

Univerzita Karlova

3.lékařská fakulta

2006/2007

Diplomová práce

**Metabolismus homocysteinu a jeho vztah k
intrauterinní růstové retardaci**

autor: Michal Soták

školitel: as.MUDr. Daniela Palyzová, Csc

Praha, listopad 2006

Čestné prohlášení:

Já, Michal Soták prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci zpracoval samostatně na podkladech uvedené literatury.

Zároveň bych rád poděkoval as. MUDr. Palyzové, Csc za pečlivou supervizi nad mou diplomovou prací.

V Praze dne 10.listopadu 2006

.....

Michal Soták

Obsah:

ÚVOD	4
HOMOCYSTEIN, MOLEKULA TĚŠÍCÍ SE POZORNOSTI.....	5
METABOLISMUS HOMOCYSTEINU	5
ZVÝŠENÍ HLADINY HCY SE OZNAČUJE JAKO HYPERHOMOCYSTEINEMIE ...	7
NEPŘÍZNIVÉ PŮSOBNÍ HOMOCYSTEINU	7
METODIKA VYŠETŘENÍ HOMOCYSTEINEMIE	8
LÉČBA HYPERHOMOCYSTEINEMIE	9
LITERÁRNÍ REŠERŠE	10
VLASTNÍ STUDIE	15
HYPOTÉZA	15
CÍL	15
ÚVOD DO STUDIE	16
METODY VÝZKUMU	16
VÝSLEDKY	17
DISKUZE	18
ZÁVĚR	19
LITERÁRNÍ ZDROJE.....	20
PŘÍLOHA Č.1.....	22
PŘÍLOHA Č.2.....	23
PŘÍLOHA Č.3.....	24
PŘÍLOHA Č.4.....	25
PŘÍLOHA Č.5.....	26

Úvod:

V minulých desetiletích bylo odhaleno již mnoho rizikových faktorů aterosklerózy a jejích klinických projevů v čele s ischemickou chorobou srdeční. V současnosti je jich známo více než 350 - trvale zůstávají v popředí dyslipidémie, hypertenze, kouření, diabetes. K pěti nejzávažnějším se řadí také zvýšené plazmatické koncentrace sirmé aminokyseliny homocystein (Hcy) – hyperhomocysteinemie (hHcy).

Hyperhomocysteinemie je považována za dobře dokumentovaný rizikový faktor časného nástupu aterosklerózy a centrální i periferní vaskulopatie u dospělých pacientů, sklonu k trombofilii, opakovaným potratům a porodům plodů s nízkou porodní hmotností (12).

Hypoteticky lze tedy Hcy považovat za riziko vaskulopatie placentární, jejímž důsledkem je rozvoj placentárních infarktů a konečně nutriční deficit plodu a IUGR.

Homocystein, molekula těšící se pozornosti...

Homocystein neboli 2-amino-4-thiomásečná kyselina je nejbližší homolog cysteinu (Cys). Narozdíl od něj a ještě další sirmé aminokyseliny – methioninu (Met), však není stavební jednotkou bílkovin. V biologických tekutinách se vyskytuje jako volný nebo vázaný na krevní bílkoviny případně lipoproteiny, a to nejen disulfidickými vazbami, ale i vazbou amidovou, čímž vytváří protein-homocysteinový můstek. Pod pojmem Hcy lze chápat několik jeho forem vytvářejících jakýsi pool sestávající z redukováného Hcy (1-2%), homocystinu (oxidovaná forma 5-10%) a smíšených disulfidů Hcy (5-10%). Podíl vázaného Hcy (protein-disulfid) tvoří 70-90% z celkového Hcy (tHcy).

Chemicky má Hcy vlastnosti jako Cys, od něj a dalších aminolaktonů se však odlišuje tím, že vytváří Hcy thiolakton (Hcy-TL), který je vysoce reaktivní. Syntéza Hcy-TL je spřažena s proteosyntézou a Hcy je v této formě transportován z buněk do extracelulárního prostředí (9).

Metabolismus Homocysteinu:

Kaskáda metabolismu Hcy je komplikovaná (příloha č.1). Ve stručnosti lze říci, že vstupním substrátem je živočišná bílkovina, jmenovitě esenciální aminokyselina Met. Do jednotlivých metabolických kroků významně zasahují enzymatické kofaktory nezbytné pro správný sled biochemických reakcí: Vitamin B12, B6 a kyselina listová (folát).

Metabolismus Hcy protínají dvě metabolické dráhy a to dráha remetylační a transulfurační.

1) V remetylační dráze je Hcy přeměněn na Met. Reakce vyžaduje kyselinu listovou a vitamin B12, či betain (degradační produkt cholinu resp. lecithinu) v alternativní reakci. V prvním kroku Hcy získá metylovou skupinu z 5-methyltetrahydrofolátu nebo z betainu. Poté následují dvě možnosti reakce: a) přes 5-methyltetrahydrofolát - homocystein methyltransferázu (MTHF) v přítomnosti metylkobalaminu, probíhající v játrech, ledvinách a mozku. b) přes betain-homocystein methyltransferázu (BHMT), která není závislá na metylkobalaminu a probíhá výlučně v játrech.

2) Transulfurační dráha je závislá na přítomnosti pyridoxal-5-fosfátu. Tato cesta homocysteinu je ireversibilní. Hcy kondenzuje se serinem za vzniku cystathioninu, reakce je katalyzována cystathion- β -syntházou (CBS), která vyžaduje vitamin B6 jako

kofaktor, ten je dále použit v následující reakci, během které je cystathionin dále štěpen na několik dílčích produktů, mezi nimiž je i Cys. Tento může být dále ještě zmetabolizován až na taurin či sulfát. Důležitým produktem vzniklým z Cys je tripeptid glutathion, který díky své reaktivní –SH skupině je v podstatě součástí všech redox dějů probíhajících v buňkách. Mimo to Cys poskytuje svou reaktivní –SH skupinu také koenzymuA, bez jehož katalýzy by neprobíhala řada důležitých metabolických dějů.

Z charakteru dvou základních metabolických cest vyplývá, že nedostatek Met v potravě nelze nahradit Cys, naproti tomu nedostatek Cys už Met nahradit nelze.

Významný podíl Met je aktivován v přítomnosti ATP za vzniku S-adenosyl methioninu (SAM), jež slouží jako univerzální donor metylových skupin pro akceptory: př.: guanidoacetát, fosfatidyletanolamin, dopamin, proteiny, DNA, RNA). Optimální intracelulární koncentrace S-adenosyl-methioninu koordinují a udržují navzájem propojenou regulaci remetylační – syntetické i degradační – transsulfurační dráhy.

O tom, kterou dráhou bude Hcy metabolizován je závislé na redoxních podmínkách v místě jeho vzniku. Obecně lze říci, že redukční prostředí podporuje enzymatickou cestu, která vede k Met a analogicky oxidační prostředí je příznivé spíše ve prospěch Cys. Samozřejmě pouze přítomnost oxidačního či redukčního prostředí k rozběhnutí reakcí jistým směrem nestačí. Nezbytná je proto zároveň dostupnost již zmíněných mikronutrientů.

