

УДК 618.33 – 077 – 053.1 : 616.153.478.6 – 008.61

СВЯЗЬ УРОВНЯ ГОМОЦИСТЕИНА У БЕРЕМЕННЫХ С НАЛИЧИЕМ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ВРОЖДЕННЫХ ПОРОКОВ РАЗВИТИЯ У ПЛОДА

А. Р. ПЛОЦКИЙ

Кафедра акушерства и гинекологии

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

Роль гомоцистеина в генезе врожденных пороков развития у плода широко обсуждается в печати. Цель нашего исследования – определить уровень гомоцистеина в плазме беременных женщин с наличием у плода врожденных аномалий. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии оценен уровень общего гомоцистеина в плазме крови у 154 пациенток, из которых 52 составили группу сравнения. Установлено статистически значимое повышение уровня гомоцистеина в плазме беременных женщин при наличии определенных видов пороков развития у плода, что должно использоваться в пренатальной диагностике этих состояний наряду с широко применяемыми методами.

Ключевые слова: гомоцистеин, беременные, пороки развития плода.

The role of homocysteine in congenital defects genesis is being discussed much in the periodical literature. The aim of the study is to define the concentration of plasma homocysteine in both healthy pregnant women and those with diagnosed congenital defects. The level of plasma homocysteine in 154 pregnant women was determined by precolumn HPLC with fluorescent detection. We have determined that some kinds of congenital defects are associated with the elevated level of plasma total homocysteine. Thus, we suggest that these findings should be employed in diagnostics together with the already used methods.

Key words: homocysteine, pregnant women, birth defects.

Введение

Роль гомоцистеина в возникновении врожденных пороков развития плода активно обсуждается в печати в последние несколько десятилетий [2, 16, 17]. Интерес к изучению гипергомоцистеинемии при пороках развития связан с трудностями своевременной диагностики этих состояний, отсутствием достаточных знаний по этиологии возникших нарушений, поиском действенных методов профилактики в связи с серьезными экономическими затратами на лечение детей с врожденными аномалиями. Несмотря на значительный прогресс в области ультразвуковой диагностики [3, 6], инвазивных методов исследования [5], значительное число пороков развития остается нераспознанным [4], что отражается на уровне перинатальной, младенческой смертности и, что особенно важно, на структуре первичной инвалидности [1]. В настоящее время гипергомоцистеинемия ассоциируется с осложнениями беременности (привычное невынашивание, гипертензивные расстройства, задержка внутриутробного роста плода), возникновением определенных видов пороков развития плода (пороки нервной трубки, пороки сердца и расщелины лица), нейродегенеративными заболеваниями, когнитивными нарушениями, псориазом, канцерогенезом [16].

Источником гомоцистеина в организме человека является метионин. Это незаменимая аминокислота, используемая в синтезе белка или в синтезе S-аденозилметионина [8]. При взаимодействии метионина с АТФ (процесс катализируется ферментом метионин аденозилтрансферазой) образуется S-аденозилметионин (SAM). Эта реак-

ция наблюдается практически во всех тканях. SAM является универсальным донором метильных групп для реакций метилирования, осуществляемых многочисленными метилтрансферазами [7]. Известно около 100 реакций, сопровождающихся переносом метильной группы на такие субстраты как протеины, нуклеиновые кислоты, липиды [7]. Например, метилирование ДНК является важным регуляторным механизмом экспрессии генов, основой эпигенеза. Гипометилирование ДНК приводит к нестабильности хромосом и способствует мутагенезу [11]. Результатом переноса метильной группы является образование S-аденозилгомоцистеина (SAH), который, в свою очередь, является ингибитором метилтрансферазных реакций, и поэтому должен быстро метаболизироваться. Этот процесс осуществляется с помощью соответствующей гидролазы и приводит к наработке гомоцистеина. Гомоцистеин далее вовлекается в синтез цистеина (процесс транссульфурирования), либо реметилируется в метионин [16, 17]. Источниками метильной группы в последней реакции могут служить метилентетрагидрофолат или бетаин. Излишек гомоцистеина элиминируется из клетки и появляется в плазме крови, где его уровень в норме не превышает 5 мкмоль/л.

Ключевым ферментом транссульфурирования Hcy является *цистатинин-β-синтаза*, коферментом которой служит витамин B₆. В физиологических условиях реакция необратима [9]. Образующийся в конечном итоге цистеин идет на синтез белка или на образование глутатиона. Излишек цистеина окисляется до таурина и неорганических сульфатов.

