

DOI: 10.31393/reports-vnmedical-2018-22(1)-06

УДК: 618.13:616.14-007.63-055.2-092-085-039.73-035.

ОСОБЛИВОСТІ ПОГЛИНАННЯ ГЛЮКОЗИ В ТКАНИНАХ ПЛОДА ПРИ ХРОНІЧНІЙ ГІПОКСЕМІЇ (ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ НА ВІВЦЯХ)

Ошовський В.І.

Медичний центр "Уніклініка" (вул. Героїв Сталінграда, 4, м. Київ, Україна, 04210), НМАПО імені П.Л. Шупика (вул. Дорогожицька, 9, м. Київ, Україна, 04112)

Відповідальний за листування:
e-mail: pirhospr@gmail.com

Статтю отримано 7 грудня 2017 р.; прийнято до друку 15 січня 2018 р.

Анотація. Мета - дослідити розподіл крові та метаболізм глюкози в серці, печінці та мозку під час хронічної гіпоксемії у плодів овець. Розроблено модель вимірювання обмінних процесів при хронічній гіпоксемії плода з використанням вимірювання ПЕТ-КТ у вагітних овець після ятрогенної індукції хронічної гіпоксії плода. За 14 днів до ПЕТ-процедури проведено лазерну коагуляцію плацентарних судин. Після того, як радіоактивну глюкозу було введено в яремну вену вагітної тварини, були виконані послідовні ПЕТ-скани. Поглинання глюкози було проаналізовано в мозку плода, печінці, серці та нирках протягом 60 хвилин після ін'єкції радіоактивного маркера. Тропність глюкози до цих органів вимірювали у порівнянні з поглинанням глюкози плацентою протягом 60 хвилин. У статті представлено аналіз метаболічних змін при гіпоксії у 8 плодів. Резистентність кровоплину в артеріях пуповини була значно більшою в гіпоксемічних плодів порівняно з нормоксемічними. При цьому, індекс пульсації в артеріях пуповини не був суттєво підвищений при гіпоксемії ($1,06 \pm 0,18$ та $1,67 \pm 0,12$, $p=0,018$). Венозні протоки також реагували підвищенням резистентності під час зменшення кількості кисню, яку отримував плід. Так пульсаційний індекс у венозній протоці під час хронічної гіпоксії ($0,62 \pm 0,25$) збільшувався у порівнянні з нормоксемією ($0,41 \pm 0,2$), але незначно. Відносно поглинання ФДГ було в 3,8 рази вище в мозку гіпоксемічних плодів ($0,019 \pm 0,005$) у порівнянні з нормоксемічними ($0,005 \pm 0,002$), ($p=0,02$). Навідміну від цього, гіпоксичне серце плода не показало істотної різниці в поглинанні ФДГ порівняно з нормоксемічним мозком плода ($p=0,11$). Відносно поглинання ФДГ у печінці істотно не відрізнялося між двома групами ($p=0,97$). Таким чином, було показано, що хронічна гіпоксемія плода призвела до зниження перфузії плаценти та збільшення кровотоку в мозку, у той час, як метаболізм глюкози не знижувався у печінці та серці плода.

Ключові слова: гіпоксемія плода, коагуляція судин плаценти, радіоактивна глюкоза, ПЕТ-КТ.

Вступ

Хронічна гіпоксемія плода залишається "terra incognita" і своєрідним викликом для науковців усього світу. Ще на початку 20-го сторіччя була висунута концепція "Everest in Utero", яка мала на меті констатацію факту про те, що плід, перебуваючи в утробі, навіть під час нормального гестаційного процесу знаходиться в стані "відносної гіпоксемії", котра, однак, не призводить до ураження плода, а радше є компенсаторною реакцією, що дозволяє зберігати гомеостаз та зменшувати потреби міокарду та мозкових структур у кисні під час несприятливих внутрішньоутробних подій [4, 5].