Při vysokém příjmu Met a současně snížené funkci mikronutrientů se přestává Hcy dostatečně metabolisovat. Hcy se nemůže hromadit v buňkách tj. výkyvy jeho hladin jsou následovány přesunem do extracelulárního kompartmentu. Formou, jakou je Hcy takto transportován, je již zmíněná jeho reaktivní forma Hcy- cyklický thioester Hcy- TL.

Pokud Hcy unikne z buněk do krevního řečiště, rychle reaguje s aktivními skupinami bílkovin, s nízkomolekulárními látkami přítomnými v krvi, jakož i s rozpuštěným kyslíkem. To vše vede ke vzniku volných kyslíkových radikálů, které jak samy tak i zprostředkovaně poškozují endotel cév a mohou tak iniciovat vznik lokálních aterosklerotických plaků (9, 10).

Zvýšení hladiny se Hcy označuje jako hyperhomocysteinemie:

Zvýšení hladiny Hcy se označuje jako hyperhomocysteinemii (hHcy).

Kritéria hHcy nejsou dosud jednoznačně definována. Podle jedné z prací našeho předního odborníka v problematice homocysteinu, prof. Hyánka, je normohomocysteinemie definovaná v rozmezí $10,3 \pm 1,9 \mu\text{mol/l}$ pro ženy a $12,5 \pm 1,7 \mu\text{mol/l}$ pro muže. Nejstarší kritéria dle Malinowa rozdělují hHcy na mírnou ($16-30 \mu\text{mol/l}$), středně závažnou ($31-100 \mu\text{mol/l}$) a těžkou (nad $100 \mu\text{mol/l}$).

Nutno podotknout, že hladina Hcy není stacionární a mění se v závislosti nejen na pohlaví, ale především na věku a jiných okolnostech, např. těhotenství (1).

U dětí je hladina Hcy podstatně nižší, během dětství a dospívání stoupá, v dospělosti je vyšší u mužů než u žen, v průběhu těhotenství u ženy dochází k fyziologickému poklesu, nejspíše v důsledku aktivace pohlavních hormonů, naopak v klimakteriu hladina významně stoupá k hodnotám obvyklým u dospělých mužů (pokles hormonů, nedostatek mikronutrientů...)

Příčiny hHcy jsou komplexní, lze je však pro přehlednost rozdělit do dvou skupin:

1) exogenní

- nutriční faktory-nadbytek Met v potravě, deficit mikronutrientů (B12, B6, folát)
- fyziologické faktory – věk, pohlaví, menopauza, rasa
- patologické faktory – kouření cigaret, alkoholismus, snížená funkce ledvin, psoriáza, rakovina, kardiální a renální transplantace
- iatrogenní faktory – orální kontraceptiva, metotrexát, rajský plyn, antikonvulziva, sulfasalazin

2) endogenní:

- insuficience či deficit enzymů zasahujících do metabolismu Hcy
defekt MTHFR, CBS, methionin synthasa

Nepříznivé působení homocysteinu:

Je známo více jak 18 toxických účinků Hcy, které je možno sumarizovat do 3 skupin:

a) přímé poškození endotelu, b) změny oxidoredukčního poolu, c) změny antitrombogenní rovnováhy organismu v trombogenní (12)

Již mírné zvýšení hladiny Hcy je spojeno s celou řadou nežádoucích účinků, tyto účinky se projevují především na cévní stěně v podobě periferních, koronárních a

mozkových vaskulopatií (destrukce elastinu, deformace endotelu, zvýšená tvorba kolagenu atd). Vše je ještě akcentováno vlivem na oxidoredukční rovnováhu (zvýšená tvorba peroxidu a radikálů) a sklonem k trombózám z důvodu změn koagulačních proteinů.

V mé diplomové práci se soustředím především na nepříznivé účinky Hcy v průběhu těhotenství jak pro matku tak především pro dítě.

Hyperhomocysteinemie je uváděna v příčinném vztahu k závažným vrozeným vývojovým vadám (rozštěp neurální trubice, orofaciální rozštěpy, vrozené srdeční vady, Downův syndrom), mateřským komplikacím těhotenství (preeklampsie, eklampsie), délce těhotenství (předčasné porody, potraty), vývoji placenty (abrupce placenty, placentární infarkty) a v neposlední řadě i intrauterinní růstové retardaci (IUGR) (2).

Na místě je vymezení pojmu IUGR, která je definována porodem plodu, jehož porodní hmotnost je snížena pod 10-tý percentyl pro gestační věk a pohlaví dítěte. Příčiny IUGR jsou komplexní

Nejzávažnější důsledky extrémně zvýšené hladiny Hcy má pro dětského nositele homocystinurie. Jedná se o hereditární onemocnění související s deficiencí enzymu CBS, který je nepostradatelný pro transsulfurační přeměnu Hcy v Cys. Tento defekt vede k multisystémovému onemocnění s poškozením zejména pojivové tkáně, svalů, CNS a kardiovaskulárního systému.

Metodika vyšetření homocysteinemie:

Ke stanovení hladiny Hcy a dalších je k dispozici hned několik metod. Liší se zejména rychlostí zpracování, náročností technického postupu, pořizovací cenou přístroje a cenou za stanovení koncentrace z jednoho odběru, který se aktuálně pohybuje kolem 500 Kč. Uvědomíme-li si skutečnost, že stanovení koncentrace Hcy pouze z jednoho odběru nemá příliš vysokou výpovědní hodnotu, nýbrž je spíše nutné sledovat vývoj změny jeho koncentrace po stanoveném čase (např.: po suplementaci folátem a vitamínem B12 po dobu tří měsíců) dostáváme se na sumu za vyšetření, která je v současné době limitujícím faktorem pro rutinní vyšetřování tohoto aminothiolu (10).

Pro správné provedení analýzy je nutno zachovat přesný postup jak zacházet se vzorkem, aby nedošlo ke zkreslení výsledků. Během 20 minut po odběru je nutno krevní elementy oddělit od plazmy a tu zmrazit na teplotu -20°C až do doby samotného zpracování. Pro správné stanovení tHcy je nutno jej uvolnit ze všech vazeb redukcí,

přidáním redukčního činidla k plazmě. Následuje derivatizace redukovaného Hcy fluorescenčním činidlem s následnou analýzou vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) s fluorescenční detekcí. Další možností je kombinace plynové chromatografie s hmotovou spektrometrií (GC-MS). Dostupnou alternativou je radioenzymatická či imunochemická analýza, při kterých je využita konverze Hcy na S-adenosyl homocystein, jež je následně separován metodou HPLC nebo tenkovrstevnou chromatografií (TLC) (13).

