внутриутробного развития плода концентрация грелина отрицательно коррелирует с массой тела при рождении. Таким образом грелин участвует в адаптации организма к внутриутробному дефициту энергетических и пластических субстратов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В процессе эмбриогенеза человека организмы матери и плода находятся в состоянии тесной взаимосвязи, что позволяет говорить о системе «мать-плод». Главный механизм регуляции в этой системе – нейрогуморальный. При беременности возникает новое эндокринное равновесие, соответствующее каждому периоду эмбриогенеза. В нашей работе показано, как изменяется система гормона роста и энергетического баланса в последовательные периоды беременности.

Концентрация соматотропного гормона в крови матери существенно не меняется на протяжении всего периода гестации. Но происходит смена регуляторных взаимосвязей. Так, во время беременности не наблюдалась корреляция содержания СТГ и грелина в крови матери, в то время как у небеременных такая связь присутствовала. С развитием плода изменялись корреляционные зависимости СТГ и ИФР-1 с умеренно отрицательной во втором триместре беременности до умеренно положительной в третьем триместре.

Содержание инсулиноподобного фактор роста-1 в крови беременной возрастает в ранние сроки, затем на 13 – 15 неделе развития плода снижается и с 16 недели вновь возрастает. Основываясь на литературных данных об экспрессии ИФР-1 в плаценте и неспособности преодолеть плацентарный барьер, можно сделать вывод о том, что источником ИФР-1 в крови матери в ранние сроки беременности является плацента, а во второй половине беременности – ткани организма матери. В пользу этого предположения также свидетельствует положительная корреляция ИФР-1 с СТГ в третьем триместре. Яркая динамика

ИФР-1 в процессе беременности указывает на его физиологическую роль в процессе эмбриогенеза. Этот фактор роста, вероятно, способствует развитию хориона в первом триместре беременности, а во второй половине беременности он участвует в регуляции трофических функций плаценты.

Грелин, лептин и инсулин осуществляют регуляцию поступления энергетических субстратов, в частности глюкозы, к плоду. На 15-17 неделе развития плода сочетание умеренно повышенного уровня лептина при сниженной концентрации инсулина способствует поступлению глюкозы из материнского кровотока к плоду. Роль грелина в регуляции потребления питательных веществ беременной и плодом подчеркивает тот факт, что содержание лептина в крови новорожденного положительно коррелирует с содержанием грелина в крови матери. Соотношение грелин / лептин сохранялось неизменным на протяжении всего периода беременности при физиологическом течении, а при состояниях, приводящих к гибели плода это соотношение нарушалось. Является ли нарушение соотношения грелин / лептин причиной или следствием нарушения развития плода – предстоит выяснить. Необходимость сохранения соотношения грелин / лептин может быть связано с реципрокными эффектами этих гормонов, оказываемыми на систему провоспалительных и противовоспалительных реакций.

Для состояния, угрожающего жизни плода на 16-20 неделе развития, характерны следующие изменения в системе гормона роста: сниженные уровни грелина, гормона роста, инсулиноподобного фактора роста-1 при повышенных концентрациях в крови беременной инсулина и ИФР-1-связывающего протеина. Данные изменения можно расценивать как компенсаторную реакцию организма, направленную на преобладание противовоспалительных реакций и на дополнительную стимуляцию роста ворсин плаценты.

ВЫВОДЫ

1. Содержание соматотропного гормона, инсулиноподобного фактора роста – 1, грелина, лептина и инсулина в крови небеременных женщин не зависит от фазы менструального цикла.
2. При нормальном развитии эмбриона и плода в крови матери постепенно нарастает концентрация грелина и лептина при сохранении постоянным их соотношения. Концентрация ИФР-1 повышается в период развития эмбриона (4-10 недель), затем снижается и вновь повышается в период активного роста плода (18-22 недели), к 36-38 неделе его содержание превышает показатели небеременных женщин на 130%. Концентрация инсулина остается стабильной на протяжении всего периода эмбриогенеза на уровне средних значений 9-11 мкМЕ/мл, с незначительным снижением на сроке 15-17 недель беременности до среднего значения 8,4 мкМЕ/мл.
3. При гибели плода на 2-7 неделе развития содержание ИФР-1, СТГ, грелина, лептина и инсулина в крови матери не изменяется.
4. Снижение уровня грелина на 47%, гормона роста на 61%, инсулиноподобного фактора роста-1 на 28% при повышении сывороточной концентрации ин-

сулина на 164% достоверно прогнозирует состояния, угрожающие жизни плода.

