

Оригинальное исследование

УДК: 618.393-079.5

<https://doi.org/10.21886/2219-8075-2022-13-3-155-160>

## Органические кислоты в оценке клеточной митохондриальной функции при неразвивающейся беременности

И. М. Ордянец, С. С. Барабашева, О. К. Молчанова, Д. Р. Асатрян

Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

Автор, ответственный за переписку: Молчанова Ольга Константиновна, [olgamolchanova1994@yandex.ru](mailto:olgamolchanova1994@yandex.ru)

**Аннотация.** Цель: определить прогностическую значимость низкомолекулярных метаболитов у женщин с неразвивающейся беременностью. **Материалы и методы:** в исследовании приняли участие 100 женщин репродуктивного возраста, из них 79 с неразвивающейся беременностью, диагностированной с помощью ультразвукового исследования, и 21 — с прогрессирующей беременностью, которые были госпитализированы для искусственного прерывания беременности. Всем женщинам было проведено иммуногистохимическое исследование эндометрия, органические кислоты в сыворотке крови и эндометрии определялись методом ВЭЖХ. Также определялись достоверно значимые органические кислоты в сыворотке крови и эндометрии, связанные с нарушениями обмена жирных кислот, аминокислот, а также промежуточных метаболитов в цикле Кребса. Статистический анализ полученных данных проводился с использованием пакета модулей STATISTICA® для Windows, выпуск 6.0 от StatSoft® Inc., США (2003), серийный номер AXAR802D898511FA. **Результаты:** были выявлены статистически значимые изменения в профиле органических кислот у женщин с неразвивающейся беременностью, такие как повышенные уровни 4-гидроксифенилуксусной кислоты, изменение соотношения лактат/пируват в сыворотке и эндометрии в сочетании с морфоиммуногистохимическими особенностями (выраженные очаговые некрозы, венозное полнокровие, лимфогистиоцитарная инфильтрация, повышенные уровни экспрессии HLA-DR, CD 16, CD20, сниженные экспрессии VEGF и LIF). **Выводы:** в патогенезе НБ лежит универсальный механизм патологических процессов — митохондриальная дисфункция. Определение 4-гидроксифенилуксусной кислоты, изменение соотношения лактат/пируват в сыворотке крови и эндометрии являются чувствительными метаболитами функционирования митохондрий и отражают структурно-функциональную неполноценность эндометрия и плохой прогноз течения и исхода последующей беременности.

**Ключевые слова:** неразвивающаяся беременность, ранние репродуктивные потери, органические кислоты, низкомолекулярные метаболиты

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Для цитирования:** Ордянец И. М., Барабашева С. С., Молчанова О. К., Асатрян Д. Р. Органические кислоты в оценке клеточной митохондриальной функции при неразвивающейся беременности. *Медицинский вестник Юга России.* 2022;13(3):155-160. DOI 10.21886/2219-8075-2022-13-3-155-160

## Organic acids in the evaluation of cell mitochondrial function in underground pregnancy

I. M. Ordinyants, S. S. Barabasheva, O. K. Molchanova, D. R. Asatryan

Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

Corresponding author: Olga K. Molchanova, [olgamolchanova1994@yandex.ru](mailto:olgamolchanova1994@yandex.ru)

**Abstract. Objective:** to determine prognostic significance of low molecular weight metabolites in women with missed abortion. **Material and methods:** the research included 100 women of reproductive age, 79 of them with missed abortion diagnosed by ultrasound and 21 with progressive pregnancy who were admitted for an artificial abortion. All women underwent immunohistochemical studies of the endometrium and organic acids in blood serum and endometrium were determined by HPLC. Reliably significant organic acids in blood serum and endometrium, associated with metabolic disorders of fatty acids, amino acids, as well as intermediate metabolites in the Krebs cycle. Statistical analysis of the obtained data was performed using the STATISTICA® for Windows, Release 6.0 module package from StatSoft® Inc., USA (2003), serial number AXAR802D898511FA. **Results:** statistically significant changes were revealed in the profile of organic acids in the studied women at the levels of lactic, pyruvic and 4-hydroxyphenylpyruvic acids. In women with missed abortion, the change in the lactate / pyruvate. In all women with missed abortion, 4-hydroxyphenylacetic were determined, in contrast to women with a progressing pregnancy, combined with morpho-immuno-histochemical features (pronounced focal necrosis, venous fullness, lymphohistiocytic infiltration, increased levels of HLA-DR, CD 16, CD20 expression, reduced VEGF and LIF expression). **Conclusion:** missed abortion is associated with the accumulation of intermediate metabolites of tyrosine catabolism (4-hydroxyphenylacetic, 4-hydroxyphenylpyruvic and