Léčba hyperhomocysteinemie:

Dosud se autoři neshodují na přesném fyziologickém rozmezí homocysteinemie. Jejich názory se rozcházejí i v doporučení léčby hHcy. Ve vší dostupné literatuře se sice objevuje klasická vitaminová trojkombinace folátu, vitamínu B12 a B6, ale zbytek tj. od jaké hladiny začít s léčbou, jak dávkovat, u koho a jak dlouho se podstatně liší.

Je známo, že mírnou hHcy lze ovlivnit výživou bohatou na již zmíněné mikronutrienty. American Cardiovascular Society indikuje léčbu při plamatických koncentracích Hcy nad 10,0 μ mol/l, naproti tomu Evropská International Task Force for Prevention of Cardiovascular Disease má hranici nad 12 μ mol/l.

Komise pro výživu American Heart Association vydala v roce 1999 doporučení pro léčbu mírné hHcy začínající úpravou diety a kontrolou homocysteinemie po jednom měsíci. Nedojde-li k poklesu tHcy nalačno pod 10 μ mol/l, doporučuje se následující kombinace: 400 μ g folátu, 6 μ g vitamínu B12 a 2mg. Při nedostatečném efektu, následuje zvýšení doporučených dávek na 1mg folátu, 0,5mg vitamínu B12 a 25mg pyridoxinu denně. Jako třetí krok léčby autoři doporučují podání 3g betainu 2x denně.

Vitaminová intervence u osob s hHcy představuje elegantní a poměrně levný nástroj ke snížení její hladiny a tím prevenci řady onemocnění. Zajímavým řešením se zdá být celopopulační zásah do prevence hHcy fortifikací základních potravin, tak jak to provádějí např. v USA od roku 1998 s moukou či pomerančovou šťávou, kde jen samotný přívod 100 μ g folátu/den v obohacené pomerančové šťávě vedl ke zdvojnásobení plazmatických folátů a poklesu prevalence mírné homocysteinemie z 20% na 15% (11).

Literární rešerše:

Claire Infante-Rivard et al., Unexpected Relationship between Plasma Homocysteine and Intrauterine Growth Restriction, Clinical Chemistry 49:9, 1476-1482, 2003

Mírná hHcy je považována za rizikový faktor trombózy a aterosklerózy.

Hypotéza: Vyšší mateřská a novorozenecká koncentrace plazmatického Hcy zvyšuje riziko IUGR z důvodu placentárních trombóz.

Metody: Autoři uskutečnili srovnávací studii zahrnující případy dětí narozených s porodní hmotností pod desátým percentilem pro gestační věk a pohlaví podle Kanadských novorozeneckých norem. Kontrolní skupina byla složena z dětí narozených ve stejném časovém období, nacházejících se svou porodní hmotností nad desátým percentilem. Byly odebrány vzorky krve od 483 matek s hypotrofickým novorozencem a 468 matek kontrolní skupiny. Analogicky u 409 hypotrofů a 438 kontrol.

Výsledky: Plazmatické hladiny Hcy byly velkou měrou do 15 $\mu\text{mol/l}$. Oproti očekávání, zvýšené hladiny Hcy, zvláště u matek se jeví jako protektivní proti IUGR. Matky hypotrofických novorozenců měly nižší hladiny homocysteinu než matky fyziologických novorozenců.

Hyánek et al., Homocysteinemie – její význam v gynekologii a porodnictví, Česká Gynekologie 65, č.6, str.406-412, 2000

Jedná se o práci s cílem získání vlastních dat o plazmatických hladinách Hcy v naší zdravé i nemocné populaci těhotných i netěhotných žen.

Metodika: Stanovení tHcy v plazmě, plodové vodě a fetálním séru chromatografickou metodou s fluorescenční detekcí

Výsledky: Normální homocysteinemie tj. u zdravých netěhotných preklimakterických žen činí $9,7 \pm 1,6 \mu\text{mol/l}$ a zvyšuje se věkem. U zdravých klimakterických žen dosahuje hodnot jako u mužů $11,8 \pm 2,6 \mu\text{mol/l}$. Při pravidelném užívání hormonální antikoncepce hladina Hcy mírně klesá na $7,2 \pm 2,0 \mu\text{mol/l}$. U fyziologických gravidit dosahuje nejnižších hodnot $4,4 \pm 1,7 \mu\text{mol/l}$, v šestinedělí se však zvyšuje téměř na dvojnásobek $8,4 \pm 2,1 \mu\text{mol/l}$. U patologických gravidit je mírně zvýšená $6,3 \pm 2,1 \mu\text{mol/l}$, nejvýrazněji pak po abrupci placenty $7,5 \pm 1,7 \mu\text{mol/l}$. V plodové vodě u zdravých těhotných jsou hodnoty Hcy nízké $4,1 \pm 1,2 \mu\text{mol/l}$ bez výrazného kolísání v průběhu

těhotenství. Ve fetálním séru u rizikových gravidit byla nalezena průměrná hodnota $3,6 \pm 1,4$ $\mu\text{mol/l}$. Fetoplacentární kvocient pro Hcy činil 0,62 (příloha č.2).

Závěr: v průběhu fyziologické gravidity nebyly shledány významnější rozdíly v jednotlivých trimestrech těhotenství.

Estrogeny stimulují remetylační přeměnu Hcy alternativní metabolickou cestou přes betainhomocystein metyltransferázu.

Nález hHcy u rizikových gravidit se nepodařilo dokázat z důvodu plné saturace těchto těhotných vitaminovými doplňky tj. folátem, vitaminem B6 a B12.

Po tříměsíčním užívání hormonální antikoncepce ve skupině zdravých žen (17-23 let) došlo k poklesu hladiny tHcy z $9,5 \pm 2,6$ mol/l na $7,2 \pm 2,0$ mol/l , současně se snížila hladina vitaminu B12, u folátu bylo pozorováno signifikantní zvýšení.

Malinow M.R. et al., The relationship between maternal and neonatal umbilical plasma homocysteine suggest a potential role for maternal homocysteine in fetal metabolism, American Journal of Obstetrics and Gynecology, 178 (2): 228-233, 1998

V této studii byla testována hypotéza, podle které se Hcy pohybuje mezi matkou a plodem, a je jím výrazně sekvestrován.

Sledovány byly hodnoty Hcy v mateřské venózní krvi, umbilikální arteriální a venózní plazmě plodů.

Byl zjištěn plazmatický gradient na každém stupni na cestě matka - umbilikální vena - umbilikální arterie asi o 1 $\mu\text{mol/l}$. Z výsledků lze soudit, že dochází k významné sekvestraci mateřského Hcy plodem, pro něhož má nejspíše významnou nutriční roli.

