

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

УДК: 618.33 – 007: 577.112.386.2

ПЛОЦКИЙ Андрей Романович

**ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ
ГОМОЦИСТЕИНА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ПОРОКОВ РАЗВИТИЯ ПЛОДА**

14.00.01 – акушерство и гинекология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Минск 2008

Работа выполнена в УО «Гродненский государственный медицинский университет»

Научный руководитель:

Егорова Татьяна Юрьевна, кандидат медицинских наук, доцент, УО «Гродненский государственный медицинский университет», заведующая кафедрой акушерства и гинекологии

Официальные оппоненты:

Воскресенский Сергей Львович, доктор медицинских наук, профессор, ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», заведующий кафедрой акушерства и гинекологии

Таганович Анатолий Дмитриевич, доктор медицинских наук, профессор, УО «Белорусский государственный медицинский университет», заведующий кафедрой биологической химии

Оппонирующая организация:

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

Защита состоится «21» мая 2008 г. в 10 часов на заседании совета по защите диссертаций Д 03.18.01 при УО «Белорусский государственный медицинский университет» (220016, г. Минск, проспект Дзержинского, 83; тел. 272-55-98).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке УО «Белорусский государственный медицинский университет»

Автореферат разослан 10 апреля 2008 г.

Ученый секретарь совета
по защите диссертаций,
кандидат медицинских наук, доцент

A.V. Сикорский

ВВЕДЕНИЕ

Врожденные пороки развития (ВПР) плода занимают ведущие места в структуре перинатальной смертности и первичной детской инвалидности, не имея в настоящее время тенденции к снижению.

До сих пор основными методами диагностики врожденных пороков развития плода являются ультразвуковое исследование и инвазивные методы диагностики (амниоцентез, биопсия ворсин хориона, кордоцентез). Диагностика врожденных пороков с помощью биохимических методов практически не применяется в повседневной работе акушеров-гинекологов и генетиков, за исключением определения в крови уровня α -фетопротеина, хорионического гонадотропина и плазменного протеина A, ассоциированного с беременностью (PAPP-A).

Все применяемые в настоящее время методы диагностики врожденных аномалий являются «констатирующими» и носят характер вторичной профилактики, направленной исключительно на выявление и элиминацию некурабельных пороков развития, либо их последующую хирургическую коррекцию. Изучение биохимических основ врожденных аномалий предполагает использование принципиально иного подхода к проблеме патогенеза ВПР, поскольку выяснение и коррекция биохимических нарушений, приводящих к формированию врожденных аномалий, может носить характер первичной профилактики и сыграть огромную профилактическую и диагностическую роль.

Кроме того, существующие в настоящее время методы обследования не позволяют выявить среди женщин детородного возраста лиц с повышенной предрасположенностью к развитию некоторых видов дефектов развития плода (кроме определенных хромосомных аномалий), что исключает проведение у них адекватных профилактических мероприятий. Нам представляется небезосновательным мнение о том, что существуют альтернативные механизмы формирования пороков развития, не имеющие в своей основе морфологического повреждения хромосомного аппарата клеток. Возможно, одним из таких факторов может быть обмен гомоцистеина, ввиду его участия во многих важных клеточных процессах. Решению некоторых задач этой важной медико-биологической проблемы посвящена настоящая диссертационная работа.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами (проектами) и темами. Диссертация выполнена в рамках ГКПНИ «Современные клеточные и

молекулярно-генетические технологии в медицине; новые подходы к регуляции, коррекции (реабилитации) и профилактике патологических состояний человека» по теме «Разработка критериев оценки степени патофизиологических и патоморфологических нарушений при заболеваниях внутренних органов на основе анализов метаболитов белкового и аминокислотного обмена и создания новых методов диагностики, профилактики, лечения и реабилитации больных». Регистрационный номер программы 20065772.

Цель и задачи исследования

Цель исследования - установить диагностическую роль определения уровня гомоцистеина и его метаболитов для выявления пороков развития плода.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Определить уровень гомоцистеина у беременных женщин в плазме крови, отмытых эритроцитах, околоплодных водах при нормально протекающей беременности.
2. Установить содержание гомоцистеина в плазме крови, отмытых эритроцитах и околоплодных водах у беременных женщин при пороках развития плода.
3. Оценить уровни продуктов метаболизма гомоцистеина в плазме крови, отмытых эритроцитах и амниотической жидкости беременных женщин при нормально протекающей беременности и при пороках развития плода.
4. Установить диагностическую и прогностическую значимость определения уровня гомоцистеина в плазме крови при формировании групп риска среди беременных женщин по возникновению ВПР плода для углубленного их исследования в целях своевременного выявления врожденных аномалий.
5. Обосновать необходимость определения уровня гомоцистеина у женщин группы «резерва родов» и его коррекции на прегравидарном этапе для профилактики возникновения ВПР.

Объект исследования -- беременные женщины с врожденными пороками развития у плода и беременные женщины с нормальным течением беременности, родившие здоровых детей без каких-либо врожденных аномалий; женщины группы «резерва родов» вне беременности.

Предмет исследования -- плазма крови, отмытые эритроциты и околоплодные воды беременных женщин; плазма крови у женщин группы «резерва родов».

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Уровень гомоцистеина в плазме крови беременных женщин с пороками развития плода превышает его значения при нормально протекающей беременности.
2. Высокий уровень гомоцистеина в околоплодных водах характерен для множественных врожденных пороков развития плода. Снижение уровня гомоцистеина в околоплодной жидкости ассоциируется с пороками развития передней брюшной стенки, шейными гигромами и расщелинами лица плода.
3. В качестве маркеров диагностики ВПР плода могут быть использованы уровни метаболитов гомоцистеина в плазме крови, отмытых эритроцитах и амниотической жидкости беременных женщин.
4. Высокий уровень гомоцистеина у беременных в 1-2 триместре беременности и у женщин группы «резерва родов» позволяет определить среди них группу риска по формированию ВПР плода.