homogentizic acids), which, despite normal levels of TSH and T4, may reflect organ dysfunction. Timely correction of iodine deficiency in the pre-conception period after missed abortion can be a criterion for a successful subsequent pregnancy. Overcoming iodine deficiency potentiates the possibility of a conceptual restoration of fertility after a previous NB.

**Keywords:** missed abortion, early reproductive losses, organic acids and low molecular weight metabolites

**Financing.** The study did not have sponsorship.

**For citation:** Ordiyants I. M., Barabasheva S. S., Molchanova O. K., Asatryan D. R. Organic acids in the evaluation of cell mitochondrial function in underground pregnancy. *Medical Herald of the South of Russia*. 2022;13(3):155-160. DOI 10.21886/2219-8075-2022-13-3-155-160

### Введение

Среди важнейших проблем практического акушерства одно из первых мест занимает невынашивание беременности, частота которого составляет 20%. [1]. Практически теряется каждая 5-я беременность, и это не имеет тенденции к снижению, несмотря на многочисленные и высокоэффективные методы диагностики и лечения, разработанные в последние годы [2,3]. Поистине «проблемой века» следует считать неразвивающуюся беременность (НБ). Международная федерация акушеров-гинекологов (FIGO) в 2006 г. объявила НБ современной эпидемией. В настоящее время нет единого предиктора к развитию НБ. У 40–50% беременных точная причина НБ не установлена [4].

Не вызывает сомнений, что в основе НБ лежит дисфункция эндометрия. Именно способность эндометрия адекватно реагировать на циклические колебания уровня стероидных гормонов крови приводит к формированию необходимых ультраструктурных изменений в эндометрии для возникновения «окна имплантации» и в конечном результате обеспечивает имплантацию оплодотворенной яйцеклетки, наступление и развитие беременности [2,5].

Существует множество доказательств, свидетельствующих о том, что патогенез ранних репродуктивных потерь тесно связан с окислительным стрессом (ОС), изменениями протеомного спектра, нарушением липидного обмена, снижением активности ферментов дыхательной цепи, возникающими в митохондриях [6, 7]. И хотя патофизиология, лежащая в основе осложнений гестации, различна, изменения в структуре и функциях митохондрий являются во всех случаях общей терминальной стадией гибели клеток и могут быть мишенью для фармакотерапии.

Являясь неотъемлемой частью системной биологии, метаболомика обладает многочисленными преимуществами по сравнению с традиционными лабораторными исследованиями, изучение органических кислот (ОК) приобретает всё больший научный интерес, поскольку ОК являются важными компонентами метаболизма и играют особо важную роль в выработке клеточной энергии. ОК в основном отражают функционирование митохондрий и окисление жирных кислот, которое происходит в процессе дыхания клетки.

**Цель исследования** — определить прогностическую значимость низкомолекулярных метаболитов в патогенезе неразвивающейся беременности.

### Материалы и методы

В исследование были включены 100 женщин репродуктивного возраста, из них 79 — с диагностированной

при УЗИ неразвивающейся беременностью и 21 — с прогрессирующей беременностью, поступивших на артифициальный аборт. Критериями включения были репродуктивный возраст, неразвивающаяся беременность, подтвержденная при УЗИ. Критериями исключения стали пороки развития органов малого таза, антифосфолипидный синдром (АФС), системные заболевания.

Произведены иммуногистохимические исследования эндометрия и определение органических кислот в сыворотке крови и эндометрии методом ВЭЖХ. Проанализированы статистически значимые органические кислоты в сыворотке крови и эндометрии, связанные с нарушениями обмена жирных кислот, аминокислот, а также являющиеся промежуточными метаболитами в цикле Кребса.