Jean-Claude Minet et al., Assessment of vitamin B12, folat and vitamin B6 status and relation to sulfur acid metabolism in neonates, American Journal of clinical Nutrition, Vol 72, No 3, 751-757, 2000

Cílem studie bylo stanovení referenčních hodnot Hcy u novorozenců a stanovení jeho vztahu k vitaminu B12, B6, folátu, cysteinu a nutričním faktorům

Metodika: Ve studii bylo vyšetřeno 123 zdravých novorozenců: věk 1-25 dnů (median 5 dnů), porodní hmotnost $3159 \pm 685\text{g}$, gestační věk $39 \pm 2,4$ týdne, 13% nedonočených, 10% donošených hypotrofických.

Výsledky: Nízká koncentrace vitaminu B6 nebyla spojena s vyšším tHcy.

Již lehce snížená hladina folátu u některých novorozenců byla spojena se signifikantně vyšším tHcy než u novorozenců s normálním či vyšším folátem.

Jedinci s B12 deficiencí měli též sigifikantně vyšší hladiny tHcy než jedinci s normálním B12.

U dětí kojených byla nalezena vyšší hladina Cys a významně nižší hladina vitamínu B12 než u dětí uměle živených. Stejný charakter měly i hladiny tHcy, které byly vyšší ve skupině dětí přirozeně kojených.

Nebyly nalezeny žádné rozdíly v plazmatických hodnotách tHcy, cysteinu ani vitamínů v závislosti na pohlaví.

Závěr: Ukazuje se, že koncentrace tHcy jsou u novorozenců určeny spíše sérovou hladinou vitamínu B12, cysteinem a folátem, přičemž nejsilnější spojení bylo nalezeno mezi vitamínem B12 a tHcy, kde koncentrace Hcy rostla exponenciálně s klesající koncentrací B12.

Bylo prokázáno, že zvýšené hladiny tHcy se snížily k normě pokud kojené děti dostali suplementaci vitamínem B12.

tHcy je senzitivní index pro detekci sérové deficiencie vitamínu B12 u novorozenců.

Cystein a vitamín B12 jsou nezávislé faktory metabolismu tHcy u novorozenců.

Böhles H. et al., Maternal plasma homocystein, placenta status and docosahexaenoic acid concentration in erythrocyte phospholipids of the newborn, European Journal of Pediatrics, Volume 158, Number 3, 243-246, February 1999

Zvýšený transport polynenasycených mastných kyselin s dlouhým řetězcem, zvláště kyseliny docosahexaenové (DHA) směrem k plodu plní důležitou placentární funkci pro adekvátní tvorbu membránových fosfolipidů a tím i kvalitu fetální myelinizace CNS.

Zvýšené koncentrace plazmatické hladiny tHcy jsou spojeny se zvýšeným rizikem předčasné okluzivní vaskulární nemoci, z tohoto důvodu byl nepřímo sledován vliv mateřské koncentrace tHcy na placentární funkci měřením DHA obsahu fosfolipidů v erytrocytární membráně novorozenců

Materiál: Ve studii bylo sledováno 60 těhotných žen ve věku 21 – 39 let, gestační věk 26-41 týdnů, před porodem byla placenta zobrazena sonograficky, kompletní data byla obdržena od 43 žen a jejich dětí. Koncentrace tHcy byly stanoveny z mateřské venózní krve a pupečnickové krve novorozence. Současně byly vyšetřeny se i hladiny mastných kyselin z fosfolipidů z erytrocytární membrány.

Výsledky: Mateřská plazmatická hladina tHcy dosahovala průměrné hladiny 6,29 +/- 3,34 µmol/l. Byly nalezeny signifikantně vyšší hladiny tHcy u matek s těhotenstvím komplikovaným gestózou či placentárními kalcifikacemi. Zároveň mateřská koncentrace tHcy a koncentrace DHA v ery jejich dětí vykazovala signifikantní korelaci ($p < 0,0003$)

Závěr: Koncentrace tHcy byly zvýšeny u matek s jasnými známkami placentární vaskulopatie, dále zde byla prokázána pozitivní korelace mezi mateřskou koncentrací tHcy s DHA v erytrocytárních membránách jejich dětí, což může být považováno za indikátor placentární vaskulární funkce.

Hongsprabhasa P. et al., Plasma Homocysteine Concentrations of Preterm Infants, Biology of the Neonate,; 76: 65-71, 1999

Mírná hyperhomocysteinemie u dospělých je asociována se zvýšeným rizikem vaskulárních chorob.

Přestože jsou již dostupná data o hladinách Hcy v dětství, stále chybí jakákoliv data u nedonošených novorozenců, navzdory jejich známým abnormalitám v metabolismu sulfurových aminokyselin.

Metodika: Měřena byla plazmatická koncentrace tHcy u 9 nedonošených dětí (gestační věk 23-31 týdnů) do 48 hodin po narození a dále pak 14 dní poté. Současně byl stanoven tHcy u 4 donošených dětí (gestační věk 36-39 týdnů).

Výsledky: Průměrná hodnota tHcy u nedonošených dětí odebraných do 48 hodin po porodu byla 3,8 +/- 0,3 µmol/l, u dětí narozených v termínu 6,1 +/- 1,3 µmol/l.

Závěr: Plazmatická koncentrace tHcy během 14 dní po porodu stoupá. hHcy nebyla u nedonošených dětí nalezena.

Walker MC et al., Changes in homocysteine levels during normal pregnancy, American Journal of Obstetrics and Gynecology, 180(3):660-664, March 1999

Cílem studie bylo zjistit změny v plazmatické koncentraci tHcy během fyziologického těhotenství.

Metodika: Koncentrace tHcy spolu s albuminem, vitamínem B12 a folátem byly stanoveny u 155 žen v každém trimestru těhotenství a sledován vztah mezi jednotlivými hodnotami.

Výsledky: Nalezená koncentrace Hcy v 8.–16. gestačním týdnu byla 5,6 µmol/l, ve 20.–28. týdnu 4,3 µmol/l a v 36.–42. týdnu 5,5 µmol/l oproti hodnotě 7,9 µmol/l změřené

v netěhotné kontrolní skupině. Hladiny tHcy byly signifikantně nižší ve všech třech trimestrech těhotenství oproti kontrolní skupině ($p < 0,001$). Dále hladiny tHcy přímo korelovaly s hladinami plazmatického albuminu, které v průběhu těhotenství klesají. U žen, které braly folátovou suplementaci koncentrace tHcy klesaly.

Závěr: Sérové koncentrace celkového Hcy během těhotenství klesají spolu s fyziologickým poklesem albuminu.

Vlastní studie:

Hypotéza:

Výkyvy plazmatických hladin homocysteinu a jeho kofaktorů jsou rizikovými faktory v rozvoji intrauterinní růstové retardace.

Cíl:

Cílem pilotní studie je definovat základní faktory metabolismu Hcy u fyziologických a hypotrofických novorozenců a jejich vztahu k placentární vaskulopatii.

Studie testuje hypotézu podílu hHcy na mechanismech rozvoje IUGR, u níž předpokládáme příčinnou souvislost s manifestací některých chronických onemocnění včetně vyššího výskytu kardiovaskulárních chorob a hypertenze v dospělosti.