Личный вклад соискателя

Диссертантом выполнен патентно-информационный поиск по теме диссертации, самостоятельно сформулированы цель и задачи исследования, определены основные этапы и направления их достижения, выбраны методы и объем исследования. Клинические наблюдения за обследованными женщинами, сбор анамнеза, ультразвуковые исследования, получение биологического материала для биохимических исследований, подготовка проб для хроматографических исследований, анкетирование пациенток проводились лично автором. Все научные результаты получены, обработаны статистически и проанализированы автором самостоятельно. Сформирована компьютерная база данных, проведена статистическая обработка и интерпретация полученных результатов. Положения и выводы диссертации сформулированы автором лично.

Апробация результатов диссертации. Основные результаты диссертации доложены на следующих научных конференциях:

- Научно-практическая конференция «Актуальные проблемы охраны здоровья детей». Гродно, 14 апреля 2005 г.;
- Республиканская научно-практическая конференция «Здоровая мать – здоровый ребенок. Ведение беременных с экстрагенитальной патологией». Минск, 17 октября 2006 г.;
- XIV международная научно-практическая конференция «Экология человека в постчернобыльский период». Минск, 13-15 декабря 2006 г.;
- 2-ая ежегодная итоговая конференция ЦНИЛ. Гродно, 18 декабря 2006 г.;

- Городской семинар «Актуальные проблемы экстрагенитальной патологии у беременных женщин». Гродно, 21 февраля 2007 г.;
- Областной обучающий семинар «Диагностика и хирургическое лечение пороков развития». Гродно, 22 июня 2007 г.;
- XLII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Szczecin, 18-21 września 2007 г.;
- IX Всероссийский форум «Мать и дитя». Москва, 2-5 октября 2007 г.;
- VIII съезд акушеров-гинекологов и неонатологов Республики Беларусь «Безопасное материнство в XXI веке». Витебск, 17-18 октября 2007 г.;
- 3-я Международная научная конференция «Донозология – 2007: проблемы диагностики и коррекции эндоэкологического статуса в современных условиях». Санкт-Петербург, 29 – 30 ноября 2007 г.

Изучение результатов

Опубликованность результатов диссертации. Основные результаты диссертации опубликованы в 5 журнальных статьях, 3-х статьях в материалах конференций и съездов, в 3-х тезисах докладов. Общее количество страниц опубликованных материалов 101158 печатных знаков (2,52 авторских листа).

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 111 страницах машинописного текста и состоит из введения, 5 глав, заключения, списка использованных источников, который включает 201 наименование, в том числе 166 иностранных, приложения. Материал диссертации представлен в 16 таблицах и 36 рисунках.

Работа выполнена в Учреждении Образования «Гродненский государственный медицинский университет».

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Обследовано 206 пациенток – 174 беременные женщины и 32 женщины группы «резерва родов» вне беременности. Беременные женщины были разделены на 3 группы: одну основную и 2 группы сравнения. Основную группу составили 104 пациентки с выявленными врожденными аномалиями развития у плода. У этих беременных исследовали плазму крови, отмытые эритроциты и околоплодные воды. В группу сравнения А вошли 52 пациентки, у которых беременность закончилась рождением детей без врожденных аномалий развития. У этих беременных не наблюдалось осложнений беременности, которые могут быть связаны с гипергомоцистеинемией, а именно – гипертензивные расстройства, задержка внутриутробного развития

плода. У беременных группы сравнения А проводилось исследование плазмы крови и отмытых эритроцитов. Группу сравнения В составили 18 пациенток, у которых беременность была прервана по медицинским и немедицинским показаниям в сроки 15-21 неделя, причем, при патологоанатомическом исследовании abortусов врожденных аномалий развития выявлено не было. У пациенток данной группы во время процедуры прерывания беременности были получены околоплодные воды, проведено исследование состава амниотической жидкости и сравнение его с показателями основной группы в сопоставимые сроки беременности. Группы пациенток были сопоставимы по возрасту, антропометрическим данным, характеру менструальной функции, акушерско-гинекологическому и соматическому анамнезу.

В плазме крови, отмытых эритроцитах и околоплодных водах проводилось изучение уровня гомоцистеина, цистеина, цистеинглицина и глутатиона методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC – high-performance liquid chromatography) с использованием высокореагентного восстановителя SBD-F фирмы «Fluca» (Германия) на аппарате «Agilent 1100».

В обследованную группу «резерва родов» вошли 32 женщины вне беременности, у которых изучался исходный уровень гомоцистеина в плазме крови и уровень гомоцистеина после 12-дневного приема витаминных препаратов. Эти пациентки были разделены на 2 подгруппы: женщины первой подгруппы получали фолиевую кислоту в дозе 0,4 мг/сут, а женщины второй подгруппы вместе с фолиевой кислотой получали витамин В₁₂ в дозе 200 мкг/сут.

Статистический анализ полученных результатов проведен с помощью пакета прикладных программ STATISTICA 5.5 for Windows (лицензия № AXXR010A934027FAN3) для биологических исследований, а также пакета SPSS 13 (лицензия № 5565635735757). Для сравнения независимых групп применялся U-критерий Манна-Уитни, для зависимых групп – критерий Уилкоксона. Данные представлены в виде Ме (медиана значений) и интерквартильного размаха с описанием значения 25 и 75 процентилей. При проведении корреляционного анализа рассчитывали коэффициент корреляции г Спирмена. Статистически значимыми различия считались при $p < 0,05$. Для оценки эффективности лабораторного теста использовали метод построения ROC-кривой (receiver-operator curve), представляющей собой зависимость чувствительности от вероятности ложноположительных результатов. При помощи метода четырехпольных таблиц рассчитывались основные операционные характеристики теста определения уровня гомоцистеина в плазме крови: чувствительность, специфичность, прогностическая ценность положительного результата теста (+PV), прогностическая ценность отрицательного результата теста (-PV), отношение правдоподобия

положительного результата теста (LR+), отношение правдоподобия отрицательного результата теста (LR-).

