

# ВЛИЯНИЕ ПЕРИНАТАЛЬНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ АЛКОГОЛЯ НА АМИНОКИСЛОТНЫЙ СПЕКТР СЫВОРОТКИ КРОВИ БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН И ИХ ПОТОМСТВА

## **А.В. Скальный**

д.м.н., профессор, вед. эксперт, Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова; зав. кафедрой медицинской элементологии, Российский университет дружбы народов (Москва); директор, Институт биоэлементологии, Оренбургский государственный университет  
E-mail: skalny3@microelements.ru

## **Ю.Н. Лобанова**

к.б.н., ст. преподаватель, кафедра медицинской элементологии медицинского института, Российский университет дружбы народов (Москва)  
E-mail: lobanova\_ju@mail.ru

## **А.Р. Грабеклис**

к.б.н., вед. эксперт, Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова  
E-mail: andrewgrabeklis@gmail.com

## **Е.В. Кияева**

к.м.н., ст. науч. сотрудник, Институт биоэлементологии, Оренбургский государственный университет  
E-mail: elena\_sap@mail.ru

## **А.А. Тиньков**

к.м.н., вед. эксперт, Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова  
E-mail: tinkov.a.a@gmail.com

Изучен аминокислотный спектр сыворотки крови беременных женщин, злоупотребляющих алкоголем, и их детей. Определены концентрации аминокислот методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Сделано предположение, что наблюдаемые дисбалансы частично обуславливают нарушения развития организма, ассоциированные с перинатальным воздействием алкоголя.

**Ключевые слова:** беременность, младенцы, алкоголь, аминокислотный спектр, сыворотка крови.

Алкогольная зависимость является одним из наиболее распространенных психических нарушений во всем мире [1]. Распространенность злоупотребления алкоголем в США, Великобритании, Германии и КНР составляет 16,9, 28, 12,5, и 7,6% соответственно. В Российской Федерации количество потребляемого алкоголя резко возросло с 1990 по 2010 гг., достигая 19,1% у населения старше 15 лет [2].

Алкогольная зависимость связана с 25 хроническими заболеваниями [3], включая различные формы рака, сердечно-сосудистые заболевания (гипертензия, геморрагический инсульт), заболевания печени (алкогольный гепатит, цирроз и стеатогепатоз), а также панкреатит [4]. При этом мозг является одной из основных мишеней токсического воздействия алкоголя [5]. Токсическое влияние этанола на организм также может реализовываться по-

средством развития дефицита микронутриентов вследствие нарушения переваривания, всасывания, утилизации или интенсификации деградации [6].

Социальная и медицинская значимость алкоголизма у женщин обусловлена негативными эффектами алкоголя на организм плода (задержка роста, нарушения строения черепа, нарушения интеллекта), объединяемыми в алкогольный синдром плода [7]. Учитывая роль микронутриентов в развитии плода в целом и центральной нервной системы в частности, справедливо предположить, что алкоголь-индуцированное нарушение обмена микронутриентов может являться одним из механизмов развития алкогольного синдрома плода. Подобный механизм был ранее продемонстрирован в отношении цинка [8]. В то же время данные о воздействии этанола на обмен аминокислот в организме матери и потомства недостаточны.

Цель работы – изучение аминокислотного спектра сыворотки крови беременных женщин, злоупотребляющих алкоголем, и их детей.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Обследование проводилось в соответствии с принципами и этическими нормами, установленными Хельсинской декларацией. Перед исследованием было получено информированное согласие женщин на участие в исследовании как их самих, так и их детей.

