

ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
РОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ГЕМАТОЛОГИИ И ТРАНСФУЗИОЛОГИИ ФЕДЕРАЛЬНОГО АГЕНТСТВА
ПО ВЫСОКОТЕХНОЛОГИЧНОЙ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ
(ФГУ «РосНИИГТ Росмедтехнологий»)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И
СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ
РАЗРЕШЕНИЕ НА ПРИМЕНЕНИЕ НОВОЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ
ФС № 2008/081 ОТ 13 МАЯ 2008 Г.

Клинико-лабораторная диагностика и лечение тромбофилии,
обусловленной гипергомоцистеинемией
(медицинская технология)

УДК 616.155.2: 616-071

К-49

Авторы: Шмелева В.М., Папаян Л.П., Салтыкова Н.Б., Каргин В.Д.,

Капустин С.И., Блинов М.Н., Гуржий А.А., Смирнова О.А., Головина О.Г.

Рецензенты:

Н.Н. Петрищев – проф., д.м.н., СПб. Медицинский Университет имени акад.

И.П. Павлова

И.Г. Дуткевич – проф., д.м.н., СПб. Медицинская Академия последипломно-
го образования

К-49 Клинико-лабораторная диагностика и лечение тромбофилии,
обусловленной гипергомоцистеинемией. Медицинская технология. – СПб. –
Типография «СПб МАПО». – 34 с.

Гипергомоцистеинемия (ГГЦ) является частым, независимым и значимым предиктором тромбообразования. Гипергомоцистеинемия достоверно повышает риск развития тромбозов, как в артериальном, так и в венозном русле. При отсутствии патогенетической терапии в 4,7 раза увеличен риск повторного тромбообразования. Для больных с ГГЦ характерно формирование выраженного гиперкоагуляционного синдрома с одновременным угнетением активности естественных антикоагулянтов.

В медицинской технологии представлен алгоритм диагностики тромбофилии, ассоциированной с гипергомоцистеинемией, и методы коррекции ГГЦ. Доказана эффективность применения фолиевой кислоты и витаминов В₆ и В₁₂. Показано, что интенсивность и продолжительность терапии определяются генотипом пациента, исходным уровнем гомоцистеина, наличием сопутствующих факторов риска.

Данная медицинская технология адресована следующим специалистам: врачам-лаборантам, хирургам и может быть использована во всех медицинских учреждениях Российской Федерации, где проходят обследование и лечение пациенты с тромботическими заболеваниями.

Организация-разработчик: Федеральное государственное учреждение
РОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГЕМАТОЛОГИИ И
ТРАНСФУЗИОЛОГИИ ФЕДЕРАЛЬНОГО АГЕНТСТВА ПО
ВЫСОКОТЕХНОЛОГИЧНОЙ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ

191024, Санкт-Петербург, ул.2-я Советская, 16

Используемые сокращения.

ГГЦ – гипергомоцистеинемия

ГЦ – гомоцистеин

ЦБС – цистатионин- β -синтаза

МТГФР – метилентетрагидрофолат редуктаза

ВТ – венозные тромбозы

АТ – артериальные тромбозы

АВТ – артериальные и венозные тромбозы в анамнезе

ТЭЛА – тромбоэмболия легочной артерии

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ИФА – иммуноферментный анализ

МНТ – метиониновый нагрузочный тест

Введение

Тромбозы и их осложнения являются в настоящее время основной причиной смертности и инвалидизации населения в цивилизованных странах, что свидетельствует о необходимости дальнейшего улучшения диагностики и лечения тромботических заболеваний. Современная концепция развития тромбоза тесно связана с понятием тромбофилия. Последнее десятилетие отмечено значительным ростом числа исследований, посвященных гипергомоцистеинемии (ГГЦ) как одной из причин, обуславливающих развитие тромбофилии. Накоплен фактический материал, убедительно доказывающий, что ГГЦ является существенным и независимым фактором риска не только атеросклеротического поражения коронарных, мозговых и периферических сосудов, но также развития артериальных и венозных тромбозов [1].