Втім, у деяких випадках, наприклад - патології інвазії трофобласту, природні захисні механізми порушуються, що призводить до поглиблення гіпоксемії і можливого перинатального ураження плода [2, 3]. Під час попередніх етапів дослідження нам вдалося продемонструвати, що гостра гіпоксемія плода (на овечій моделі) призводить до зменшення плацентарного і печінкового венозних кровотоків, без істотного зниження рівня надходження глюкози до цих органів, тобто гемодинамічні зміни не призводять до метаболічних зрушень [1]. Метою наступного етапу є вивчення реакцій організму плода на хронічну гіпоксемію.

Позитронно-емісійна томографія (ПЕТ) з радіоактивно міченими трейсерами (аналогом глюкози F-18-фтордезоксиглюкозою (ФДГ)) є адекватним способом дослід-

ження функціонування органів плода в природних умовах. Мета дослідження - вивчити зміни метаболізму глюкози в різних органах плода у вагітних овець під час хронічної гіпоксемії за допомогою ПЕТ-КТ.

Матеріали та методи

Поглинання ФДГ в плаценті, мозку, печінці та серці плода вимірювалося при нормальній оксигенації (5 плодів із нормоксемічної групи I частини експерименту) [1] та при гіпоксемії у 11 плодів овець (2 з котрих із двійні), між 112 і 135 днями вагітності (гестаційний вік) 125 ± 4 днів (середнє \pm SD). Експерименти на тваринах і догляд за ними відбувалися відповідно до вказівок інституційних комітетів і були затверджені місцевими органами етики та радіаційної безпеки. Дослідження було складовою частиною проекту Deutsche Forschungsgemeinschaft Projekt TC 2/4-2: "Investigation of glucose uptake with PET-CT on a fetal sheep model under acute and chronic hypoxia", що проводився в Медичному Університеті м. Майнц (Німеччина).

Для розвитку хронічної плодової гіпоксемії, за 14 днів до очікуваного ПЕТ-КТ аналізу, вагітним тваринам виконувалася фетоскопічна лазерна коагуляція поверхневих судин котиледонів плаценти. Всі операції з фетоскопічної лазерної хірургії проводилися в операційній кімнаті при стерильних умовах та під загальною ане-

тезією. Було застосовано фетоскоп діаметром 1,2 мм (11530AA) з вигнутим троакаром (11530 КБ) з двома робочими каналами (1,6 x 2,9 мм, площа секції: 3,34 мм², Карл Шторц, Тюттлінген, Німеччина). Судинна мапа на поверхні котиледонів ретельно вивчалася з метою виявлення судин, придатних для коагуляції (в середньому до 30% поверхневої судинної мережі). Для коагуляції використано лазерний прилад (Medilas Fibertom 8100, Dornier MedTech, Wessling, Німеччина) з потужністю 50-60 Вт і лазерні провідники діаметром 0,7 мм. Після проведення коагуляції стан плодів вивчався 1 раз на 3-4 доби за допомогою УЗД.

Перед проведенням ПЕТ-КТ тваринам була проведена премедикація 0,25 мг/кг ксілазіна внутрішньом'язево. Після внутрішньовенного введення 1,0 г барбітурату через зовнішній катетер у яремну вену та інтубації, вівцематки були переведені в лежаче положення на правому або лівому боці з метою запобігання стисненню нижньої порожнистої вени таким чином, щоб плоди знаходилися повністю в межах 18 см осевого поля томографа. Вівці були поміщені на грілку (39° С) на час перебування під анестезією, щоб запобігти переохолодженню. Кожна тварина вентильовалася 1,0-1,5% ізофлураном у стандартній комбінації газу O₂/N₂O (2:1). Для забору артеріальної крові під час дослідження ПЕТ була катетеризована одна з вушних артерій матері.

Ультразвукові вимірювання спочатку були проведені в умовах нормоксії, а потім повторені в умовах гіпоксемії. Застосовано кольоровий доплерівський ультразвуковий прилад (GE LOGIQ 9, General Electric, США) з опуклим датчиком (7,5 МГц). Доплерографічні вимірювання проводилися з кутом інсонації 30°. Об'ємна швидкість кровотоку була отримана з урахуванням відповідного діаметру судини й інтенсивності середньої швидкості.

Відносне поглинання ФДГ в мозку, серці та печінці плода визначали на основі підсумованих зображень 40-60 хв., з використанням визначеного вручну досліджуваного об'єму (ДО), зіставленого з середнім рівнем поглинання ФДГ у плаценті.