Обследовано 30 беременных женщин (возраст  $24 \pm 3$ ), из которых 15 страдали хроническим алкоголизмом, а также 30 детей в возрасте одного года, подверженных и неподверженных перинатальному воздействию этанола соответственно. Достоверных различий в возрасте, росте и массе тела у женщин различных групп выявлено не было. В исследовании принимали участие только женщины с физиологически протекающей беременностью и физиологическими родами. Все обследуемые дети находились на грудном вскармливании, поскольку использование смесей может оказывать существенное влияние на исследуемые параметры. Образцы крови для анализа брали у женщин в третьем триместре во время регулярного скрининга, у детей – в присутствии родителей, во время диспансеризации в возрасте одного года.

Забор крови осуществляли с использованием пробирок-контейнеров с активатором свертывания в виде геля или гранул. После взятия крови пробирки мягко переворачивали не менее пять раз с последующим центрифугированием 1500 об/мин 15 мин. Полученную сыворотку отбирали в микропробирку типа эппендорф. Далее все пробы хранили при температуре  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  вплоть до проведения пробоподготовки и ВЭЖХ-анализа, осуществляемых в АНО «Центр биотической медицины» (Москва). Пробоподготовку образцов сыворотки при выделении аминокислот проводили, усовершенствовав метод компании Waters (США). При этом вместо обращенно-фазных колонок Рисо-Тэг использовали картриджи, содержащие специальный сорбент на основе пористого кремнезема, поверхностно модифицированного слоем фторопласта. Концентрации выделенных аминокислот определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием хроматографа Perkin Elmer S200 («Perkin Elmer», США).

Полученные данные обрабатывали с использованием программного пакета Statistica 10.0 («Statsoft», США). Результаты не характеризовались нормальным распределением в соответствии с результатами теста Шапиро–Уилка, в связи с чем в качестве описательных статистик использовали медиану и 25–75 перцентили. Погрупповое сравнение проводили с использованием U-критерия Манна–Уитни, корреляционный анализ – коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Результаты используемых статистических тестов считались достоверными при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные свидетельствуют о влиянии избыточного употребления алкоголя на аминокислотный спектр сыворотки крови беременных женщин (табл. 1). Так, у женщин, употребляющих алкоголь, отмечалось достоверное снижение концентрации аргинина и глутамата на 25 и 33% соответственно относительно контроля. Несмотря на то, что различия в концентрации других исследуемых аминокислот не являлись достоверными, отмечена выраженная тенденция к снижению уровня таурина и повышению концентрации тирозина и глицина в сыворотке крови беременных женщин, злоупотребляющих алкоголем.

Установлено, что перинатальное воздействие алкоголя приводит к выраженным изменениям концентрации аминокислот сыворотки у детей (табл. 2). Как и у беременных женщин, у детей, подвергшихся перинатальному воздействию алкоголя было выявлено достоверное 42 и 29%-ное снижение концентрации глутамата и серина в сыворотке крови. Отмечено наличие близкого к достоверному снижению концентраций аланина, аспарагина и гидроксипролина вследствие перинатального воздействия алкоголя на 17, 36, 31% соответственно.

Корреляционный анализ (табл. 3) продемонстрировал взаимосвязь между концентрацией аминокислот в сыворотке крови общей выборки матерей и их потомства. Так, достоверная прямая корреляция отмечалась в случае аргинина, глутамата и валина.

Полученные данные свидетельствуют о том, что злоупотребление алкоголем во время беременности приводит к наиболее выраженным нарушениям обмена глутамата, аргинина и серина.

**Таблица 1. Концентрация аминокислот (мкмоль/л) в сыворотке крови беременных женщин с избыточным потреблением алкоголя и здоровых беременных группы контроля**