Studie probíhala se souhlasem Etické komise 3.LF UK a FNKV.

Materiál:

V projektu byly statisticky hodnoceny vybrané parametry dvou souborů matek a jejich donošených novorozenců. V průběhu posledních dvou let byly vyšetřovány 2 soubory dvojic „matka – novorozenec“. Cílový soubor tvoří zatím 36 matek a jejich hypotrofických novorozenců s IUGR. Kontrolní soubor sestává z 37 dvojic matek a jejich fyziologických novorozenců. Inkluzivními kritérii byl 1) fyziologický průběh těhotenství, 2) matky bez farmakoterapie v průběhu gravidity, 3) v době porodu dosažený gestační věk 38 – 42 týdnů, 4) uspokojivý zdravotní stav novorozence po narození bez nutnosti intenzivní péče, 5) souhlas matky s účastí na studii

Tab. 1 Základní data charakterizující soubor

<i>Charakteristika souborů</i>	<i>Soubor A</i>	<i>Soubor B</i>
Matka a novorozenec	37	36
Průměrný gestační věk (týdny)	39,5	38,9
Průměrná hmotnost placenty (gramy)	604,3	404,3
Průměrná hmotnost novorozence (gramy)	3352	2370
Průměrná tělesná délka novorozence (cm)	50,7	45,9

Soubor A: zdravé matky a jejich zdraví novorozenci
Soubor B: zdravé matky a jejich novorozenci s IUGR

Metody výzkumu:

Dotazník soustředěný na zdravotní stav matky, průběh těhotenství současného i předchozích, identifikace závažného rizika kardiovaskulárního onemocnění v rodinách matky i otce.

Biochemická část: Vyšetření plazmatických hladin Hcy, folátu, kobalaminu a pyridoxinu. Novorozencům byl odběr proveden umbilikální krve. Matkám byla odebrána venózní krev bezprostředně po porodu (Hcy1) a další vzorek 4.-5. den po porodu (Hcy2). Krev byla do 20-ti minut transportována do biochemické laboratoře, centrifugována, sérum separováno a zmrazeno. Uchováno bylo až do zpracování při -20°C. Současně při odebrání krevních vzorků byl získán i materiál pro DNA banku u všech probandů (příloha č.4).

Antropometrická měření: zahrnující obvodové, délkové, šířkové a hmotnostní parametry včetně několika kožních řas na předem definovaných místech. To vše ke sledování dalšího růstu a vývoje hypotrofických dětí (příloha č.3).

Placenty: získané údaje o hmotnosti placent, ale i jejich případné makroskopické změny.

Záznamy z ultrazvukového vyšetření v průběhu těhotenství: během sběru dat z dostupné dokumentace bohužel nebylo možno zajistit srovnatelná data UZ fetální somatometrie z důvodu nedodržení obvyklých termínů UZ a neúplnosti použitých somatometrických parametrů.

Statistické metody: Pro porovnání jednotlivých parametrů a zjištění statistické významnosti mezi nimi byl použit dvouvýběrový (párový) t-test.

Výsledky:

Průměrné plazmatické hladiny Hcy v souboru matek a jejich hypotrofických novorozenců jsou o něco vyšší než u matek a dětí souboru kontrolního. Ze statistického hlediska jde spíše o trend, protože rozdíly nebyly statisticky významné (příloha č.5).

Hladiny plazmatického folátu souborů matek jsou téměř identické a porovnáváním souboru dětí nebyla nalezena statistická významnost.

Zajímavým se jeví výpočet korelací mezi plazmatickými hladinami kobalaminu, kde oproti očekávání, byly nalezeny vyšší hodnoty v souboru matka-hypotrofický novorozenec a to statisticky významné na hladině významnosti 1% resp. 5%. Rovněž byly nalezeny v obou souborech významně vyšší hladiny vitamínu B12 u dětí než u jejich matek.

Hladiny vitamínu B6 byly vyšetřeny pouze u novorozenců a matek fyziologického souboru, z technických důvodů chybí výsledky hypotrofických probandů, proto nejsou výsledky zmíněny vůbec.

S výjimkou hladiny kobalaminu nebyly nalezeny významné rozdíly mezi laboratorními parametry fyziologických a hypotrofických novorozenců.

Určujícím prvkem v metabolismu Hcy v novorozeneckém období se zdá být hladina vitamínu B12.

Při porovnání hmotností placent byly shledány placenty matek s hypotrofickým novorozencem statisticky významně nižší než u kontrolního souboru ($p=0,0001$).

Diskuze:

Problematice metabolismu Hcy v dospělém věku bylo doposud věnováno poměrně velké množství prací. To ovšem neplatí o období novorozeneckém, kde jednoznačná referenční rozmezí homocysteinemie pro tuto nejmladší věkovou kategorii chybí, tudíž není jednoduché vlastní výsledky srovnat s již dříve publikovanými daty.

Studie nám potvrdila vzájemnou souvislost mezi biochemickými parametry matky a dítěte, svědčící pro sekvestraci Hcy plodem. S výjimkou hladin kobalaminu nebyly nalezeny významné rozdíly mezi laboratorními parametry fyziologických a hypotrofických novorozenců.

U novorozenců se jeví silná asociace u tHcy a vitamínu B12, která je větší než mezi folátem a tHcy, což znamená, že určujícím mikronutrientem v metabolismu Hcy se zdá být vitamin B12 a nikoliv folát jak je tomu v pozdějším věku. Fyziologicky je hladina kobalaminu u novorozence vyšší než u matky. Mechanismů na vysvětlení tohoto jevu je několik: a) placentární přenos kobalaminu se děje i proti koncentračnímu gradientu, pravděpodobně díky existenci specifického placentárního receptoru pro transkobalamin II, b) placenta extrahuje mikronutrienty z mateřského oběhu ve prospěch fetu, c) vitamin B12 a folát jsou účinně sekvestrovány v intervilózních prostorech placenty, d) fetus retinuje většinu kobalaminu v krvi, protože fetální játra obsahují jen 30% obsahu kobalaminu ve srovnání s dospělými (i při kalkulaci $\text{pg vitB12/1mg tkáně}$). Důvodem je nezralost jaterního systému plodu (16, 17).

U matek během těhotenství jejich hladina kobalaminu klesá i při zachování uspokojivé celkové zásoby. Detailní mechanismus tohoto procesu není známý, předpokládá se výrazná spotřeba vitamínu B12 pro buněčný metabolismus během organogeneze, hormonální vlivy a zvětšení plazmatického objemu (14, 15).