Статистический анализ полученных данных выполнен с помощью пакета модулей STATISTICA® for Windows, Release 6.0 компании StatSoft® Inc., США (2003), серийный номер AXAR802D898511FA.

### Результаты

Клинико-статистический анализ подтвердил сопоставимость групп по возрасту, социальному положению, соматическим и гинекологическим заболеваниям. Диагноз НБ при поступлении устанавливался на основании результатов ультразвукового исследования (отсутствие эмбриона при размерах плодного яйца 25 мм и более при трансабдоминальном сканировании и 18 мм и более при трансвагинальном сканировании, отсутствие сердцебиения эмбриона с копчиком-теменным размером 5 мм и более).

Средний возраст пациенток с НБ в момент обследования составил  $29,8 \pm 5,8$  лет, четверть из них находилась в позднем репродуктивном возрасте (старше 35 лет).

Нами были проанализированы уровни 11 низкомолекулярных метаболитов в сыворотке крови и эндометрии, являющиеся субстратами цикла Кребса и  $\beta$ -окисления жирных кислот, играющие важную роль в выработке клеточной энергии. Из 11 изученных ОК гликолевая и адипиновая не имели статистически значимых различий между группами. Уровень гликолевой кислоты при НБ составил  $5,8 \pm 4,8$  ммоль/л, а при прогрессирующей беременности —  $4,8 \pm 3,2$  ммоль/л ( $p=0,102$ ), адипиновой —  $0,10 \pm 0,3$  ммоль/л и  $0,24 \pm 0,5$  ммоль/л соответственно ( $p=0,101$ ). Статистически значимые различия были выявлены при определении уровней молочной, пировиноградной, гиппуровой, гидроксифенилмолочной, 4-гидроксифенилуксусной и 4-гидроксифенилпировиноградной кислот в сыворотке крови (табл. 1).

Таблица / Table 1

**Органические кислоты в сыворотке крови**  
*Organic acids in blood serum*

Органические кислоты в сыворотке крови <i>Organic acids in blood serum</i>	I группа (ммоль/л) <i>I group (mmol/L)</i>	II группа (ммоль/л) <i>II group (mmol/L)</i>	P
Молочная / <i>Lactic</i>	10,01±0,06	8,16±0,24	p=0,05
Пировиноградная / <i>Pyruvic</i>	27,71±0,04	34,1±0,4	p=0,05
Гиппуровая / <i>Hippuric</i>	0,19±0,08	0,23±0,09	p=0,05
Гидроксифенилмолочная / <i>Hydroxyphenil Lactic</i>	0,11±0,04	0,17±0,02	p=0,021
4-гидроксифенилуксусная / <i>4-hydroxyphenylacetic</i>	0,06±0,3	0	p=0,021
4-гидроксифенилпировиноградная <i>/4-hydroxyphenylpyruvic</i>	0,14±0,7	0,17±0,2	p=0,002

Таблица / Table 2

**Органические кислоты в сыворотке крови**  
*Organic acids in blood serum*

Органические кислоты в сыворотке крови <i>Organic acids in blood serum</i>	I группа (ммоль/л) <i>I group (mmol/L)</i>	II группа (ммоль/л) <i>II group (mmol/L)</i>	p
Глутаровая / <i>Glutaric</i>	0,15±2,04	-	p=0,101
4-гидроксифенилуксусная / <i>4-hydroxyphenylacetic</i>	0,06±0,3	-	p=0,05
Гомогентизиновая / <i>Homogenized</i>	0,01±0,4	-	p=0,112

Таблица / Table 3

**Органические кислоты в эндометрии**  
*Organic acids in endometrium*

4-гидроксифенилуксусная и метилмалоновая кислоты определены только у женщин с НБ (табл. 4).