Уровень гомоцистеина в плазме крови, отмытых эритроцитах и околоплодных водах беременных женщин с различными видами врожденных пороков развития у плода

Установлено, что у беременных основной группы уровень общего гомоцистеина в плазме крови составил 6,75 (5,7-8,3) мкмоль/л и был достоверно выше, чем у пациенток группы сравнения – 5,81 (4,8-6,77) мкмоль/л ($p<0,001$). Однако при изучении его концентрации в зависимости от вида врожденных аномалий выявлены различия, что показано в таблице 1.

Таблица 1 -- Уровень общего гомоцистеина (Нсу) в плазме крови беременных женщин основной группы и группы сравнения

Исследуемая группа	N	Нсу в плазме крови (Ме, 25-75%)	P
Гидроцефалия	12	6,8 (6,05-7,37)	0,024*
Пороки нервной трубы	8	7,17 (6,39-7,47)	0,036*
Пороки передней брюшной стенки	8	6,71 (6,09-8,76)	0,022*
Хромосомные аномалии	5	7,14 (6,75-8,27)	0,016*
Врожденные пороки сердца	17	5,36 (5,04-6,3)	0,738
Диафрагмальная грыжа	4	8,9 (8,12-16,15)	0,002*
Шейная гигрома	4	7,81 (6,56-9,24)	0,028*
Скелетные дисплазии	11	6,59 (5,23-7,29)	0,198
Пороки легких	6	5,99 (5,36-6,46)	0,979
Поликистоз почек	6	8,32 (5,9-11,16)	0,029*
Расщелины лица	6	5,18 (3,58-5,91)	0,145
Перинатальные опухоли	4	8,0 (6,26-9,26)	0,052
Атрезия пищевода	3	7,75 (6,89-13,01)	0,016*
Множественные пороки развития	10	9,91 (6,93-12,38)	0,00004*
Всего:	104	6,75 (5,7-8,3)	0,0001*
Группа сравнения	52	5,81 (4,8-6,77)	–

* – различия с группой сравнения достоверны ($p<0,05$)

Отмечено статистически значимое повышение уровня гомоцистеина в плазме крови у беременных с наличием пороков центральной нервной системы, хромосомными аномалиями, шейной гигромой, атрезией пищевода, диафрагмальной грыжей, пороками развития передней брюшной стенки,

поликистозом почек и множественными врожденными пороками развития (МВПР) у плода. Уровень гомоцистеина в плазме крови был повышен при скелетных дисплазиях у плода и при опухолях, возникших в перинатальном периоде, однако это различие не носило статистически значимый характер. Наконец, при выявлении у плода врожденных пороков сердца, пороков легких, расщелин верхней губы и твердого неба уровень гомоцистеина в плазме крови не отличался от такового у женщин группы сравнения.

Наиболее высокие показатели уровня гомоцистеина в плазме крови зарегистрированы в подгруппе с МВПР. У половины пациенток он превышал 10 мкмоль/л. Это были случаи пороков развития с вовлечением практически всех органов и систем. Установлена прямая корреляционная связь между уровнем гомоцистеина в плазме крови и количеством систем плода, в которых выявлен порок развития ($r=0,782$; $p<0,01$), что подтверждает экспериментальные данные о так называемом дозозависимом эффекте гомоцистеина на развивающийся эмбрион, т.е., чем выше концентрация гомоцистеина, тем более грубые пороки развития плода можно ожидать [Rosenquist, 1996].

При изучении уровня гомоцистеина в отмытых эритроцитах установлено, что концентрация общего гомоцистеина в обеих группах не имела различий. Не отмечено также различий в зависимости от вида врожденной патологии плода.

Нами установлено, что уровень общего гомоцистеина в околоплодных водах у пациенток основной группы составил 3,62 (2,27-5,61) мкмоль/л, а в группе сравнения – 3,74 (2,87-6,93) мкмоль/л ($p>0,05$). При анализе различных видов врожденных аномалий выявлено статистически значимое повышение уровня общего гомоцистеина при МВПР – 6,73 (5,03-9,32) мкмоль/л ($p<0,05$). У пациенток основной группы с наличием у плода расщелин верхней губы и неба, шейной гигромы и аномалий передней брюшной стенки (омфалоцеле и гастросиазис) мы обнаружили достоверное снижение концентрации гомоцистеина в околоплодных водах ($p<0,05$).

При изучении корреляционных связей отмечена положительная связь между уровнем гомоцистеина плазмы крови матери и гомоцистеина эритроцитов ($r=0,27$; $p<0,05$), а также между уровнем гомоцистеина эритроцитов матери и гомоцистеина околоплодных вод ($r=0,34$; $p<0,05$) среди беременных основной группы. Выявленные закономерности могут свидетельствовать, во-первых, о «клеточном» происхождении гомоцистеина, во-вторых, могут указывать на то, что гомоцистеин легко преодолевает плацентарный барьер, а его уровень в крови беременных является определенным эквивалентом, отражающим содержание его в клетках матери (материнское происхождение) и околоплодных водах (плодовое происхождение).

При изучении показателей чувствительности и специфичности теста по определению уровня общего гомоцистеина в плазме крови для выявления ВПР плода установлено, что при точке разделения 7,91 мкмоль/л чувствительность теста составляет 26,92%, специфичность - 96,15%, прогностическая ценность положительного результата - 93,3%. За точку разделения было принято максимальное значение уровня общего гомоцистеина в плазме крови среди женщин группы сравнения, при котором отсутствовали врожденные пороки развития у плода.