Podle některých studií může být až polovina mírných hHcy podmíněno dědičnými odchylkami v podobě mutace genů kódujících enzymy úzce souvisejících s metabolismem Hcy. Z tohoto pohledu si zvláštní pozornosti zaslouží podsoubor matek a novorozenců s abnormální hodnotou hHcy u nichž ve spolupráci se specializovaným pracovištěm v nemocnici Na Homolce bude provedeno další detailní vyšetření včetně doplnění analýzy DNA, se zaměřením na mutaci genu pro MTHFR k identifikaci polymorfismu 677C-T, jehož přítomnost bývá spojena s rizikem IUGR a dalších těhotenských komplikací.

Závěr:

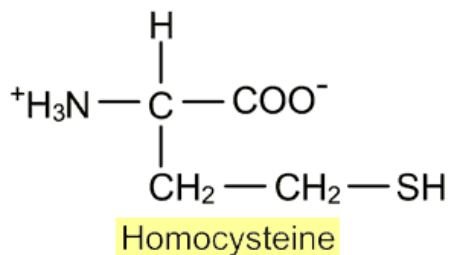
Komplexnost etiopatogeneze IUGR zatím nedovoluje na základě těchto dílčích výsledků potvrdit ani vyloučit jednoznačnou roli hHcy jako jednoho ze závažných rizikových faktorů placentární vaskulopatie, rozvoje placentárních infarktů a nutričního deficitu plodu. Prezentované výsledky však představují pouze vstupní dílčí data projektu, který bude pokračovat i v následujících letech.

Literární zdroje:

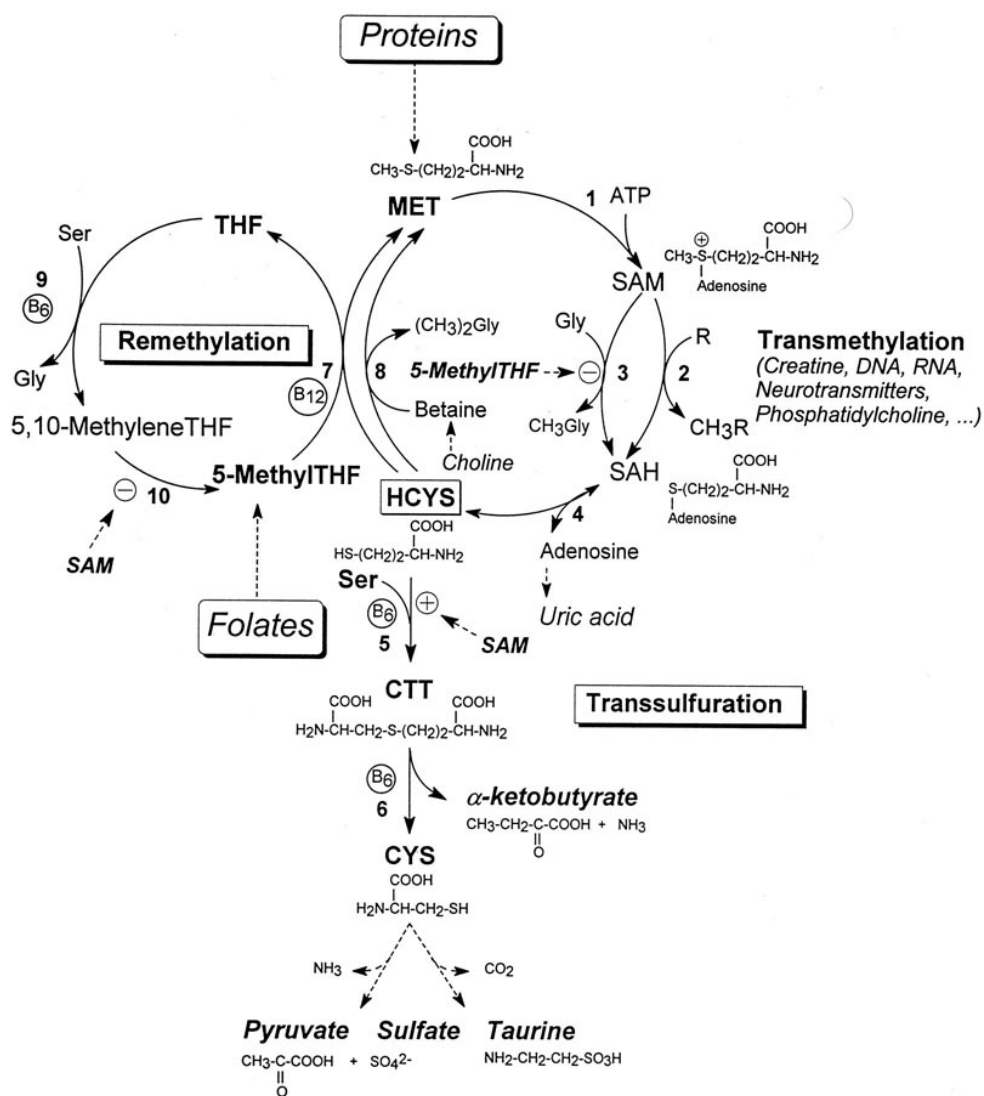
1. Claire Infante-Rivard et al., Unexpected Relationship between Plasma Homocysteine and Intrauterine Growth Restriction, *Clinical Chemistry* 49:9, 1476-1482, 2003
2. Hyánek J. et al., Homocysteinemie – její význam v gynekologii a porodnictví, *Česká Gynekologie* 65, , č.6, str.406-412, 2000
3. Walker MC et al., Changes in homocysteine levels during normal pregnancy, *American Journal of Obstetrics and Gynecology* , 180(3):660-664, March 1999
4. Hongsprabhasa P. et al., Plasma Homocysteine Concentrations of Preterm Infants, *Biology of the Neonate*,; 76: 65-71, 1999
5. Böhles H. et al., Maternal plasma homocystein, placenta status and docosahexaenoic acid concentration in erythrocyte phospholipids of the newborn, *European Journal of Pediatrics*, Volume 158, Number 3, 243-246, February 1999
6. Malinow M.R. et al., The relationship between maternal and neonatal umbilical plasma homocysteine suggest a potential role for maternal homocysteine in fetal metabolism, *American Journal of Obstetrics and Gynecology* , 178 (2): 228-233, 1998
7. Jean-Claude Minet et al., Assessment of vitamin B12, folat and vitamin B6 status and relation to sulfur acid metabolism in neonates, *American Journal of clinical Nutrition* , Vol 72, No 3, 751-757, 2000
8. Philippe Durand et al., Impaired Homocysteine Metabolism and Atherothrombotic Disease, *LABORATORY INVESTIGATION 2001 by the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.*, ,Vol.81, No.5.p.645, 2001