Органические кислоты в эндометрии <i>Organic acids in endometrium</i>	I группа (ммоль/л) <i>I group (mmol/L)</i>	II группа (ммоль/л) <i>II group (mmol/L)</i>	P
Молочная / <i>Lactic</i>	8,28±0,2	7,57±0,2	p=0,043
Пировиноградная / <i>Pyruvic</i>	23,72±0,9	24,60±0,8	p=0,040

Таблица / Table 4

**Органические кислоты в эндометрии**  
*Organic acids in endometrium*

Органические кислоты в эндометрии <i>Organic acids in endometrium</i>	I группа (ммоль/л) <i>I group (mmol/L)</i>	II группа (ммоль/л) <i>II group (mmol/L)</i>	p
4-гидроксифенилуксусная / <i>4-hydroxyphenylacetic</i>	0,08±0,3	-	p=0,05
Мевалоновая / <i>Mevalonic</i>	0,025±0,2	-	p=0,02

Были определены 3 метаболита, которые определились только у женщин с НБ в сыворотке крови, такие как глутаровая, 4-гидроксифенилуксусная и гомогентизиновая кислоты в сыворотке крови (табл. 2).

При исследовании метаболитов в эндометрии достоверно значимые различия также имели молочная и пировиноградная кислоты (табл. 3).

При гистологическом исследовании эндометрия отмечались регрессивные изменения в сочетании с диффузной и очаговой лимфогистиоцитарной инфильтрацией (96,2%) с примесью плазматических клеток, а в отдельных случаях с образованием лимфоидных фолликулов, имелись также небольшие очаги склероза стромы (рис. 1 а, б) со склерозированными сосудами (89,9%) и венозным полнокровием с выраженными тромбозами (68,3%).

При иммуногистохимическом исследовании была установлена высокая экспрессия маркеров хронического эндометрита HLA-DR, CD 16 и CD 20 в строме эндометрия и снижение экспрессии VEGF и LIF (маркера рецептивности) в эпителии и строме. Нами была выявлена прямая корреляция между экспрессией VEGF и содержанием 4-гидроксифенилуксусной ( $r=0,411$ ) и CD16 и молочной кислотой в эндометрии ( $r=0,523$ ).

Для оценки характера и степени влияния различных факторов на риск возникновения повторной НБ был

использован метод бинарной логистической регрессии. В результате данного анализа в модели остались только факторы, статистически значимо оказывающие влияние на развитие НБ. С помощью регрессионного анализа нами была построена достоверная модель ( $\chi^2=54,676$   $p<0,001$ ).

#### Обсуждение

Сопоставив, полученные результаты, мы выявили статистически значимые различия при определении молочной, пировиноградной и 4-гидроксифенилуксусной кислот в сыворотке крови и эндометрии между исследуемыми группами.

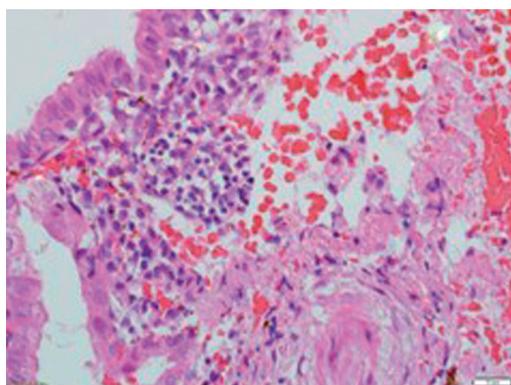
Молочная кислота (лактат) является ранним индикатором неадекватной перфузии клеток  $O_2$  и используется в качестве «количественной» оценки тканевой гипоксии. Повышенный уровень лактата у женщин с НБ в сравнении с группой контроля ( $p=0,05$ ) может указывать на сниженную оксигенацию тканей, ишемию и снижение митохондриальной функции. На образование клеточного лактата влияет «окислительно-восстановительное состояние» клетки, одной из таких клеточных окислительно-восстановительных реакций является равновесие между пировиноградной кислотой (пируватом) и лактатом. В норме соотношение лактат/пируват 10:1. Сдвиг соотношения лактат/пируват ингибирует образование митохондриального АТФ и ведёт к сдвигу цитоплазматического окислительно-восстановительного состояния клетки: НАДН накапливается, а НАД+ падает, что вызывает окислительный стресс (ОС).