Аминокислота	Контроль (n = 15)			Алкоголь (n = 15)			
	Медиана	25	75	Медиана	25	75	p
Аланин	321,3	265,0	347,6	297,3	241,0	347,2	0,631
Аргинин	107,6	95,8	164,7	81,2	57,5	116,2	0,036*
Аспарагин	69,2	49,1	88,2	67,2	48,0	74,2	0,256
Аспартат	11,9	6,5	12,8	10,3	7,3	12,8	1,000
Глутамат	47,8	37,3	55,7	32,2	25,1	45,1	0,036*
Глицин	371,6	232,7	414,3	431,6	375,1	488,1	0,190
Гистидин	40,4	35,5	75,2	45,4	42,4	53,6	0,513
Гидроксипролин	9,0	7,6	13,2	9,2	7,0	12,3	0,570
Метионин	41,7	20,7	53,9	46,4	23,5	66,4	0,600
Серин	85,8	68,1	118,0	83,2	62,3	90,6	0,513
Таурин	48,5	31,1	83,2	33,6	30,9	50,1	0,275
Треонин	90,6	79,0	141,5	121,9	73,1	150,8	0,513
Тирозин	64,2	44,2	91,4	91,7	64,1	98,2	0,116
Валин	107,3	100,3	117,2	109,0	78,0	165,1	0,662

Примечание: данные представлены в виде медианы и 25–75 перцентилей; \* – достоверность различий при  $p < 0,05$  (U-тест Манна-Уитни).

**Таблица 2. Концентрация аминокислот (мкмоль/л) в сыворотке крови детей, подверженных перинатальному воздействию алкоголя, и контрольных обследуемых**

Аминокислота	Контроль (n = 15)			Алкоголь (n = 15)			
	Медиана	25	75	Медиана	25	75	p
Аланин	327,8	276,1	399,5	271,9	198,8	343,0	0,074
Аргинин	68,3	54,6	92,5	66,3	55,6	78,5	0,590
Аспарагин	97,4	47,7	119,6	61,4	45,8	78,7	0,056
Аспартат	13,8	7,4	24,1	10,7	8,7	12,9	0,213
Глутамат	72,8	69,1	92,8	45,1	39,5	69,7	0,002*
Глицин	375,9	250,6	589,2	369,0	228,5	417,0	0,407
Гистидин	64,3	42,5	100,0	49,4	42,7	71,0	0,507
Гидроксипролин	16,2	10,6	24,0	11,1	9,2	16,7	0,074
Метионин	34,2	24,1	60,9	38,7	32,8	56,2	0,590
Серин	107,6	83,4	136,2	76,5	67,6	86,0	0,002*
Таурин	57,0	40,6	86,2	40,6	31,2	85,9	0,561
Треонин	80,9	59,7	135,8	72,0	64,1	89,5	0,213
Тирозин	95,0	33,6	138,5	73,9	50,7	91,8	0,115
Валин	112,1	84,3	168,2	112,1	100,6	140,5	0,967

Примечание: см. табл. 1.

**Таблица 3. Корреляционный анализ взаимоотношений между уровнем аминокислот в сыворотке крови общей когорты матерей и потомства**

Аминокислота	<i>r</i>	<i>p</i>
Аланин	-0,173	0,368
Аргинин	0,443	0,016
Аспарагин	-0,237	0,215
Аспаргат	-0,098	0,614
Глутамат	0,584	0,001
Глицин	0,021	0,915
Гистидин	0,265	0,165
Гидроксипролин	-0,011	0,955
Метионин	0,213	0,267
Серин	0,143	0,459
Таурин	0,273	0,152
Треонин	0,204	0,288
Тирозин	0,238	0,213
Валин	0,461	0,012

Ранее проведенные исследования продемонстрировали нарушение аминокислотного спектра у лиц, злоупотребляющих алкоголем, однако характер данных изменений существенно варьировал. Так, было отмечено снижение концентрации аминокислот с разветвленной цепью на фоне повышения уровня ароматических аминокислот [9]. Выявленное снижение концентрации триптофана у алкоголиков было связано со склонностью к агрессии и депрессии посредством взаимосвязи с нарушением обмена серотонина [10]. У пациентов с алкогольной болезнью печени отмечено повышение концентрации метионина и фенилаланина на фоне снижения уровня лейцина, изолейцина и валина по сравнению с контрольными значениями [11]. В то же время результаты исследования влияния острого воздействия этанола показали, что