Гомоцистеин (ГЦ) – серосодержащая аминокислота, образующаяся в ходе обмена метионина. Его концентрация в плазме зависит от двух реакций метаболизма, включающих деметилирование гомоцистеина с образованием цистеина и реметилирование до метионина. Ключевыми ферментами в этих процессах являются цистатионин- β -синтетаза (ЦБС) и метилентетрагидрофолат редуктаза (МТГФР) соответственно. Витамин В₆ выступает в роли кофактора при деметилировании гомоцистеина, а витамины В₁₂ и фолат являются кофакторами в процессе реметилирования [2].

Основной причиной ГГЦ является снижение активности ферментов, обеспечивающих метаболизм ГЦ, в результате генетических нарушений и/или снижения уровня витаминов-кофакторов. В большинстве случаев повышение уровня ГЦ является следствием суммации ряда факторов. Особенности питания и образа жизни, заболевания, сопровождающиеся повышением потребления или нарушением всасывания витаминов группы В, использование некоторых лекарственных препаратов доминируют как причины легкой ГГЦ. Причинами умеренной ГГЦ часто являются дефицит фолата в сочетании с С677Т полиморфизмом гена МТГФР, а также дефицит кобаламина и почечная недостаточность. К тяжелой ГГЦ чаще всего приводит выраженный дефицит фолата в сочетании с ТТ генотипом гена МТГФР или гомозиготный дефект ЦБС [3].

ГЦ содержит свободную сульфгидрильную группу и легко окисляется в присутствии электронного акцептора с формированием дисульфидов и активных кислородных радикалов. У здоровых людей менее 1% общего ГЦ плазмы находится в виде восстановленного, свободного гомоцистеина, примерно по 15% приходится на гомоцистин и смешанные дисульфиды. Более 70% ГЦ в циркуляции связано с белком посредством дисульфидных мостиков. Под термином «гомоцистеин» подразумевается суммарное содержание в плазме всех рассмотренных форм, т.е. общий гомоцистеин плазмы. Точность и чувствительность определения уровня ГЦ, требуемая в клинических исследованиях, была впервые достигнута в середине 1980-х годов внедрением определения общего ГЦ плазмы после добавления восстанавливающего агента и освобождения ГЦ от связей с белками. В применяемых как в России, так и за рубежом методах восстановление ГЦ является необходимым условием, предшествующим выделению и детекции [4].

Нарушения в процессе реметилирования (вследствие недостаточности фолата, или витамина В₁₂, или дефекта в гене МТГФР) диагностируются по повышению базального уровня ГЦ плазмы. Нарушения в процессе деметилирования, вследствие гетерозиготного дефекта в гене ЦБС или недостатка витамина В₆, идентифицируется по аномальному повышению уровня ГЦ плазмы в метиониновом нагрузочном тесте (МНТ). По данным ряда зарубежных авторов, использование МНТ существенно улучшает диагностику тромбофилии, ассоциированной с ГГЦ, позволяя выявить дополнительно до 40% больных с нарушениями обмена ГЦ. Трудоемкость и продолжительность МНТ (4-х кратное определение уровня ГЦ в течение суток) не позволяли внедрить его в широкую клиническую практику. Попытки оптимизировать МНТ (например, определение уровня ГЦ только через 2 часа после нагрузки метионином) не имели успеха в силу невысокой чувствительности укороченного теста [5]. Нами предлагается модификация МНТ, позволяющая эффективно выявлять скрытую ГГЦ по двум точкам (через 4 и 24 часа после приема метионина).

Показания к использованию новой медицинской технологии.