5. Доказано увеличение концентрации СТГ на 253,6% и снижение уровня грелина на 30,7%, лептина на 35,6%, ИФР-1 на 75,5% и инсулина на 28,1% в пуповинной крови новорожденных по сравнению с концентрацией в крови матери.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Полученные в результате проведенного исследования диапазоны содержания в крови здоровых женщин грелина, лептина, соматотропного гормона, инсулиноподобного фактора роста – 1 и инсулина рекомендуется использовать в клинической лабораторной диагностике при формировании региональных референтных интервалов биохимических показателей для жительниц Ростовской области.
2. Полученные данные по изменению концентраций грелина, лептина, соматотропного гормона, инсулиноподобного фактора роста – 1 и инсулина могут быть использованы в практическом акушерстве и гинекологии при диагностике истинной угрозы прерывания беременности.
3. Полученные результаты по динамике грелина, лептина и гормонов роста в эмбриогенезе человека могут быть использованы в научных целях и при составлении учебных и справочных пособий по биологии развития и размножения, эмбриологии человека, предиктивной медицине, эндокринологии репродукции человека.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Бутенко, Е.В. Грелин, лептин и инсулин в регуляции энергетического обмена у беременных женщин / Е.В. Бутенко, Л.В. Гутникова, А.А. Александрова, Т.П. Шкурат // IV Международная школа молодых ученых по молекулярной генетике «Геномика и биология клетки»: Тезисы докладов. (Москва – Звенигород, 29 ноября – 3 декабря 2010 г.). – М.: 2010. – С. 58-59.
2. Бутенко, Е.В. Инсулиноподобный фактор роста I как один из компонентов системы регуляции развития беременности / Е.В. Бутенко, А.С. Шульга // Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине. PhisioMedi: Сб.тр. Международной конференции (Санкт-Петербург, 23-26 ноября 2010 г.). – С-Пб.: Изд-во Политехнического университета, 2010. – С. 76-77.
3. **Шестопалов, А.В. Грелин и соматотропный гормон при физиологически протекающей беременности / А.В. Шестопалов, Е.В. Бутенко, А.А. Александрова, Л.В. Гутникова, А.С. Шульга, Т.П. Шкурат // Валеология. – 2011. – № 1. – С. 76 – 80.**
4. Бутенко, Е.В. Изучение динамики концентраций грелина и гормона роста в эмбриогенезе человека / Е.В. Бутенко // Студент и научно-технический прогресс: Мат-лы XLIX Международной научной студенческой конференции (Новосибирск, 16-20 апреля 2011 г.). – Новосибирск: Изд-во НГУ, 2011. – С. 162.

5. Шульга, А.С. Оценка системы грелин – гормон роста – инсулиноподобный фактор роста-1 (ИПФР-1) и ИПФР-1-связывающего протеина (ИПФР-1-СП) в материнской и пуповинной крови при беременности физиологической и осложненной гестозом / А.С. Шульга, Е.В. Бутенко, А.И. Гордиенко // Мат-лы 65-й итоговой научной конференции молодых ученых РостГМУ с международным участием (Ростов-на-Дону, 22 апреля 2011 г.). – Ростов-на-Дону. – С. 404-405.
6. Шульга, А.С. Определение уровней лептина и инсулина в материнской и пуповинной крови при беременности физиологической и осложненной гипоксией плода / А.С. Шульга, Е.В. Бутенко, Р.Е. Цыганок // Мат-лы 65-й итоговой научной конференции молодых ученых РостГМУ с международным участием (Ростов-на-Дону, 22 апреля 2011 г.). – Ростов-на-Дону. – С. 405-406.
7. Бутенко, Е.В. Изучение содержания инсулиноподобного фактора роста ИИФР-1-связывающего белка в крови матери на 16-18 и 38-40 неделях развития плода / Е.В. Бутенко, А.С. Шульга, А.А. Александрова, Л.В. Гутникова, Т.П. Шкурят // Модернизация науки и образования: Мат-лы Всероссийской научной конференции (Махачкала, 26-27 апреля 2011 г.). – Ростов-на-Дону – Махачкала, 2011. – С. 30-31.
8. Рымашевский, А.Н. Грелин, лептин и соматотропный гормон при физиологически протекающей беременности / А.Н. Рымашевский, А.В. Шестопапов, А.А. Александрова, Л.В. Гутникова, А.С. Шульга, Е.В. Бутенко, Т.П. Шкурят // Главный врач Юга России. – 2011. – № 3. – С. 42-44.
9. Шестопапов, А.В. Уровень гормонов метаболического баланса в сыворотке крови беременных женщин / А.В. Шестопапов, Е.В. Бутенко, А.А. Александрова, Л.В. Гутникова, А.Е. Самсонов, О.В. Келлер, О.В. Трофименко, А.С. Шульга, А.Н. Рымашевский, Т.П. Шкурят // Журнал акушерства и женских болезней. – 2011. – Т. LX. – № 2. – С. 68-72.
10. Бутенко, Е.В. Изменение концентраций гормонов роста и мобилизации и депонирования энергетических субстратов в крови беременных женщин во втором триместре в норме и при истинной угрозе прерывания беременности [Электронный ресурс] / Е.В. Бутенко, А.С. Шульга, А.В. Шестопапов, А.А. Александрова, Л.В. Гутникова, А.Н. Рымашевский, Т.П. Шкурят // Современные проблемы науки и образования. – 2011. – № 4. URL: www.science-education.ru/98-4735 (дата обращения: 30.09.2011).
11. Бутенко, Е.В. Изменение соотношения концентраций грелина и лептина в крови женщин при физиологическом и патологическом течении беременности / Е.В. Бутенко, А.С. Шульга // Актуальные проблемы биотехнологии, нанотехнологии и медицины: Мат-лы IV Международной научно-практической конференции (Ростов-на-Дону, 22-25 сентября 2011 г.). – Ростов-на-Дону: Изд-во ЮФУ, 2011. – С. 66-67.