При повышении уровня гомоцистеина в плазме крови более 7,91 мкмоль/л выявлено 28 пороков. Это были наиболее трудные для пренатальной диагностики состояния или пороки с весьма сомнительным прогнозом даже при своевременно проведенном хирургическом лечении. В это число вошло 75% всех выявленных диафрагмальных грыж, 50% от всего количества выявленных МВПР, опухолей перинатального периода, поликистоза почек, шейных гигром, 30% хромосомных аномалий и атрезии пищевода. Из 28 пациенток с уровнем общего гомоцистеина в плазме крови более 7,91 мкмоль/л у 14 беременность закончилась рождением детей. Четыре ребенка (28,5%) умерли в течение месяца жизни: двое от МВПР, один – после оперативного лечения диафрагмальной грыжи, один после оперативного лечения атрезии пищевода. 7 детей (50%) подверглись хирургическому вмешательству по поводу диафрагмальной грыжи (2 случая), врожденных пороков сердца (2 случая), поликистоза почки, крестцово-копчиковой тератомы и тератомы в области шеи – по одному случаю. В течение 6 месяцев жизни после операций состояние этих детей было удовлетворительным, за исключением ребенка с тератомой шеи – у него развилась стриктура пищевода. Наконец, трое детей находятся под наблюдением урологов по поводу поликистоза почек инфантального типа (2 случая) и педиатра по поводу синдрома Дауна. Приведенные данные говорят о серьезных экономических и социальных затратах на лечение детей с врожденными аномалиями развития.

Особенности процесса транссульфурирования гомоцистеина у женщин с различными видами врожденных аномалий у плода

При анализе данных, характеризующих содержание гомоцистеина в плазме крови, обращает на себя внимание тот факт, что при достаточно высоких показателях гомоцистеина в плазме крови матери (6-8 мкмоль/л) пороки развития плода не возникали, и наоборот, низкий уровень гомоцистеина в крови матери не гарантировал отсутствие врожденных аномалий развития у плода. В связи с этим представляет интерес изучение концентраций метаболитов гомоцистеина, в частности, субстратов, которые образуются при

транссульфурировании. В этом процессе метаболизируется около 70% всего гомоцистеина, и данная биохимическая цепочка является единственным источником образования цистеина и глутатиона [Fowler, 1997].

Нами проанализированы особенности процесса транссульфурирования гомоцистеина при различных видах врожденных аномалий у плода. Мы исследовали концентрации гомоцистеина, цистеина, глутатиона и цистеинглицина в плазме крови, отмытых эритроцитах и околоплодных водах.

Отмечено достоверное повышение уровня серосодержащей аминокислоты цистеина в плазме крови при пороках развития плода и практически у всех женщин основной группы, в зависимости от вида порока развития ($p<0,05$). При наличии диафрагмальной грыжи и МВПР это повышение носило статистически значимый характер. Выявлено достоверное повышение содержания цистеинглицина (продукт распада глутатиона печени, который является своеобразным «полуфабрикатом» для синтеза глутатиона в периферических тканях) в плазме крови матери при атрезии пищевода и хромосомных аномалиях у плода ($p<0,05$).

При изучении концентраций продуктов транссульфурирования в отмытых эритроцитах выявлено достоверное снижение уровня цистеина при наличии у плода диафрагмальной грыжи ($p<0,05$). Кроме того, отмечено снижение синтеза глутатиона во всех рассматриваемых случаях, а при наличии врожденных пороков сердца у плода это снижение оказалось статистически достоверным ($p<0,05$).

Более наглядно особенности транссульфурирования характеризуются при изучении соотношений концентраций гомоцистеина, цистеина, цистеинглицина и глутатиона между собой в плазме крови и отмытых эритроцитах.

Выявленное снижение соотношения цистеин/гомоцистеин в плазме крови при хромосомных аномалиях свидетельствует о нарушении процесса транссульфурирования гомоцистеина. Имеется тенденция к снижению этого коэффициента при МВПР, атрезиях пищевода, поликистозе почек и пороках передней брюшной стенки. Выявлено также достоверное повышение указанного коэффициента в подгруппе беременных с расщелинами лица у плода ($p<0,05$). Роль цистеина в генезе пороков развития плода изучена крайне недостаточно. Имеются единичные работы, в которых указывается связь повышенных концентраций цистеина и осложнений беременности, в том числе и ассоциация с возникновением врожденных аномалий. Если учесть, что основными ферментами транссульфурирования являются B_6 -зависимые энзимы, для профилактики врожденной патологии в качестве преконцептивной подготовки можно рекомендовать не только прием фолиевой кислоты, но и обязательный прием пиридоксина в обычных дозировках.

На основании изучения соотношения различных метаболитов

транссульфурирования в эритроцитах нами установлено достоверное ($p<0,05$) повышение содержания цистеина в эритроцитах при пороках развития легких, на что указывает коэффициент цистеин/гомоцистеин. Нарушение антиоксидантной защиты клетки, выражющееся в снижении содержания глутатиона в клетке, подтверждается снижением соотношения глутатион/гомоцистеин в отмытых эритроцитах, что достоверно показано для множественных врожденных пороков развития плода и врожденных пороков сердца ($p<0,05$).

Среди продуктов транссульфурирования гомоцистеина, содержащихся в околоплодных водах, отмечено повышение содержания цистеина при гидроцефалии, хромосомных аномалиях и МВПР, а также достоверное снижение его при расщелинах лица ($p<0,05$). Установлено достоверное снижение концентрации цистеинглицина при пороках передней брюшной стенки у плода ($p<0,05$). Механизмы, приводящие к изменению уровня гомоцистеина в околоплодных водах при некоторых аномалиях развития у плода, а также различные концентрации цистеина при различных пороках развития, в настоящее время неизвестны, что требует дальнейшего изучения.