9. Žák A., Klinický význam hHcy, Sborník Aterosklerosa – Diagnostika, léčba a prevence, Česká Třebová 2001, H11-H19
10. Přistoupilová K., Přistoupil T.I., Heyrovský M., Homocystein-molekula těšící se rostoucí pozornosti, Chemické Listy, , Vol.93, 365-374, 1999
11. Kožich V., Kraus J.P., Hyánek J, Homocystein, geny a vitaminy: Souvislost s kardiovaskulárními onemocněními a komplikacemi těhotenství, DMEV - Diabetologie Metabolismus, Endokrinologie, Výživa, , ročník 2, číslo 3, 113-120, 1999
12. Hyánek J et al., Hyperhomocysteinemie – Rizikový faktor pro vznik cévních onemocnění nezávislý na hladinách lipidů, Časopis Lékařů Českých, 136, č.23, 720-723, 1997
13. Přistoupilová K., Přistoupil T.I., Homocystein a civilizační choroby: Jeho význam v metabolismu a v lékařské diagnostice, Vesmír 81, 624-626, listopad 2002
14. Milman N. et al., Cobalamin status during normal pregnancy and postpartum: a longitudinal study comprising 406 Danish women, European Journal of Haemathology, Vol 79, issue 6, page 521, June 2006
15. Elvira M. et al., Relationship between total homocysteine and folate levels in pregnant women and their newborn babies according to maternal serum levels of vitamin B12, BJOG, Vol 109, issue 7, page 784, July 2002
16. Lindblad B. et al., Folate, vitamin B12, and homocysteine levels in Soutj Asian women with growth retarded fetuses, Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica, Vol 84, issue 11, page 1055, November 2005
17. Obeid R. et al., Biochemical indexes of the B vitamins in cord serum are predicted by maternal B vitamin status, Am J Clin Nutr., 82 (1): 133-9, July 2005

Příloha č.1:



Obr. 1 Schéma molekuly Homocysteinu



Obr. 2 Schéma metabolismu homocysteinu¹

¹ <http://www.wiley.com>, staženo dne 1.11.2006

Příloha č.2

Tab. 2 Hodnoty homocysteinemie u žen²

Netěhotné preklimakt. ženy	9.7 ± 1.6*	Plodová voda	Fetální serum
Klimakterické ženy	11.8± 2.6		
Při hormonální antikoncepci	7.2 ± 2.0		
Fyziologické gravidity	4.4 ± 1.7		
Patologické gravidity (spont. Aborty, eklampsie, preeklampie, gestoza, Abrupce placenty (n=8) Hypotrofie plodu	6.3 ± 2.1 7.5 ± 1.7 4.5	2.5 ± 1.3	4.5 ± 1.6
Fyziologické šestinedělí	8.4 ± 2.1		
Plodová voda zdravých žen	4.1± 1.2		
Fetální serum rizikových gravidit (rozštěp neurální trubice..tj. encefalokéla, anencefalus, trizomie, dědičné metabol. Vady...)	3.6 ± 1.4		

* jednotky homocysteinemie μmol/l

² Hyánek J. et al., Homocysteinemie – její význam v gynekologii a porodnictví, Česká Gynekologie 65, , č.6, str.406-412, 2000