Применение данной медицинской технологии показано для:

- **лиц с тромбозами (артериальными и/или венозными), особенно моложе 50 лет**
- **лиц с повторными тромбозами**
- **лиц с тромботическим семейным анамнезом**
- **женщин, планирующих беременность, в особенности - женщин с отягощенным акушерским анамнезом**
- **лиц с атеросклеротическими поражениями сосудов**
- **пациентов на гемодиализе**
- **пациентов с метаболическим синдромом**
- **пациентов после резекции желудка и 12-перстной кишки**
- **пациентов с дефицитом витамина В₁₂**

Выше перечислены абсолютные показания к определению уровня ГЦ. Относительные показания к определению уровня ГЦ смотри в приложении 1.

Противопоказаний к применению данной технологии нет.

Материально-техническое обеспечение новой медицинской технологии.

Оборудование.

Дозаторы пипеточные ДПАОП-2-20, ДПАОП-20-200, ДПАОП-100-1000, ДПАМП-50-300 производства ЗАО «Ленпипет», г. Санкт-Петербург, рег.№ 24107-02.

Центрифуга Labofuge 400R (производства фирмы Thermo Electron LED GmbH, Германия) Рег.№ ФС № 2006/1217.

Жидкостный хроматограф производства фирмы Shimadzu, Япония. Сертификат об утверждении типа средств измерений Государственного комитета Российской Федерации по стандартам и метрологии № 21450.

Ридер медицинский микропланшетный Sunrise, производства фирмы
TECAN Austria GmbH, Австрия, рег.№ 2003/829.

Промыватель медицинский микропланшетный, Columbus производства
фирмы TECAN Austria GmbH, Австрия, рег.№ 2–3/802.

Реагенты.

1. Химические реактивы для высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Ацетонитрил, ОСЧ-1, производства Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Германия

Нитрат аммония, 99,5%, производства Fluka Chemie, GmbH, Германия

Формиат аммония, 98%, производства Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Германия

Муравьиная кислота, 98 – 100%, производства Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Германия

Борогидрид натрия, производства Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Германия

Гидроксид натрия, производства Fluka Chemie, GmbH, Германия

Диметилсульфоксид (минимум 99%), производства Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Германия

ЭДТА (динатриевая соль), Biotechnology grade, производства Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Германия

1-октанол, производства Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Германия

Соляная кислота, производства Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Германия

Этилморфолин (минимум 99%), производства Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Германия

Монобромбиман, производства Fluka Chemie, GmbH, Германия

Ледяная уксусная кислота, производства Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Германия

Бидистиллированная вода

Муравьиная кислота, 98-100%, производства Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Германия

- L – гомоцистеин, производства Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Германия
2. Набор иммуноферментный для определения уровня гомоцистеина, производства Axis Shield Diagnostics Ltd., Великобритания, рег.№ 2005/387.
 3. Контроль качества производства Axis Shield Diagnostics Ltd., Великобритания, рег.№ 2005/387.
 4. Контроль качества «Liquichek», производства Bio-Rad Laboratories, United States, рег.№ ФФ2005/42.
 5. Метионин 0,25 г, производства ООО «Озон», Россия, рег. № ЛС-001630

Лекарственные препараты.

«Ангиовит» (фолиевая кислота - 5 мг, 4 мг витамина В₆ и 6 мкг витамина В₁₂), производства ЗАО «Алтайвитамины», Россия, рег. № 033699/01.

Нейромультивит (витамин В₁ -100 мг, витамин В₆ - 200 мг, витамин В₁₂ - 200 мкг), производства Lannacher Heilmittel, Австрия, рег. № 009017

Пентовит (пиридоксин - 5 мг, никотинамид - 20 мг, фолиевая кислота - 400 мкг, цианокобаламин - 50мкг), Россия, рег. № 69/612/9

Описание новой медицинской технологии.

1. Клинико-anamnestические данные, заставляющие предположить наличие тромбофилии на фоне ГГЦ:

Наличие в анамнезе артериальных и/или венозных тромбозов.

Рецидивирование тромботического процесса, несмотря на проводимую стандартную противотромботическую терапию.