Нами выявлен ряд корреляционных связей между метаболитами процесса транссульфурирования гомоцистеина как в плазме крови и отмытых эритроцитах, так и в околоплодных водах пациенток основной группы. Некоторые из этих корреляционных связей приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Корреляционные связи между различными метаболитами процесса транссульфурирования гомоцистеина среди беременных основной группы

Показатели	r	p
Цистеин – гомоцистеин в плазме крови	0,3	0,0019
Цистеин – цистеинглицин в плазме крови	0,33	0,005
Цистеин – глутатион в плазме крови	0,32	0,022
Глутатион – цистеинглицин в плазме крови	0,47	0,006
Гомоцистеин – цистеинглицин в плазме крови	0,244	0,012
Цистеин – гомоцистеин в отмытых эритроцитах	- 0,3	0,011
Цистеин – глутатион в отмытых эритроцитах	- 0,328	0,005
Цистеин отмытых эритроцитов – цистеин околоплодных вод	- 0,34	0,015
Гомоцистеин – глутатион в отмытых эритроцитах	0,54	0,0001
Гомоцистеин эритроцитов – цистеин околоплодных вод	0,39	0,004
Гомоцистеин – цистеин околоплодных вод	0,48	0,0001
Глутатион эритроцитов – гомоцистеин околоплодных вод	0,28	0,045

В группе сравнения прослеживались подобные корреляционные связи, а при различных пороках эти корреляции не отмечены, что, вероятно, указывает

на метаболические нарушения при определенных состояниях. Например, обнаруженная корреляционная связь между содержанием гомоцистеина и глутатиона в отмытых эритроцитах не выявлена в подгруппе с врожденными пороками сердца у плода, при которых, как было показано, имеет место снижение наработки глутатиона.

Целесообразность проведения преконцептивной подготовки витаминными препаратами для коррекции уровня гомоцистеина в плазме крови

В течение последних 10 лет в Гродненской области не отмечается тенденции к снижению количества врожденных пороков развития плода. На рисунке 1 показано, что количество беременностей, прерванных по генетическим показаниям, остается стабильным, практически не уменьшалось за анализируемый период.

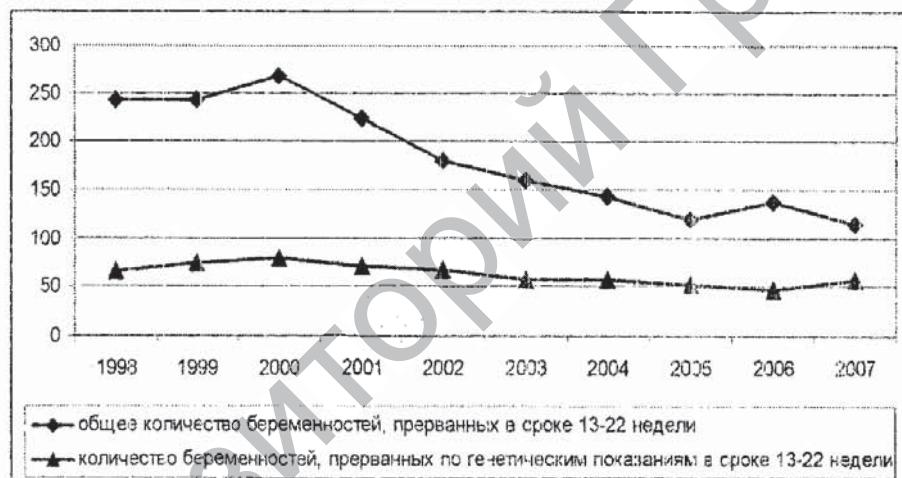


Рисунок 1 – Динамика прерываний беременности в сроке 13-22 недели в Гродненской области за 1998-2007 годы

Проведение преконцептивной подготовки в настоящее время рассматривается как необходимый этап планирования беременности и один из элементов успешного ее исхода. Одним из важных пунктов этого мероприятия является назначение витаминов группы «В», в частности, фолиевой кислоты. Адекватная подготовка к беременности важна еще и потому, что имеются данные о низком содержании фолатов в эритроцитах и, соответственно, высоких концентрациях гомоцистеина у женщин на ранних сроках беременности. Минимально эффективная дозировка фолиевой кислоты составляет 0,4 мг/сут, что подтверждено рядом многоцентровых исследований. Применение только фолиевой кислоты не всегда оказывается достаточным, так как ферментом, участвующим в реметилировании гомоцистеина, является В₁₂-

зависимая метионин синтаза. Дефицит кобаламина также может неблагоприятно влиять на метаболизм гомоцистеина. В связи с этим представляется целесообразным использование витамина В₁₂ вместе с фолиевой кислотой дляпреконцептивной подготовки в целях профилактики возникновения пороков развития плода.

Нами проведено изучение уровня гомоцистеина в плазме крови у 32 молодых здоровых нерожавших женщин, которые были разделены на 2 подгруппы. После определения уровня гомоцистеина в плазме крови женщинам первой подгруппы (n=16) назначалась фолиевая кислота в дозе 0,4 мг в сутки в течение 12 дней, а пациенткам второй подгруппы (n=16) дополнительно назначалось 200 мкг витамина В₁₂ внутримышечно в течение того же времени. После 12-дневного приема препаратов повторно исследовался уровень гомоцистеина в плазме крови. Сравнение уровня гомоцистеина в плазме крови до и после проведенного лечения осуществляли по критерию Уилкоксона (Wilcoxon).

Исходный уровень гомоцистеина в плазме крови составил 8,53 (7,47-10,38) мкмоль/л, а после назначения витаминов – 6,39 (5,67-7,65) мкмоль/л ($p<0,001$). Указанная закономерность отмечена и среди подгрупп, получавших различные схемы лечения. В первой подгруппе пациенток, получавших только фолиевую кислоту, наблюдалось снижение содержания гомоцистеина с 8,98 (7,69-10,54) мкмоль/л до 7,48 (6,22-9,26) мкмоль или на 16,8% ($p<0,05$). В подгруппе с одновременным назначением фолиевой кислоты и кобаламина отмечено уменьшение концентрации гомоцистеина в плазме крови с 8,33 (7,07-9,57) до 6,16 (5,56-6,85) ($p<0,001$) или на 26,1%, что показано на рисунке 2.