4-гидроксифенилуксусная кислота является промежуточным метаболитом в процессе катаболизма аминокислоты тирозина, которая путём переаминирования с а-кетоглутаровой кислотой расщепляется на 4-гидроксифенилуксусную, гиппуровую, гидроксифенилмолочную и 4-гидроксифенилпировиноградную кислоты, далее 4-гидроксифенилуксусная окисляется в гомогентизиновую кислоту, последняя же окисляется до фумарилацетоацетата, с последующим превращением в фумарат и ацетат и выделением воды и углекислого газа. Поэтому определение гомогентизиновой и 4-гидроксифенилуксусной кислот у женщин с НБ может свидетельствовать о нарушении метаболизма тирозина, что может быть следствием повышенного расхода белка и гидроксированием фенилаланина. Нарушение метаболизма тирозина может быть фактором риска инсулинорезистентности и снижения выработки гормонов щитовидной железы [6].

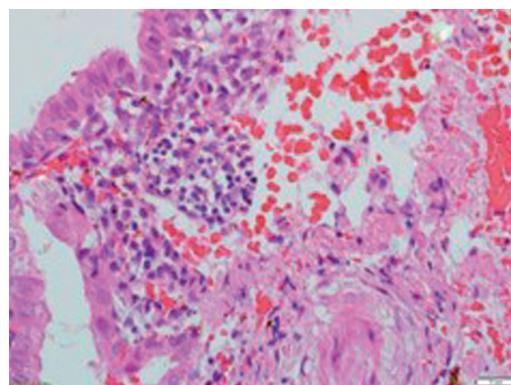
Выявленные изменения на молекулярном уровне высоко коррелировали с гистологическими и иммуногистохимическими изменениями в эндометрии у женщин с НБ.

#### Заключение

Таким образом, в основе патогенеза НБ лежит универсальный механизм патологических процессов — митохондриальная дисфункция. В результате митохондриальной дисфункции снижается уровень АТФ в клетке, увеличивается продукция активных форм кислорода и происходит активация механизмов клеточной гибели. Определение 4-гидроксифенилуксусной



а)



б)

**Рисунок 1.** (а, б) Очаги склероза стромы со склерозированными сосудами.

**Figure 1.** (a, b) Foci of stroma sclerosis with sclerosed vessels.

кислоты, изменение соотношения лактат/пируват в сыворотке крови и эндометрии являются чувствительными метаболитами функционирования митохондрий и

отражает структурно-функциональную неполноценность эндометрия и плохой прогноз течения и исхода последующей беременности.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Zhang X, Zhang K, Zhang Y. Pigment epithelium-derived factor facilitates NLRP3 inflammasome activation through downregulating cytidine monophosphate kinase 2: A potential treatment strategy for missed abortion. *Int J Mol Med.* 2020;45(5):1436-1446. DOI: 10.3892/ijmm.2020.4517.
2. Ордянец И.М., Барабашева С.С., Савичева А.М. Профиль органических кислот у женщин с неразвивающейся беременностью. *Фундаментальная и клиническая медицина.* 2019;4(3):22-26. DOI: 10.23946/2500-0764-2019-4-3-22-26
3. Zheng D, Li C, Wu T, Tang K. Factors associated with spontaneous abortion: a cross-sectional study of Chinese populations. *Reprod Health.* 2017;14(1):33. DOI: 10.1186/s12978-017-0297-2.
4. Li X, Yin M, Gu J, Hou Y, Tian F, Sun F. Metabolomic Profiling of Plasma Samples from Women with Recurrent Spontaneous Abortion. *Med Sci Monit.* 2018;24:4038-4045. DOI: 10.12659/MSM.907653.
5. *Неразвивающаяся беременность. Методические рекомендации МАРС (Междисциплинарной ассоциации специалистов репродуктивной медицины) / [авт. - сост. В.Е. Радзинский и др.]. М.: Редакция журнала StatusPraesens; 2015.*
6. Liu X, Wang X, Sun H, Guo Z, Liu X, et al. Author Correction: Urinary metabolic variation analysis during pregnancy and application in Gestational Diabetes Mellitus and spontaneous abortion biomarker discovery. *Sci Rep.* 2019;9(1):18003. DOI: 10.1038/s41598-019-54733-7.
7. Zhu LJ, Chen YP, Chen BJ, Mei XH. Changes in reactive oxygen species, superoxide dismutase, and hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  levels in missed abortion. *Int J Clin Exp Med.* 2014;7(8):2179-84. PMID: 25232404; PMCID: PMC4161564.