В реметилировании гомоцистеина участвуют кобаламин (витамин B_{12}) и фолиевая кислота, а именно 5-метилентетрагидрофолат в качестве донора метильной группы. Образование метилентетрагидрофолата катализируется *метилентетрагидрофолат редуктазой* (MTHFR) в необратимой реакции. Реметилирование гомоцистеина осуществляется с помощью *метионин синтазы*, коферментом которой является витамин B_{12} . Результатом реакции является образование тетрагидрофолата и метионина. Еще одним донором метильных групп для реметилирования гомоцистеина является бетаин (производное холина). Ферментом этой реакции является *бетаин-гомоцистеин метилтрансфераза*. Этот энзим, в основном, присутствует в печени [17].

Было показано, что у человека количество гомоцистеина, подвергающегося реметилированию и транссульфурированию, примерно равно [8]. Регулятором обмена гомоцистеина является уровень S-аденозилметионина в клетке, а также соотношение SAM/SAH. Высокие концентрации S-аденозилметионина ингибируют MTHFR, что уменьшает поток гомоцистеина в реакции, катализируемой *метионин синтазой*. В свою очередь это способствует метаболизму гомоцистеина посредством транссульфурирования (активируется *цистатионин-β-синтаза*), что имеет место, главным образом, в печени и, в меньшей степени, почках. В других тканях организма в основном преобладают реакции реметилирования. Таким образом, печень играет важную роль в метаболизме гомоцистеина, поскольку только в ней имеется основное количество *цистатионин-β-синтазы*.

Высокий уровень гомоцистеина может наблюдаться при повышенной скорости образования гомоцистеина, нарушении процессов транссульфурирования, снижении скорости реметилирования в метионин, применении метотрексата и противосудорожных препаратов.

Попадая в плазму, гомоцистеин связывается с белками (75%) или образует гомоцистин, т.е. находится в окисленном состоянии. На долю восстановленного гомоцистеина приходится всего лишь 1%. Сумма всех форм гомоцистеина, находящихся в плазме, носит название общий гомоцистеин (tHcy). Для определения гомоцистеина в плазме крови существует несколько методов. Наиболее часто используемым и надежным является метод высокоэффективной жидкостной хроматографии [21].

Цель работы – изучить уровень гомоцистеина в плазме беременных женщин при наличии врожденных аномалий развития у плода.

Материалы и методы

Проведено обследование у 154 беременных женщин, которые были разделены на две группы. В основную группу вошли 102 пациентки, у которых беременность была прервана по медико-генетическим показаниям в связи с наличием врожденных пороков развития у плода или родивших

детей с аномалиями различных органов и систем. Группу сравнения составили 52 пациентки, у которых дети родились без врожденных пороков развития. Основная группа беременных женщин была разделена на 14 подгрупп в зависимости от вида врожденной аномалии у плода. В эти подгруппы вошли пороки центральной нервной системы у плода (преимущественно гидроцефалия), пороки сердца, скелетные дисплазии, патология передней брюшной стенки, атрезии пищевода, диафрагмальные грыжи, пороки легких, пороки почек, пороки нервной трубки (анэнцефалия, spina bifida), хромосомные аномалии, цистогигромы шеи, расщелины лица и твердого неба, множественные врожденные пороки развития и опухоли перинатального периода (крестцово-копчиковые тератомы, кистозные образования брюшной полости у плода и лимфангиома шеи).

У всех пациенток натошак забиралась кровь из локтевой вены, помещалась в пробирки с гепарином и сразу же центрифугировалась. Полученная плазма (в количестве 1 мл) замораживалась при температуре -18°C . В дальнейшем образцы плазмы хранились при температуре -78°C до момента проведения анализа. Уровень гомоцистеина в плазме крови определялся методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC – high-performance liquid chromatography) с флуоресцентной детекцией. За основу взята методика Ubbick и Vermaak в собственной модификации [10].