Тваринам не давали їжу протягом 24 годин до початку кожної сесії ПЕТ, в той час як доступ до води був вільним. Для отримання ПЕТ-КТ зображення використовувалася повнокільцева система високої роздільної здатності Gemini GXL 10 (Philips, Ейндховен, Нідерланди). Вівці були розташовані у бічному положенні на ліжку таким чином, щоб плід знаходився повністю в межах 18 см осевого поля огляду ПЕТ, що визначалося за допомогою ультразвуку. Для корекції анатомічної орієнтації використовувалася комп'ютерний томограф (120 кВ, 40 mAs, товщина зрізу 5 мм). Після чого розпочинався процес динамічної ПЕТ загальною тривалістю 60 хв. (6 x 20 сек., 6 x 30 сек., 5 x 1 хв., 5 x 2 хв., 8 x 5 хв.) у 3-вимірному режимі з одночасною ін'єкцією ФДГ (близько 300 MBq) у зовнішню яремну вену тварини.

Зображення були реконструйовані шляхом використання алгоритму реконструкції 3D-RAMLA у програмному забезпеченні сканера з параметрами за замовчуванням. Просторова роздільна здатність реконструйованих зображень складала максимально близько 9 мм напівширини.

Вушна артерія тварини була катетеризована для забору артеріальної крові під час динамічної ПЕТ. Зразки крові відбиралися вручну один раз на 30 кадрів. Концентрації трейсерів у зразках крові визначалися за допомогою лічильника радіоактивності, який був перехресно калібрований із системою ПЕТ. Зразки крові плода було отримано за допомогою кордоцентезу, виконаного під ультразвуковим контролем. У зразках крові плода було визначено рН і pO₂ під час гіпоксемії.

Криві часо-активності плаценти, головного мозку, серця та печінки плода були отримані шляхом ручного розміщення досліджуваних об'ємів (ДО) у комп'ютерний томограф. Пізні статичні зображення поглинання ФДГ були отримані шляхом підсумовування останніх кадрів динамічної послідовності ПЕТ, які, згідно з візуальним оглядом не мали значного зсуву. Просумовано останні чотири 5-хвилинні кадри з 40-60 хвилин після ін'єкції 18-ФДГ. Коефіцієнти поглинання ФДГ були обчислені з цих підсумованих зображень відносно середнього поглинання ФДГ у 5 плацентах, тобто поглинання ФДГ в досліджуваних об'ємах органів плода було поділено на середнє поглинання ФДГ в досліджуваних об'ємах, розміщених у 5 чітко ідентифікованих плацентах, розташованих поблизу тіла плода, які не виказували жодного збігу з іншими ФДГ-поглинальними структурами у кожній тварини. Плацентами були обрані в якості опорної області через досить високий рівень поглинання ФДГ і в умовах і нормоксії, і в умовах гіпоксемії.

Найбільш часто застосовуваним кількісним методом в клінічній інтерпретації поглинання FDG є стандартне значення поглинання (СЗП), яке можна розрахувати, використовуючи концентрацію FDG у нормованій тканині з урахуванням маси тіла пацієнта. Отримане число є мірою ступеня поглинання FDG у будь-якому органі. Для нашого випробування ми використовували графічний аналіз Гедде-Патлака. Для цього отримано динамічні дані щодо концентрацій FDG у тканинах плода та периферійній крові вагітної тварини.

Графік Гедде-Патлака описується виразом (1):

$$\frac{C_{Tissue}(t)}{C_p(t)} = K \frac{\int_0^t C_p(\tau) d\tau}{C_p(t)} + V \quad (1)$$

Це означає, що активність FDG у тканинах плода розділяється на активність FDG плазми та розподіляється згідно з часовими показниками. Для динамічних систем із необоротними складовими графічне зображення після достатнього часу рівноваги набуває форми прямої, зручної для інтерпретації.

Отримати всі (безперервні) дані, необхідні для проведення ПЕТ у плодів технічно дуже складно. Коефіцієнт Кі лінійної фази являє собою швидкість передачі FDG від матері до плода (кількість накопиченого в тканинах маркера по відношенню до кількості маркера, яка була доступна в плазмі). Було вирішено використовувати саме його, як максимально точний показник поглинання FDG тканинами плода з крові вагітної тварини.