через 60 мин после приема этанола в материнской плазме наблюдалось повышение концентрации глутамата на фоне снижения уровней глутамина, цитруллина, лейцина, валина, аминокислот с разветвленными боковыми цепями, серина и аспарагина. При этом в плазме плода выявлено достоверное повышение уровня глутамина без значимых изменений уровня глутамата на фоне снижения концентраций аспарагина и триптофана [12]. Таким образом, имеющиеся данные свидетельствуют о высоком риске нарушения обмена аминокислот в организме в условиях воздействия этанола, тогда как различия в характере подобных нарушений могут быть обусловлены особенностями клиники.

Наиболее выраженным как у беременных женщин, злоупотребляющих этанолом, так и у их потомства являлся дефицит глутамата в сыворотке крови. Ранее проведенные исследования продемонстрировали, что нейротоксичность этанола ассоциирована с нарушением глутаматергических механизмов в центральной нервной системе [13]. Так, у пациентов с алкоголизмом и ремиссией отмечалось повышение уровня глутамата на фоне снижения глутамата по сравнению с контролем [14]. Отметим, что нарушение обмена глутамата в центральной нервной системе сопровождается повышением тяги к алкоголю. При этом экспериментальными данными продемонстрировано, что прием L-глутамата (продукт аминирования глутамата) наряду с воздействием алкоголя во время беременности предотвращает этанол-индуцированное снижение массы тела и других морфометрических показателей и нарушение биодоступности аминокислот у потомства [15]. Также было продемонстрировано протективное влияние пренатального приема глутамата на гемодинамику и кислотно-основной гомеостаз плода в условиях воздействия этанола [16].

Глутамат играет важную роль в регуляции дифференцировки, миграции и жизнеспособности нейронов в развивающемся мозге, причем блокада NMDA рецепторов (в том числе и этанолом) во время эмбриогенеза приводит к индукции апоптоза в незрелых нейронах [17]. Таким образом, развитие дефицита глутамата вследствие перинатального воздействия алкоголя может являться одним из механизмов развития алкогольного синдрома плода.

Несмотря на отсутствие достоверных погрупповых различий в концентрации аргинина у беременных женщин, наличие прямой корреляции между материнскими и детскими показателями

свидетельствует о причинно-следственной взаимосвязи между воздействием этанола на материнский и детский организмы и формированием дефицита аргинина у потомства. Так, было установлено торможение плацентарного транспорта аргинина под влиянием этанола, в то время как продукция оксида азота характеризовалась повышением [18].

Серин также играет важнейшую роль в период развития организма, являясь одним из источников образования нуклеотидов в периоды активного роста как *in vivo*, так и *in vitro* [19]. Хотя обмен серина в организме плода крайне высок, подавляющее большинство нуклеотидов синтезируется из глицина печени [20]. Несмотря на отсутствие достоверных погрупповых различий в концентрации серина в сыворотке женщин, дети, подверженные перинатальному воздействию алкоголя, характеризовались снижением уровня серина. Данное наблюдение может являться как следствием перинатального воздействия алкоголя, так и постнатальных факторов (диета).

## ВЫВОДЫ

1. Злоупотребление алкоголем беременными женщинами приводит к достоверному снижению концентраций аргинина и глутамата в сыворотке крови, а также последующему развитию дефицита глутамата и серина в периферической крови потомства. При этом концентрации аргинина, глутамата и валина в материнской и детской сыворотке характеризуются достоверной прямой корреляцией.
2. Учитывая роль данных аминокислот в развитии организма в целом и центральной нервной системы в частности, справедливо предположить, что наблюдаемые дисбалансы по крайней мере частично обуславливают нарушения развития, ассоциированные с перинатальным воздействием алкоголя.