В день проведения исследования 50 мкл размороженной плазмы смешивали с 5 мкл раствора TCEP (tris(2-carboxylethyl)phosphine) (100 мг/мл), после чего оставляли при комнатной температуре на 30 мин. Затем осаждали белки добавлением 50 мкл 10% раствора ТХУ (трихлоруксусная кислота) и центрифугировали при 4°C в течение 15 мин при 16000 g. В микропробирку объемом 200 мкл, содержащую 2 мкл 1,55 М NaOH, 12,5 мкл 0,125 М Na-боратного буфера с 200 мг/л ЭДТА, pH 9,5, и 5 мкл раствора SBD-F (ammonium 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonate) (1 мг/мл) в аналогичном буфере, вносили 10 мкл супернатанта и инкубировали 1 час при 60°C . После охлаждения при комнатной температуре в систему вводили 10 мкл реакционной смеси.

Разделение осуществляли на колонке Диасорб 130 C_{16}T , 3×250 мм, 7 мкм. Подвижная фаза: 0,1 М NaH_2PO_4 , 17 мМ CH_3COOH , pH 3,65, 40 мг/л ЭДТА, 3% ацетонитрила. Скорость потока 0,6 мл/мин, температура колонки 30°C . Детектирование осуществлялось по флуоресценции, 379/510 нм. Определения проводили на хроматографической системе Agilent 1100, содержащей 4-канальный градиентный насос, термостат колонок, автосамплер и детектор флуоресценции. Регистрация хроматограмм и их количественная обработка осуществлялись с помощью Agilent ChemStation A10.01.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием непараметрической статистики (рассчитывались медиана

(Me), 5, 25, 75 и 95 процентиля (5% : 25% и т.д.)). Сравнение групп осуществлялось при помощи критерия Манна-Уитни. Корреляционные связи изучались по методу Спирмена. Доверительный интервал (ДИ) был принят 95%.

Результаты и обсуждение

Как видно из представленных в таблице 1 данных, обе группы беременных существенно не отличались по всем исследованным параметрам.

Таблица 1. Клиническая характеристика обследованных женщин (Me; 25% – 75%)

Показатель	Основная группа N = 102	Группа сравнения N = 52	P
Возраст	25 22 – 30	27 22 – 30	> 0,05
Количество родов в анамнезе	0 0 – 1	0 0 – 1	> 0,05
Количество аборт в анамнезе	0 0 – 1	0 0 – 1	> 0,05
Менархе (лет)	14 13 – 14	13 12 – 14	> 0,05
Начало половой жизни (лет)	18 17 – 19	18 17 – 20	> 0,05
Рост пациенток (см)	164 159 – 170	164 162 – 168	> 0,05
Масса пациенток (кг)	65 57 – 72,5	59 54 – 66	> 0,05

Среди гинекологической патологии у пациенток обеих групп в равной степени встречались эрозия шейки матки и хронический аднексит. В структуре экстрагенитальной патологии большинство случаев составляли заболевания щитовидной железы, нейро-циркуляторная дистония, хронические заболевания желудочно-кишечного тракта. Тяжелых форм соматической патологии не выявлено ни у одной из пациенток обеих групп.

Уровень гомоцистеина в плазме крови беременных контрольной группы составил 5,81 (4,8 – 6,77) мкмоль/л.

Распределение пациенток в зависимости от уровня гомоцистеина и типа пороков развития у плода представлено в таблице 2.

Как видно из представленных в таблице 2 данных, в плазме беременных женщин при наличии врожденных аномалий у плода отмечался более высокий уровень гомоцистеина, чем у пациенток группы сравнения. Он был достоверно выше в случае верификации у плода гидроцефалии, атрезии пищевода, диафрагмальной грыжи, пороков нервной трубки, пороков передней брюшной стенки (омфалоцеле, гастрошизис), хромосомных аномалий, пороков почек, шейной гигромы и множественных врожденных пороков развития. Выявлен более высокий уровень гомоцистеина в плазме беременных при наличии у плода скелетных дисплазий, патологии легких и опухолей перинатального периода, однако различия с показателями контрольной группы оказалась статистически недостоверными. Наконец, при наличии у плода врожденных пороков сердца и расщелин верхней губы и твердого неба уровень гомоцистеина в плазме беременных женщин существенно не отличался от такового в группе сравнения ($p > 0,05$), хотя в литературе имеются указания на роль гомоцистеина в возникно-

Таблица 2. Уровень гомоцистеина (мкмоль/л) в плазме крови беременных основной группы