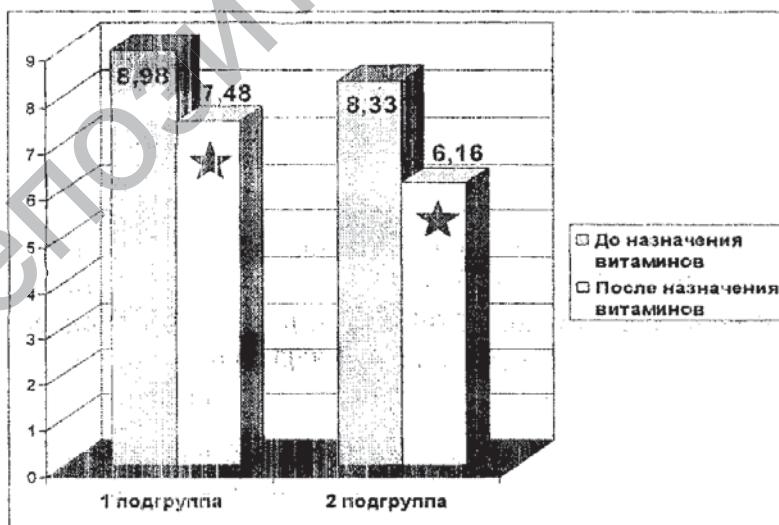


Рисунок 2 – Динамика снижения уровня гомоцистеина в плазме крови среди пациенток обеих подгрупп

Полученные данные свидетельствуют, во-первых, о чрезвычайной важности снижения концентрации гомоцистеина как в период, предшествующий зачатию, так и в период раннего эмбрионального развития. Во-вторых, как было показано, совместное назначение витамина В₁₂ и фолиевой кислоты более эффективно снижает уровень гомоцистеина в плазме крови, нежели изолированное назначение фолатов. Кроме того, определение уровня гомоцистеина на прегравидарном этапе может служить критерием адекватности проводимой преконцептивной подготовки, что показано на рисунке 3, где представлен алгоритм, отображающий целесообразность исследования уровня гомоцистеина в плазме крови на прегравидарном этапе и во время уже наступившей беременности.

Многочисленными проведенными исследованиями был показан дефицит витаминов среди жителей Республики Беларусь, поэтому назначение витаминных препаратов в качестве преконцептивной подготовки играет значительную профилактическую роль в предупреждении патологии беременности. В настоящее время считается целесообразным прием препаратов за 3 месяца до планируемой беременности и в течение 3 месяцев наступившей беременности в целях профилактики возникновения врожденных аномалий развития плода. Эти сведения и интересовали нас при наблюдении за пациентками основной группы с различными ВПР плода, в связи с чем нами проведено анонимное анкетирование этих женщин.

Выяснилось, что только 11,1% опрошенных женщин основной группы принимали фолиевую кислоту накануне и в ранние сроки наступившей беременности. 33,1% получали фолиевую кислоту только при постановке на диспансерный учет в женской консультации, что соответствовало сроку беременности 7-8 недель. Назначение препаратов в этот период беременности теряет свой протективный эффект, поскольку практически все органы и системы к этому времени у плода уже сформированы. Наконец, более половины опрошенных (51,8%) не принимали фолиевую кислоту ни до наступления беременности, ни в ранние ее сроки, а только в более поздний период в составе различных поливитаминных препаратов. Возможно, этот факт имеет большое значение при определении резерва снижения перинатальных потерь, обусловленных врожденными пороками развития плода. Интересно, что около трети пациенток, участвовавших в анкетировании, узнали о необходимости приема витаминных препаратов и о роли витаминов при беременности только в результате проведенного опроса, что свидетельствует о необходимости информирования населения о пользе преконцептивной подготовки в целях профилактики врожденных пороков развития у плода.



Рисунок 3 - Алгоритм коррекции уровня гомоцистеина на прегравидарном этапе и при наступлении беременности

Поэтому вторым этапом нашей работы явилось анкетирование 83 студентов различных курсов Гродненского государственного медицинского университета для уточнения следующих сведений: известна ли им позитивная

роль витаминов в ранние сроки беременности и из каких источников, на взгляд студентов, женщины должны узнавать о целесообразности приема витаминов в качестве преконцептивной подготовки.

О необходимости проведения преконцептивной подготовки витаминными препаратами осведомлены 95% опрошенных, причем, источником информации для 51,8% послужили наглядные пособия в медицинских учреждениях, для 43,37% – беседа с медицинским работником, для 30,12% – сообщения в средствах массовой информации. О целесообразности приема фолиевой кислоты высказалось подавляющее большинство опрошенных (97,59%), о необходимости приема витамина В₁₂ – 67,46% студентов.

Результаты проведенного анкетирования свидетельствуют, во-первых, о недостаточной информированности населения о пользе преконцептивной подготовки витаминными препаратами. Во-вторых, в качестве источников информации о пользе преконцептивной подготовки нужно использовать не только силы медицинских работников и наглядные пособия в стенах медицинских учреждений, но и средства массовой информации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Уровень гомоцистеина в плазме крови беременных женщин с пороками развития плода (6,75 (5,7-8,3) мкмоль/л) превышает показатели у беременных женщин, родивших здоровых детей – 5,81 (4,8-6,77) ($p<0,001$) [4, 5]. Установлено достоверное повышение уровня гомоцистеина при пороках центральной нервной системы ($p<0,05$), пороках передней брюшной стенки ($p<0,05$), диафрагмальных грыжах ($p<0,01$), атрезиях пищевода ($p<0,05$), поликистозе почек ($p<0,05$), шейной гигроме ($p<0,05$) и множественных врожденных аномалиях плода ($p<0,01$) [5, 8]. При таких аномалиях плода как расщелины лица, пороки развития легких и врожденные пороки сердца не установлено различий в концентрации гомоцистеина в плазме крови беременных женщин ($p>0,05$) [8, 10].