*Исследование выполнено при поддержке РФФИ в рамках выполнения проекта «Донозологическая оценка патологии детей, рожденных от родителей, злоупотребляющих алкоголем, на основе изучения особенностей метаболического профиля» (15-04-08621).*

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Grant B.F., Goldstein R.B., Saha T.D., et al. Epidemiology of DSM-5 alcohol use disorder: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions III // JAMA psychiatry. 2015. V. 72. № 8. P. 757–766.
2. World Health Organization. Global status report on alcohol 2011. 2011. Country profiles–Russian Federation (the) [http://www.who.int/substance\\_abuse/publications/global\\_alcohol\\_report/profiles/rus.pdf](http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/profiles/rus.pdf), 21.
3. Shield K.D., Parry C., Rehm J. Chronic diseases and conditions related to alcohol use // Alcohol Research: Current Reviews. 2014. V. 35. № 2. P. 155.
4. Parry C.D., Patra J., Rehm J. Alcohol consumption and non-communicable diseases: epidemiology and policy implications // Addiction. 2011. V. 106. № 10. P. 1718–1724.
5. Mukherjee S. Alcoholism and its effects on the central nervous system // Current neurovascular research. 2013. V. 10. № 3. P. 256–262.
6. Lieber C.S. Hepatic, metabolic, and nutritional disorders of alcoholism: from pathogenesis to therapy // Critical reviews in clinical laboratory sciences. 2000. V. 37. № 6. P. 551–584.
7. Roozen S., Peters G.J., Kok G., Townend D., Nijhuis J., Curfs L. Worldwide prevalence of fetal alcohol spectrum disorders: a systematic literature review including meta-analysis // Alcohol. Clin. Exp. Res. 2016. V. 40. P. 18–32.
8. Keen C.L., Uriu-Adams J.Y., Skalny A., Grabeklis A., Grabeklis S., Green K., Chambers C.D. The plausibility of maternal nutritional status being a contributing factor to the risk for fetal alcohol spectrum disorders: the potential influence of zinc status as an example // Biofactors. 2010. V. 36. № 2. P. 125–135.
9. Shaw S., Lieber C.S. Plasma amino acids in the alcoholic: nutritional aspects // Alcohol. Clin. Exp. Res. 1983. V. 7. № 1. P. 22–27.
10. Branchey L., Branchey M., Shaw S., Lieber C.S. Depression, suicide, and aggression in alcoholics and their relationship to plasma amino acids // Psychiatry research. 1984. V. 12. № 3. P. 219–226.
11. Mukherjee S., Vaidyanathan K., Vasudevan D.M., Das S.K. Role of plasma amino acids and gaba in alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease—a pilot study // Indian Journal of Clinical Biochemistry. 2010. V. 25. № 1. P. 37–42.
12. Washburn S.E., Sawant O.B., Lunde E.R., Wu G., Cudd T.A. Acute alcohol exposure, acidemia or glutamine administration impacts amino acid homeostasis in ovine maternal and fetal plasma // Amino acids. 2013. V. 45. № 3. P. 543–554.
13. Roberto M., Bajo M., Crawford E., Madamba S.G., Siggins G.R. Chronic ethanol exposure and protracted abstinence alter NMDA receptors in central amygdala // Neuropsychopharmacology. 2006. V. 31. № 5. P. 988.
14. Thoma R., Mullins P., Ruhl D., Monnig M., Yeo R.A., Caprihan A., Gasparovic C. Perturbation of the glutamate–glutamine system in alcohol dependence and remission // Neuropsychopharmacology. 2011. V. 36. № 7. P. 1359.
15. Sawant O.B., Wu G., Washburn S.E. Maternal L-glutamine supplementation prevents prenatal alcohol exposure-induced fetal growth restriction in an ovine model // Amino acids. 2015. V. 47. № 6. P. 1183–1192.
16. Sawant O.B., Ramadoss J., Hankins G.D., Wu G., Washburn, S.E. Effects of L-glutamine supplementation on maternal and fetal hemodynamics in gestating ewes exposed to alcohol // Amino acids. 2014. V. 46. № 8. P. 1981–1996.
17. Meldrum B.S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology // The Journal of nutrition. 2000. V. 130. № 4. P. 1007–1015.