Исследуемые группы	Количество наблюдений	Уровень гомоцистеина (мкмоль/л) Me (25% - 75%)
Гидроцефалия	12	6,80 * 6,04 – 7,36
Патология передней брюшной стенки	8	6,71 * 6,08 – 8,76
Атрезия пищевода	3	7,75 * 6,88 – 13,00
Хромосомные аномалии	5	7,13 * 6,75 – 8,26
Врожденные пороки сердца	18	5,39 5,04 – 6,35
Диафрагмальная грыжа	4	8,90 * 8,11 – 16,14
Шейная гигрома	4	7,80 * 6,56 – 9,24
Скелетные дисплазии	9	6,75 6,24 – 7,29
Патология легких	6	6,71 6,08 – 8,76
Патология почек	6	8,31 * 5,89 – 11,15
Пороки нервной трубки	8	7,16 * 6,38 – 7,47
Расщелины верхней губы и твердого неба	6	5,18 3,58 – 5,91
Опухоли перинатального периода	4	7,99 6,25 – 9,25
Множественные врожденные пороки развития	9	10,10 * 6,93 – 12,38

* - разница показателей по сравнению с контрольной группой достоверна ($p < 0,05$).

вении пороков сердца и дефектов лица [15, 16, 18, 22].

Не найдено корреляционных связей между уровнем гомоцистеина и возрастом беременных, паритетом родов, началом менструальной функции и половой жизни у женщин основной группы. В группе сравнения выявлена прямая корреляционная связь содержания гомоцистеина с возрастом пациенток, не выявлено корреляции уровня гомоцистеина с другими изученными показателями, что согласуется с литературными данными [14].

Многие авторы считают, что причиной возникновения пороков развития плода может быть прямое тератогенное действие гомоцистеина [19]. Помимо того, гомоцистеин и его производное – гомоцистеин-тиолактон [12] нарушают процессы апоптоза, влияют на миграцию нейронов, регулируют потоки ионов Ca^{2+} через мембраны, подавляют синтез ферментов-антиоксидантов. Стоит отметить, что гомоцистеин-тиолактон может индуцировать апоптоз в цитотрофобласте [13, 20] и, кроме того, может инкорпорироваться в структуру полипептидной цепочки и менять конформационные свойства белков, приводя в конечном итоге к нарушению их нормального функционирования [13]. Возможной причиной гипергомоцистеинемии и, как следствие, формирования пороков развития может служить полиморфизм гена MTHFR. Описана мутация замены цитидина в 677 положении на тимидин (C677→T), приводящая к встраиванию аланина вместо валина в полипептидной цепи и появлению термоллабильных свойств фермента со снижением его активности на 50%. Частота этой мутации колеблется в разных регионах и среди

разных этнических групп, составляя у европейцев в среднем 10-20% [16, 17]; кроме того, изучается мутация A1298→C этого же гена.

Полученные нами данные подтверждают роль гомоцистеина в генезе пороков центральной нервной системы, аномалий передней брюшной стенки, а также атрезий пищевода и диафрагмальных грыж (см. табл. 2). Значительно повышен уровень гомоцистеина при хромосомных аномалиях (диагноз синдрома Дауна и синдрома Клайнфельтера был верифицирован при проведении амниоцентеза) и при выявлении шейной гиромы, наличие которой в 50% случаев также ассоциируется с патологией хромосомного аппарата. Возможной причиной хромосомной патологии может быть нарушение метилирования ДНК. Доказанным считается повышение частоты дефектов нервной трубки при гипометилировании ДНК в тканях развивающегося эмбриона [17].

Выводы

1. Полученные нами данные подтверждают роль гомоцистеина в генезе определенных видов пороков развития плода.

2. Оценка уровня гомоцистеина в плазме беременных женщин до 22-недельного срока должна использоваться в пренатальной диагностике наряду с другими методами исследования.