Фізіологічні та доплерографічні параметри плода, а також коефіцієнти поглинання ФДГ у нормальних умовах і в стані гіпоксемії, були порівняні за допомогою непарного t-тесту і тесту ANOVA. Дані представлені у вигляді середнього значення \pm SD. Значення $p < 0,05$ вважалися значущими. Розрахунки були виконані з використанням програмного забезпечення Statistica® версії 8.1 (Statsoft, Tulsa, Оклахома, США).

Результати. Обговорення

Три плоди померли протягом 1 тижня від декомпенсації хронічної гіпоксемії. Ці випадки не були включені до даного аналізу.

Рівень pO_2 та pH крові плода були нижчими в гіпоксемічних плодів у порівнянні з нормоксичними, однак ці відмінності не були статистично значущими (табл. 1). Виявлено вірогідні зміни у концентрації буферних основ із зміщенням у бік дефіциту.

Індекс пульсації у артеріях пуповини був значно збільшений при гіпоксемії ($1,06 \pm 0,18$ та $1,67 \pm 0,12$, $p = 0,018$). PI у венозній протоці під час хронічної гіпоксемії ($0,62 \pm 0,25$) збільшувався, однак, достовірно не відрізнявся від нормоксемічних плодів ($0,41$ $0,2$).

У мозкових структурах плода відносно поглинання ФДГ було приблизно в 3,8 рази вище у гіпоксемічних плодів ($0,019 \pm 0,005$) у порівнянні з нормоксемічними ($0,005 \pm 0,002$), ($p = 0,02$). На противагу цьому, серце та печінка гіпоксемічних плодів не демонстрували значущих змін у поглинанні ФДГ у порівнянні з мозком нормоксичних плодів.

У цьому дослідженні проводилося вимірювання відносного поглинання ФДГ у мозку, серці та печінці нормоксемічних і гіпоксемічних плодів вівці. У порівнянні з використанням винятково ПЕТ, застосування комбінованої технології ПЕТ-КТ спростило ідентифікацію органів плода і плацентом.

Зниження плацентарної перфузії призвело до значущого дефіциту буферних основ та відносного змен-

Таблиця 1. Середні показники (\pm SD) газів крові у нормоксемічних та гіпоксемічних плодів.

Параметр	Нормоксемія (n=5)	Гіпоксемія (n=8)	P value
pH	7.27 ± 0.1	7.19 ± 0.24	0.702
BE (mmol/L)	1.03 ± 2.5	-6.75 ± 2.42	0.049
pO_2 (mm Hg)	40.4 ± 22.1	22.2 ± 12.3	0.451

шення напруги кисню у плодів, достовірного зниження pH пуповинної крові плода не відбулося.

Відмічено значуще підвищення резистентності в артеріях пуповини та тенденція до збільшення опору в венозній протоці. При цьому, поглинання ФДГ в плаценті не було значуще порушено зниженим кровотоком у пуповині. Цей механізм очевидно є важливим для виживання плода в стресових ситуаціях. Відносно поглинання ФДГ, тобто поглинання ФДГ, поділене на середнє поглинання ФДГ у плацентомах, істотно не відрізнялося в серці та печінці плода в гіпоксемічних і нормальних умовах.

На відміну від серця та печінки, у мозкових структурах плода виявилось майже чотириразове збільшення відносного поглинання ФДГ, індуковане хронічною гіпоксією. На нашу думку, збільшення поглинання глюкози в мозку плодів, пов'язане з ранньою і тривалою централізацією кровообігу, є ідентичним до того, яке ми спостерігаємо в плодів людини із ранньою реалізацією затримки росту плода.

Основним обмеженням нашого дослідження є неможливість отримати абсолютну кількість поглинання ФДГ тканинами того чи іншого органу - була доступна тільки відносна оцінка змін її поглинання, заснована на вивченні динаміки ФДГ у крові вагітної тварини.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Результати експерименту можуть свідчити про те, що хронічна гіпоксемія плода у овець призводить до зменшення плацентарного і дуктального кровотоку, а також централізації кровообігу без істотного зниження рівня надходження глюкози до печінки та серця. Зменшення насичення киснем крові плода та дефіцит буферних основ не призводить до значущої зміни її pH.