#### REFERENCES

1. Zhang X, Zhang K, Zhang Y. Pigment epithelium-derived factor facilitates NLRP3 inflammasome activation through downregulating cytidine monophosphate kinase 2: A potential treatment strategy for missed abortion. *Int J Mol Med.* 2020;45(5):1436-1446. DOI: 10.3892/ijmm.2020.4517.
2. Ordiyants I.M., Barabasheva S.S., Savicheva A.M. Serum and endometrial organic acid profile in women with missed abortion. *Fundamental and Clinical Medicine.* 2019;4(3):22-26. (In Russ.) DOI: 10.23946/2500-0764-2019-4-3-22-26
3. Zheng D, Li C, Wu T, Tang K. Factors associated with spontaneous abortion: a cross-sectional study of Chinese populations. *Reprod Health.* 2017;14(1):33. DOI: 10.1186/s12978-017-0297-2.
4. Li X, Yin M, Gu J, Hou Y, Tian F, Sun F. Metabolomic Profiling of Plasma Samples from Women with Recurrent Spontaneous Abortion. *Med Sci Monit.* 2018;24:4038-4045. DOI: 10.12659/MSM.907653.
5. *Undevelopment pregnancy. Methodological recommendations of Mars (interdisciplinary association of reproductive medicine specialists) / [V.E. Radzinsky et al.]. М.: StatusPraesens, 2015. (In Russ.).*
6. Liu X, Wang X, Sun H, Guo Z, Liu X, et al. Author Correction: Urinary metabolic variation analysis during pregnancy and application in Gestational Diabetes Mellitus and spontaneous abortion biomarker discovery. *Sci Rep.* 2019;9(1):18003. DOI: 10.1038/s41598-019-54733-7.
7. Zhu LJ, Chen YP, Chen BJ, Mei XH. Changes in reactive oxygen species, superoxide dismutase, and hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  levels in missed abortion. *Int J Clin Exp Med.* 2014;7(8):2179-84. PMID: 25232404; PMCID: PMC4161564.

#### Информация об авторах

**Ордианц Ирина Михайловна**, д.м.н., профессор кафедры акушерства и гинекологии с курсом перинатологии, Российский университет дружбы народов, Москва, Россия, ordiyantc@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5882-9995>

**Барабашева Софья Сергеевна**, аспирант кафедры акушерства и гинекологии с курсом перинатологии, Российский университет дружбы народов, Москва, Россия, vorkina@list.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4348-5987>

**Молчанова Ольга Константиновна**, аспирант кафедры акушерства и гинекологии с курсом перинатологии, Российский университет дружбы народов, Москва, Россия, olgamolchanova1994@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4717-7519>

**Асатрян Дарья Рубеновна**, студентка 6 курса Медицинского Института, Российский университет дружбы народов, Москва, Россия, asterdasha@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9997-378X>

#### Вклад авторов

И. М. Ордианц — разработка дизайна исследования;  
С. С. Барабашева — обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи;  
О. К. Молчанова — разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи;  
Д. Р. Асатрян — получение и анализ данных.

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Information about the authors

**Irina M. Ordiyants** – Dr. Sci. (Med.), prof., Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia, ordiyantc@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5882-9995>

**Sofia S. Barabasheva** – Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia, vorkina@list.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4348-5987>

**Olga K. Molchanova** – Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia, olgamolchanova1994@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4717-7519>

**Darya R. Asatryan** – Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia, asterdasha@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9997-378X>

#### Authors' contribution

I. M. Ordiyants — research design development;  
S. S. Barabasheva — review of publications on the topic of the article, writing the text of the manuscript;  
O. K. Molchanova — research design development, review of publications on the topic of the article;  
D. R. Asatryan — obtaining and analysis of the data.

#### Conflict of interest

Authors declares no conflict of interest.

*Поступила в редакцию / Received: 30.04.2022*

*Доработана после рецензирования / Revised: 23.05.2022*

*Принята к публикации / Accepted: 17.08.2022*