Литература

1. Жарко, В.И. Состояние здоровья женщин и детей Республики Беларусь / В.И. Жарко, Л.А. Постоляко, И.В. Митрошенко // Здоровая мать – здоровый ребенок: материалы 8 съезда педиатров Республики Беларусь, Минск, 23-24 ноября 2006 г.
2. Макацария, А.Д. Гипергомоцистеинемия и осложнения беременности / А.Д. Макацария, Е.В. Белобородова, С.М. Баймурадова. – Москва. Триада-Х, 2005. – 220 с.
3. Митьков, В.В. Клиническое руководство по ультразвуковой диагностике / В.В. Митьков, М.В. Медведев. – Москва. Видар, 1996. – 525 с.
4. Плоцкий, А.Р. Ошибки и трудности в диагностике врожденных пороков развития плода при ультразвуковом исследовании / А.Р. Плоцкий, Т.В. Драбович // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2005. – №3. – С. 230 – 232.
5. Прибушена, О.В. Сравнительная характеристика инвазивных методов пренатальной диагностики генетических аномалий плода: диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. 14.00.01 / О.В. Прибушена. – Минск, 2006. – 116 л.
6. Шарыкин, А.С. Современные возможности пренатальной диагностики пороков сердца / А.С. Шарыкин // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2003. – №6. – С. 9 – 15.
7. Blumenthal, R. S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases: structures and functions / R. Blumenthal // World Scientific Publishing Company. – 1999. – P. 393 – 400.
8. Finkelstein, J.D. Methionin metabolism in mammals / J.D. Finkelstein // J Nutr Biochem. – 1990. – Vol. 1. – P. 228 – 237.
9. Fowler, B. Disorder of homocysteine metabolism / B. Fowler // TJT Inter Metab. – 1997. – Vol. 20. – P. 270 – 285.
10. Giflix, B. Novel Reductant for Determination of Total Plasma Homocysteine / B. Giflix // Clinical Chemistry. – 1997. – Vol. 43. – P. 687-688.
11. Hultberg, B. Hypomethylation as a cause of homocysteine-induced cell damage in human cell lines / B. Hultberg // Toxicol. – 2000. – Vol. 147. – P. 69 – 75.
12. Jakubowski, H. Metabolism of homocysteine thiolactone in human cell culture: possible mechanism for pathological consequences of elevated homocysteine levels / H. Jakubowski // J. Biol. Chem. – 1997. – Vol. 272. – P.1935 – 1942.
13. Kamudhamas, A. Homocysteine thiolactone induces apoptosis in cultured human trophoblasts: a mechanism for homocysteine-mediated placental dysfunction? / A. Kamudhamas // Am J Obstet Gynecol. – 2004. – Vol. 191. – P. 563 – 571.
14. Kang, SS. Total homocysteine in plasma and amniotic fluid of pregnant women / SS Kang // Metabolism. – 1986. – Vol. 35. – P. 889 – 891.
15. Knott, L. Homocysteine oxidation and apoptosis: a potential cause of cleft palate / L. Knott // In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2003. – Vol. 39 (1-2). – P. 98 – 105.
16. Medina, M. Roles of homocysteine in cell metabolism: old and new functions / M. Medina // Eur. J. Biochem. – 2001. – Vol. 286. – P. 3871 – 3882.
17. van der Put, NMJ. Folate, homocysteine and neural tube defects: an overview / NMJ van der Put // Exp Biol Med. – 2001 – Vol. 226(4). – P. 243 – 270.
18. Rosenquist, TH. Genes, folate and homocysteine in embryonic development / TH Rosenquist, RH Finnel // Proc Nutr Soc. – 2001. – Vol. 60. – P. 53 – 61.
19. Rosenquist, TH. Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural tube / TH Rosenquist // Proc. Natl. Acad. US. – 1996. – Vol. 93. – P. 15227 – 15232.
20. Di Simone, N. Homocysteine induces trophoblast cell death with apoptotic features / N. Di Simone // Biol Reprod. – 2003. – Vol. 69. – P. 1129 – 1134.
21. Ueland, M. Total Homocysteine in Plasma or Serum; Methods and Clinical Application / M. Ueland // Clin. Chem. 39/9. – 1993.- Vol. 39. – P. 1764 – 1779.
22. Zhu, H. Are the methyltransferase genes risk factors for spina bifida and orofacial clefts? / H. Zhu // Am TJT Med Genet A. – 2005. – Vol. 15. -P. 274 – 277.

Resume

RELATIONSHIP OF TOTAL PLASMA HOMOCYSTEINE IN PREGNANT WOMEN WITH DIFFERENT KINDS OF CONGENITAL DEFECTS

A. R. Plotski

Grodno State Medical University

Homocysteine, a sulfur aminoacid, is involved in many methabolic pathways. Abnormal elevation of total plasma homocysteine is associated with cardiovascular diseases, developmental disorders, complications of pregnancy. Total homocysteine was determined by HPLC in 154 pregnant women. Our findings confirm the role of homocysteine in genesis of some congenital defects. It is necessary to use the estimation of homocysteine in prenatal diagnostics.

Поступила 28.03.07