Příloha č.3



Obr. 3 Ukázka antropometrického měření novorozence



Obr. 4 Ukázka antropometrického měření novorozence

Příloha č.4

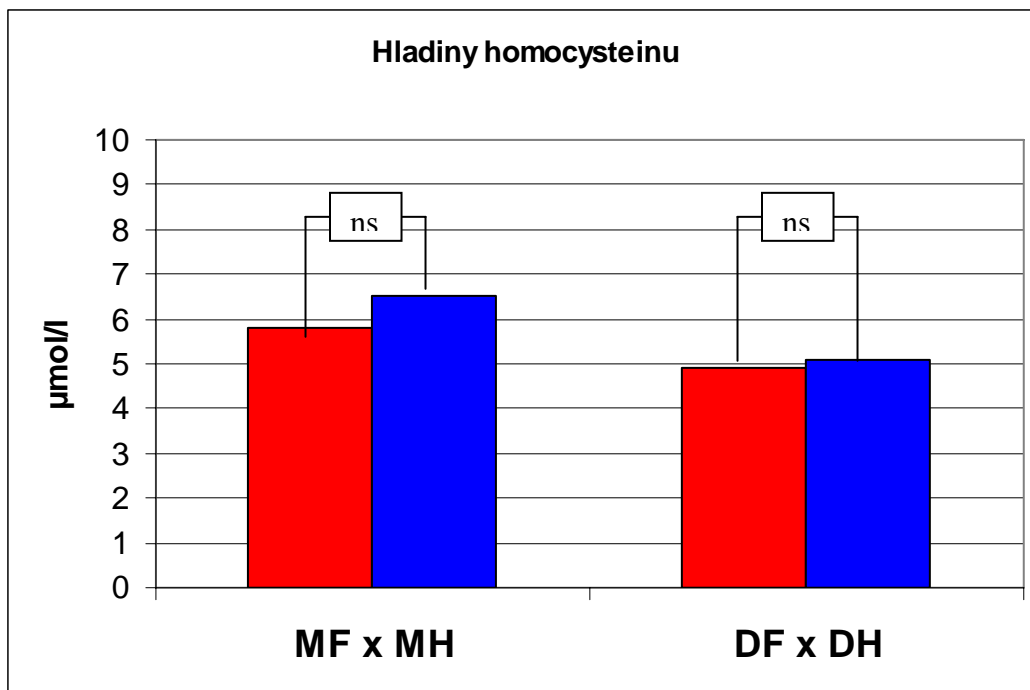


Obr. 5 Laboratorní technika biochemické laboratoře
v nemocnici Na Homolce

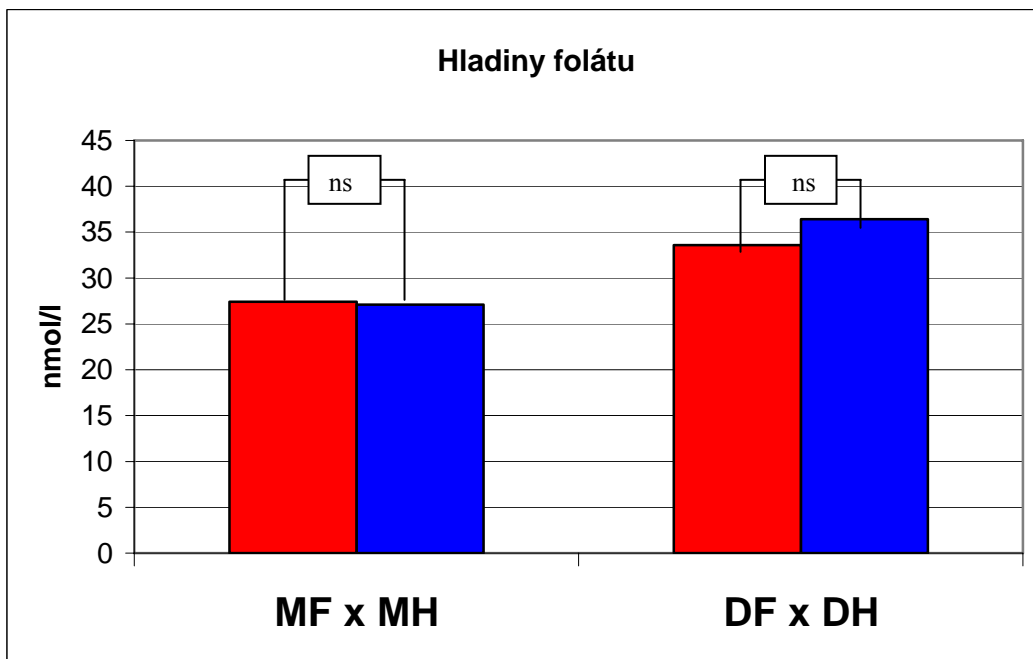


Obr. 6 Laboratorní technika biochemické laboratoře
v nemocnici Na Homolce

Příloha č.5

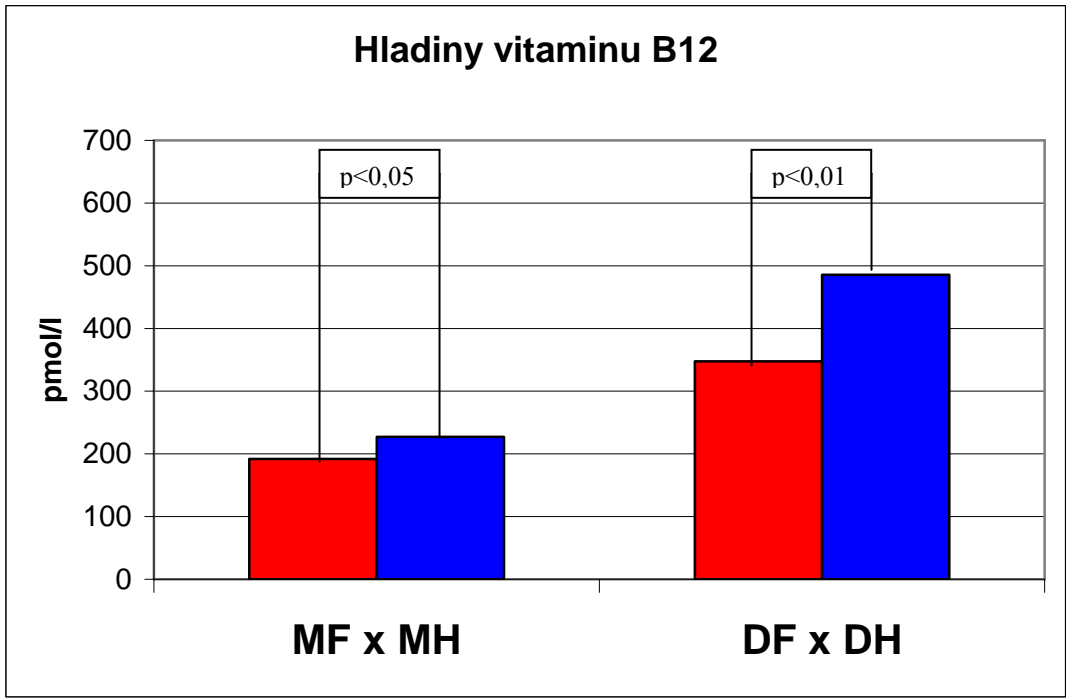


Graf 1 Srovnání plazmatických hladin homocysteinu³

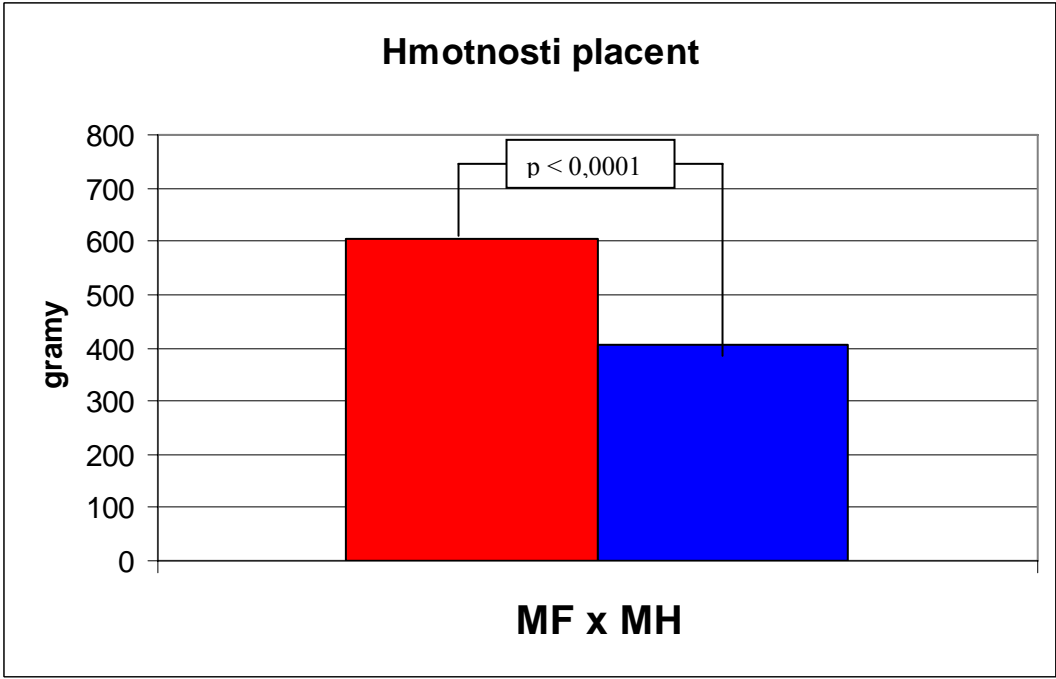


Graf 2 Srovnání hladin folátu

³ MF...matky fyziologických novorozenců DF...fyziologičtí novorozenci
MH...matky hypotrofických novorozenců DH...hypotrofičtí novorozenci



Graf 3 Srovnání plazmatických hladin vitamínu B12



Graf 4 Srovnání hmotností placent

Tab.3 Srovnání biochemických parametrů matek a fyziologických novorozenců⁴

Parametr	MF n = 37	NF n = 37	statistická významnost
Hcy	5,8 ± 2,6	4,9 ± 2,7	0,1%
Folát	27,4 ± 13,4	33,6 ± 11,9	0,1%
Vitamin B12	191,9 ± 74,6	347 ± 158,8	5%

Tab. 4 Srovnání biochemických parametrů matek a jejich novorozenců s IUGR

Parametr	MF n = 36	NF n = 36	statistická významnost
Hcy	6,5 ± 2,4	5,1 ± 2,0	1%
Folát	27,1 ± 12,7	36,4 ± 9,5	1%
Vitamin B12	227,0 ± 90,0	485,5 ± 254,0	1%

⁴ * Hcy jednotky $\mu\text{mol/l}$
** Folát jednotky nmol/l
*** Vitamin B12 jednotky pmol/l