Перед сучасними акушерами стоїть виклик пошуку нових методів оцінки внутрішньотробного стану плода, оскільки наявні не можуть надати можливості фіксації ранніх метаболічних проявів гіпоксемії.

Список посилань

- Ошовський, В. І. (2017). Особливості поглинання глюкози в тканинах плода при гострій гіпоксії. *Вісник Вінницького національного медичного університету*, 1 (1), 247-252.
- Jensen A, Hohmann M, and Kunzel W. (1987). Redistribution of fetal circulation during repeated asphyxia in sheep: effects on skin blood flow, transcutaneous PO_2 , and plasma catecholamines. *J. Dev. Physiol.*, 9, 41-55.
- Kiserud, T., Rasmussen, S. & Skulstad, S. (2000). Blood flow and the degree of shunting through the ductus venosus in the human fetus. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 182 (1), 147-53. DOI: 10.1016/S0002-9378(00)70504-7.
- Salihu, H. M., Sharma, P. P., Aliyu, M. H., Kristensen, S., Grimes-Dennis, J., Kirby, R. S. & Smulian, J. (2006). Is small for gestational age a marker of future fetal survival in utero? *Obstet. Gynecol.*, 107, 851-6. DOI: 10.1097/01.AOG.0000206185.55324.5b.
- Surkan, P. J., Stephansson, O., Dickman, P. W. & Cnattingius, S. (2004). Previous preterm and small-for-gestational-age births and the subsequent risk of stillbirth. *N. Engl. J. Med.*, 350 (8), 777-85. DOI: 10.1056/NEJMoa031587.

References

1. Oshovskyi, V. I. (2017). Osoblyvosti pohlynannia hliukozy v tkanyakh ploda pry hostrii hipoksii. [Peculiarities of glucose intake in fetal tissues in acute hypoxemia]. *Visnyk Vinnytskoho natsionalnoho medychnoho universytetu - Bulletin of the Vinnytsia National Medical University*, 1 (1), 247-252.
2. Jensen A, Hohmann M, and Kunzel W. (1987). Redistribution of fetal circulation during repeated asphyxia in sheep: effects on skin blood flow, transcutaneous PO₂, and plasma catecholamines. *J. Dev. Physiol.*, 9, 41-55.
3. Kiserud, T., Rasmussen, S. & Skulstad, S. (2000). Blood flow and the degree of shunting through the ductus venosus in the human fetus. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 182 (1), 147-53. DOI: 10.1016/S0002-9378(00)70504-7.
4. Salihu, H. M., Sharma, P. P., Aliyu, M. H., Kristensen, S., Grimes-Dennis, J., Kirby, R. S. & Smulian, J. (2006). Is small for gestational age a marker of future fetal survival in utero? *Obstet. Gynecol.*, 107, 851-6. DOI: 10.1097/01.AOG.0000206185.55324.5b.
5. Surkan, P. J., Stephansson, O., Dickman, P. W. & Cnattingius, S. (2004). Previous preterm and small-for-gestational-age births and the subsequent risk of stillbirth. *N. Engl. J. Med.*, 350 (8), 777-85. DOI: 10.1056/NEJMoa031587.

Ошовский В.И.

ОСОБЕННОСТИ ПОТРЕБЛЕНИЯ ГЛЮКОЗЫ В ТКАНЯХ ПЛОДА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ГИПОКСЕМИИ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НА ОВЦАХ)