2. Уровень гомоцистеина в околоплодных водах при нормально протекающей беременности составляет 3,74 (2,87-6,93) мкмоль/л [5, 8, 11]. Повышение его уровня в околоплодных водах до 6,73 (5,03-9,32) мкмоль/л ($p<0,05$) отмечено при множественных врожденных пороках развития плода. Установлено достоверное снижение концентрации гомоцистеина в амниотической жидкости при расщелинах лица ($p<0,05$), шейной гигроме ($p<0,01$) и пороках передней брюшной стенки ($p<0,05$), а также достоверное снижение уровня цистеина в околоплодных водах при расщелинах лица ($p<0,05$) [5, 11].

3. Достоверное снижение уровня внутриклеточного глутатиона и снижение соотношения «глутатион/гомоцистеин» в отмытых эритроцитах ($p<0,05$) является диагностическим критерием для выявления врожденных пороков сердца и МВПР у плода [2]. Установлено повышение коэффициента «цистейн/гомоцистейн» в отмытых эритроцитах беременных женщин при пороках развития легких ($p<0,05$). Выявлено достоверное повышение коэффициента «цистейн/гомоцистейн» в плазме крови беременных при расщелинах лица и снижение его при хромосомных аномалиях у плода ($p<0,05$) [2].

4. Определение уровня гомоцистеина в плазме крови и околоплодных водах, а также продуктов его метаболизма является диагностическим критерием врожденных аномалий развития плода. При концентрации гомоцистеина в плазме крови 7,91 мкмоль/л, чувствительность метода составляет 26,9%, специфичность – 96,1%, прогностическая ценность положительного результата – 93,3%, что позволяет формировать группы женщин на прегравидарном этапе и на ранних сроках беременности для проведения углубленной диагностики с целью выявления ВПР плода [5, 6, 7].

Рекомендации по практическому использованию результатов

1. Показатели уровня гомоцистеина в плазме крови беременных могут быть использованы в качестве диагностического маркера ВПР плода. Это позволит провести углубленную диагностику с использованием ультразвуковой аппаратуры высокого или экспертного класса, либо с применением инвазивных методов пренатальной диагностики, что будет способствовать снижению перинатальных потерь.

2. Определение уровня гомоцистеина в околоплодных водах необходимо использовать в медико-генетических центрах, занимающихся инвазивными методами пренатальной диагностики в качестве дополнительного диагностического критерия для выявления некоторых врожденных пороков развития у плода (шейная гигрома, пороки передней брюшной стенки, расщелины лица).

3. Полученные результаты позволяют рекомендовать определение уровня гомоцистеина на прегравидарном этапе для своевременного назначения и проведения адекватных профилактических мероприятий для коррекции уровня гомоцистеина витаминами, участвующими в его обмене.

4. Вместо рекомендованной ранее схемы преконцептивной подготовки женщин с использованием фолиевой кислоты целесообразно использовать схему совместного применения витаминов В₉ и В₁₂ для нормализации у них уровня гомоцистеина в плазме крови.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах

1. Гомоцистеин и пороки развития плода / А. Р. Плоцкий, Т. Ю. Егорова, А. В. Наумов // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2007. – № 1. С. – 167 – 170.
2. Оценка транссульфурирования гомоцистеина при врожденных пороках развития плода / А. Р. Плоцкий, А. В. Наумов, Е. М. Дорошенко, Т. Ю. Егорова // Здравоохранение. – 2007. – № 12. – С. 60 – 63.
3. Плоцкий, А.Р. Ошибки и трудности в диагностике пороков развития при ультразвуковом исследовании / А. Р. Плоцкий, Т. В. Драбович // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2005. – № 3. – С. 230 – 232.
4. Плоцкий, А. Р. Связь уровня гомоцистеина у беременных с наличием различных видов врожденных пороков развития у плода / А. Р. Плоцкий // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2007. - № 2. – С. 39 – 42.
5. Содержание гомоцистеина у беременных и диагностика пороков развития плода / А. Р. Плоцкий, Т. Ю. Егорова, А. В. Наумов // Здравоохранение. – 2007. – № 11. – С. 76 – 79.

Статьи в материалах конференций

6. Плоцкий, А. Р. Патогенетические аспекты гипергомоцистениемии при врожденных пороках развития плода / А. Р. Плоцкий // Безопасное материнство в XXI веке: сборник материалов VIII съезда акушеров-гинекологов и неонатологов Республики Беларусь, Витебск, 17 – 18 октября 2007 г. / МЗ РБ, ВГМУ, ГУ «РНПЦ «Мать и дитя»; редкол.: В. И. Жарко [и др.]. – Витебск, 2007. – С. 326 – 328.
7. Плоцкий, А. Р. Прогнозирование и диагностика врожденных пороков развития плода путем определения уровня гомоцистеина в плазме крови / А. Р. Плоцкий, А. В. Наумов // Донозология – 2007: проблемы диагностики и коррекции эндокологического статуса в современных условиях: материалы Третьей Международной научной конференции, Санкт-Петербург, 29 – 30 ноября 2007 г. / Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербургский институт экологии и здоровья; редкол.: М. П. Захарченко [и др.]. – Санкт-Петербург, 2007. – С. 111 – 113.
8. Плоцкий, А. Р. Уровень гомоцистеина в крови и околоплодных водах беременных женщин при пороках развития плода / А. Р. Плоцкий // Безопасное

материнство в XXI веке: сборник материалов VIII съезда акушеров-гинекологов и неонатологов Республики Беларусь, Витебск, 17 – 18 октября 2007 г. / МЗ РБ, ВГМУ, ГУ «РНПЦ «Мать и дитя»; редкол.: В. И. Жарко [и др.]. – Витебск, 2007. – С. 329 – 331.