18. *Acevedo C.G., Carrasco G., Burotto M., Rojas S., Bravo I.* Ethanol inhibits L-arginine uptake and enhances NO formation in human placenta // *Life sciences*. 2001. V. 68. № 26. P. 2893–2903.
19. *Kalhan S.C., Gruca L.L., Parimi P.S., O'Brien A., Dierker L., Burkett E.* Serine metabolism in human pregnancy // *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2003. V. 284. № 4. P. 733–740.
20. *Kalhan S.C., Hanson R.W.* Resurgence of serine: an often neglected but indispensable amino acid // *Journal of Biological Chemistry*. 2012. V. 287. № 24. P. 19786–19791.

Поступила 6 марта 2017 г.

## THE INFLUENCE OF THE PERINATAL ALCOHOL ON THE AMINO-ACID RANGE OF BLOOD SERUM OF PREGNANT WOMEN AND THEIR OFFSPRING

© Authors, 2017

### A.V. Skalny

Dr.Sc. (Med.), Professor, Leading Expert, P.G. Demidov Yaroslavl State University; Head of Department, RUDN University (Moscow); Director, Institute of Bioelementology, Orenburg State University  
E-mail: skalny3@microelements.ru

### Y.N. Lobanova

Ph.D. (Biol.), Senior Lecturer, RUDN University (Moscow)  
E-mail: lobanova\_ju@mail.ru

### A.R. Grabeklis

Ph.D. (Biol.), Leading Expert, P.G. Demidov Yaroslavl State University  
E-mail: andrewgrabeklis@gmail.com

### E.V. Kiyaeva

Ph.D. (Med.), Senior Research Scientist, Institute of Bioelementology, Orenburg State University  
E-mail: elena\_sap@mail.ru

### A.A. Tinkov

Ph.D. (Med.), Leading Expert, P.G. Demidov Yaroslavl State University  
E-mail: tinkov.a.a@gmail.com

The primary objective of this study was to assess the amino acid spectrum of blood serum of the pregnant women abusing alcohol and their children. 30 pregnant women (the 3<sup>rd</sup> trimester, an age 24±3) were examined, including 15 suffered from alcohol abuse, and 30 children aged 1 year, who were exposed to perinatal ethanol influence and those who were not. Amino acid concentrations were determined by high performance liquid chromatography using a PerkinElmer S200 chromatograph (Perkin Elmer, USA) after carrying out sample preparation using cartridges containing a special sorbent based on porous silica, surface modified with a layer of fluoroplastic. In women with alcohol abuse, there was a significant decrease in the concentration of arginine and glutamate by 25% and 33% relative to control, respectively. As in pregnant women, children who underwent perinatal exposure to alcohol had a significant 42% and 29% reduction in glutamate and serine serum concentrations. The presence of a close to significant decrease in the concentration of alanine, asparagine and hydroxyproline, due to perinatal exposure to alcohol by 17%, 36%, and 31% was revealed. A reliable direct correlation between maternal and children's indexes was noted in the case of arginine, glutamate and valine. The results of the study showed that the abuse of alcohol by pregnant women leads to a significant decrease in the concentration of arginine and glutamate in the serum, and the subsequent development of glutamate and serine deficiency in the blood of offspring. In this case, the concentration of arginine, glutamate and valine in the maternal and infant serum is characterized by a reliable direct correlation. Considering a role of these amino acids in development of an organism in general and the central nervous system in particular, it is fair to assume that observed imbalances at least partially cause the development violations associated with the perinatal influence of alcohol.

**Key words:** pregnancy, children, alcohol, amino-acid range, blood serum.