Аннотация. Цель - исследовать распределение крови и метаболизм глюкозы в сердце, печени и мозге при хронической гипоксемии у плодов овец. Разработана модель измерения обменных процессов при хронической гипоксемии плода с использованием измерения ПЭТ-КТ у беременных овец после ятрогенной индукции хронической гипоксии плода. За 14 дней до ПЭТ-процедуры проведено лазерную коагуляцию плацентарных сосудов. После того, как радиоактивная глюкоза была введена в яремную вену беременной овцы, были выполнены последовательные ПЭТ-сканы. Поглощение глюкозы было проанализировано в мозге плода, печени, сердце и почках в течение 60 минут после инъекции ФДГ-маркера. Влияние глюкозы на эти органы измеряли в сравнении с поглощением глюкозы плацентомой в течение 60 минут. В статье представлен анализ метаболических изменений при гипоксии у 8 плодов. Резистентность кровотока в артериях пуповины была значительно выше у гипоксемических плодов по сравнению с нормоксемичными. При этом, индекс пульсации в артериях пуповины не был существенно повышен при гипоксемии ($1,06 \pm 0,18$ и $1,67 \pm 0,12$, $p=0,018$). Венозные протоки также реагировали повышением резистентности при уменьшении количества кислорода, который получал плод. Так пульсационный индекс в венозном протоке при хронической гипоксии ($0,62 \pm 0,25$) увеличивался по сравнению с нормоксемией ($0,41 \pm 0,2$), но незначительно. Относительное поглощение ФДГ было в 3,8 раза выше в мозге гипоксемических плодов ($0,019 \pm 0,005$) по сравнению с нормоксемическими ($0,005 \pm 0,002$), ($p=0,02$). В отличие от этого, гипоксическое сердце плода не показало существенной разницы в поглощении ФДГ по сравнению с нормоксемическим мозгом ($p = 0,11$). Относительное поглощение ФДГ в печени существенно не отличалось между двумя группами ($p=0,97$). Таким образом, было показано, что хроническая гипоксемия плода привела к снижению перфузии плаценты и увеличение кровотока мозга, хотя метаболизм глюкозы не снижался в печени и сердце плода.

Ключевые слова: гипоксемия плода, коагуляция сосудов плаценты, радиоактивная глюкоза, ПЭТ-КТ.

Oshovsky V.I.

PECULIARITIES OF GLUCOSE INTAKE IN FETAL TISSUES IN CHRONIC HYPOXEMIA (EXPERIMENTAL STUDY ON SHEEP)

Annotation. Objective - to investigate fetal blood distribution and glucose metabolism of heart, liver and brain during chronic hypoxaemia. Establishment of a model of real time measurement of the metabolic changes during chronic fetal hypoxaemia using PET-CT measurement in pregnant sheep after iatrogenic induction of chronic fetal hypoxaemia. Laser coagulation of placental vessels was performed in pregnant sheep in order to cause fetal hypoxaemia 14 days before the PET-procedure. The following PET-Scans were performed after 18F-FDG was injected into the jugular vein of the sheep. Fetal glucose uptake was scanned in fetal brain, liver, heart and kidneys during a period of 60 min after injection of the FDG tracer. Glucose uptake of these organs was measured in comparison with placental glucose uptake during the above-called 60 minutes course. Here we present the analysis of the metabolic changes in fetal hypoxaemia in a small series of 8 fetal sheep. It was found that FDG Uptake in the placenta, brain, liver and heart of the fetus was measured at normal oxygenation and in chronic hypoxia in 8 sheep fetuses, between 112 and 135 days of pregnancy (gestational age) 125 ± 4 days (mean \pm SD). Umbilical cord artery resistance was significantly higher in hypoxemic fetuses compared to normoxemic. Venous duct reactions as a respond to hypoxia was observed. Index of pulsation in the umbilical artery was not significantly increased during hypoxia ($1,06 \pm 0,18$ та $1,67 \pm 0,12$, $p=0,018$). PI in venous duct during chronic hypoxia ($0,62 \pm 0,25$) was increased in compare with normoxemic ($0,41 \pm 0,2$), but not significantly. Relative FDG uptake was about 3.8 times higher in brain of hypoxemic fetuses (0.019 ± 0.005) compared to normoxemic (0.005 ± 0.002), ($p=0,02$). In contrast, hypoxic fetal heart showed no significant difference in absorption of FDG compared to normoxemic fetal brain ($p=0,11$). Relative FDG uptake in the liver did not differ substantially between the two groups ($p=0,97$). Thus, it was shown that chronic maternal hypoxemia led to decreased placental and increased brain blood flow, although, glucose metabolism was not decreased in the fetal liver and heart.

Key words: fetal hypoxemia, coagulation of placental vessels, radioactive glucose, PET-CT.