Тезисы докладов

9. Plasma homocysteine levels in pregnant women with birth defects' fetuses / A. V. Navumau, M. M. Zolotukhin, A. R. Plotski // Acta Biochimica Polonica. – 2006. – Vol. 53, Suppl. 1. – P. 195.
10. Plasma homocysteine and birth defects / A. R. Plotsky, A. V. Naumov, E. M. Doroshenko // Acta Biochimica Polonica. – 2007. – Vol. 54, Suppl 4. – P. 15.
11. Plotsky, A. R. Estimating of total homocysteine in plasma, amniotic fluid and red blood cells in women with birth defects fetuses / A. R. Plotsky // Symposium: Endocrinology of Reproduction. Mikołajki, Poland. – 2007. – P. 64.



РЭЗЮМЭ

Плоцкі Андрэй Раманавіч

**Дыягнастычнае значэнне вызначэння ўзроўню гомацыстэіну
для выяўлення парокаў развіцця плода**

Ключавыя слова: гомацыстэін, прыроджаныя парокі развіцця плода, прэнатальная дыягностика, плазма крыва, адмытыя эрытрактыты, каляплодныя воды.

Мэта работы: выявіць дыягнастычную ролю вызначэння ўзроўню гомацыстэіну і яго метабалітаў для выяўлення парокаў развіцця плода.

Методы даследавання: клінічны, ультрагукавы, хроматаграфічны.

Атрыманая вынікі і іх навізна: праведзена вывучэнне ўзроўню гомацыстэіну і яго метабалітаў у плазме крыва, адмытых эрытрактытах і каляплодных водах цяжарных жанчын пры нармальнай цяжарнасці і пры пароках развіцця плода. Выяўлена, што мае месца сапраўдане павышэнне ўзроўню гомацыстэіну ў плазме крыва пры пароках развіцця цэнтральнай нэрвовай сістэмы, пароках пярэдняй брухавінай сценкі, дыяфрагмальных кілах, атрэзіях стрававода, полікістозе ныраў, шыйнай гігроме і множных прыроджаных анатоміях плода. Высокі ўзровень гомацыстэіну ў каляплодных водах асцыруе з множнымі прыроджанымі парокамі развіцця плода, а зніжэнне яго – з расклінамі твара, шыйнай гігромай і парокамі пярэдняй брухавінай сценкі плода. Адзначана сапраўдане зніжэнне ўзроўню глутаціёны і суадносін «глутаціён/гомацыстэін» у адмытых эрытрактытах пры прыроджаных пароках сэрца і множных прыроджаных пароках развіцця плода. Вызначэнне ўзроўню гомацыстэіну ў плазме крыва жанчын групы «рэзерву родаў» дазваляе ацаніць адэкватнасць праводзімай прэканцэптыўнай падрыхтоўкі. Вызначэнне ўзроўню гомацыстэіну ў плазме крыва дазваляе фарміраваць групы рызыкі сярод цяжарных жанчын і жанчын групы «рэзерва родаў» па ўзнікненні прыроджаных парокаў развіцця плода для правядзення паглыбленай і своечасовай дыягностикі.

Рэкамендацыі па прымяненні: паказальнікі ўзроўню гомацыстэіну ў плазме крыва могуць быць выкарыстаны ў якасці дыягнастычнага маркера прыроджаных парокаў развіцця плода ў медыцынскіх установах, якія займаюцца прэнатальнай дыягностикай. Узровень гомацыстэіну у плазме крыва можа разглядацца у якасці крытэрыя адэкватнасці праводзімай прэканцэптыўнай падрыхтоўкі сярод жанчын групы «рэзерва родаў».

Галіна ўжывання: акушэрства, прэнатальная дыягностика.

РЕЗЮМЕ

Плоцкий Андрей Романович

**Диагностическое значение определения уровня гомоцистеина
для выявления пороков развития плода**

Ключевые слова: гомоцистеин, врожденные пороки развития плода, пренатальная диагностика, плазма крови, отмытые эритроциты, околоплодные воды.

Цель работы: установить диагностическую роль определения уровня гомоцистеина и его метаболитов для выявления пороков развития плода.

Методы исследования: клинический, ультразвуковой, хроматографический.

Полученные результаты и их новизна: проведено изучение уровня гомоцистеина и его метаболитов в плазме крови, отмытых эритроцитах и околоплодных водах беременных женщин при нормально протекающей беременности и при пороках развития плода. Установлено, что имеет место достоверное повышение уровня гомоцистеина в плазме крови при пороках развития центральной нервной системы, пороках передней брюшной стенки, диафрагмальных грыжах, атрезиях пищевода, поликистозе почек, шейной гигроме и множественных врожденных аномалиях плода. Высокий уровень гомоцистеина в околоплодных водах ассоциируется с множественными врожденными пороками развития плода, а снижение его – с расщелинами лица, шейной гигромой и пороками передней брюшной стенки плода. Выявлено достоверное снижение уровня глутатиона и соотношения «глутатион/гомоцистеин» в отмытых эритроцитах при врожденных пороках сердца и множественных врожденных пороках развития плода. Определение уровня гомоцистеина в плазме крови женщин группы «резерва родов» позволяет оценить адекватность проводимой преконцептивной подготовки. Определение уровня гомоцистеина в плазме крови позволяет формировать группы риска среди беременных женщин и женщин группы «резерва родов» по возникновению врожденных пороков развития плода для проведения углубленной и своевременной диагностики.

Рекомендации по применению: показатели уровня гомоцистеина в плазме крови могут быть использованы в качестве диагностического маркера врожденных пороков развития плода в медицинских учреждениях, осуществляющих пренатальную диагностику. Уровень гомоцистеина в плазме крови может рассматриваться в качестве объективного критерия адекватности проводимой преконцептивной подготовки среди женщин группы «резерва родов».

Область применения: акушерство, пренатальная диагностика.