Особенности физиологической адаптации системы гемостаза к беременности (прокоагулянтные изменения), а также повышенное потребление фолата плодом, могут привести к манифестации тромбофилии, вызванной ГГЦ, во время беременности. ГГЦ достоверно увеличивает риск развития венозных тромбозов, как во время беременности, так и в послеродовом периоде. Про-

тромботические эффекты ГЦ могут вести к микротромбообразованию и развитию акушерских осложнений, связанных с изменением фетоплацентарного кровообращения (невынашивание беременности, отслойка плаценты, гестоз).

При опросе пациента и анализе имеющейся медицинской документации необходимо помнить о детерминантах уровня ГЦ и учитывать, что целый ряд заболеваний, а также многие лекарственные препараты, используемые в клинической практике, могут приводить к клиническому или субклиническому дефициту витамина В₁₂ и/или фолата и, следовательно, ГЦ (приложение 2).

2. Заготовка крови.

Материалом для исследования служит венозная кровь. Кровь стабилизируют 2,5% раствором ЭДТА (в соотношении 9:1). Кровь центрифугируют 5 минут при 2000g и до проведения исследования плазма хранится в пластиковых пробирках типа «Эппендорф» при -20⁰С.

3. Методики определения уровня ГЦ.

Измерение гомоцистеина в плазме методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с флуоресцентной детекцией.

1. Принцип метода:

ВЭЖХ – это жидкостная хроматография на колонке под высоким давлением (ЖХВД). ЖХВД позволяет с высокой точностью определять содержание аминокислот.

Высокое давление при подаче элюента дает существенное преимущество в скорости и качестве фракционирования микроколичеств исходного вещества. Используется градиентная элюция в обращенной фазе. Элюирующий раствор обладает меньшим сродством к сорбенту, чем любой из компонентов вносимой на колонку смеси веществ. Эти компоненты постепенно «вымываются» из неподвижной фазы и движутся вдоль колонки за счет непрерывного перераспределения их молекул между неподвижной фазой и элюентом. Каждый из них мигрирует независимо от других в соответствии с

соотношением сил его сродства к неподвижной и подвижной фазам. Миграция идет тем медленнее, чем больше сродство к неподвижной фазе. Компоненты смеси выходят из колонки отдельными, разделенными друг от друга зонами, так называемыми хроматографическими пиками.

Для восстановления и предотвращения реокисления ГЦ используется последовательная цепь химических реакций. В качестве флуоресцентной метки используется монобромбиман, способный быстро реагировать с тиоловыми группами с образованием высокофлуоресцентных продуктов [6].
Материал химически и фотолитически стабилен.

Приготовление раствора для построения калибровочной кривой

Раствор гомоцистеина 50 мкМ, М 268,3

Требуется точно взвесить 0,0067 г гомоцистеина и в мерной колбе на 500 мл довести до метки бидистиллированной водой.

2. Приготовление рабочих растворов

4М боргидрид натрия с 0,066М гидроксидом натрия и 333мл/л диметилсульфоксидом.

- 4М боргидрид натрия, М=37,83 Масса 75,66г
- 0,066М гидроксид натрия, М=40 Масса 1.32г
- 333 мл/л диметилсульфоксид, 166,5 мл в 500 мл

Добавить реагенты в мерную колбу на 500 мл и довести до метки бидистиллированной водой.

2 мМ ЭДТА, М=406,53

Взвесить 0,0813 г ЭДТА, в мерной колбе на 100 мл довести до метки бидистиллированной водой.

1,8 М соляная кислота

Удельный вес основного раствора (1,18 г/мл, 37%) составляет 436,6 г/л. М-36,46

В мерной колбе на 10 мл добавляют к 8 мл воды 1,5 мл основного раствора и доводят до метки бидистиллированной водой.

Этилморфолиновый буфер, М=115,2

17,28 г помещают в мерную колбу на 100 мл, доводят до метки бидистиллированной водой.

Монобромбиман, $M=271,1$

К 0,0068 г добавить 1 мл ацетонитрила.

Мобильная фаза ВЭЖХ

Буфер А

Буфер содержит нитрат аммония (30 мМ), формиат аммония (40 мМ), рН 3,65

На 1 литр буфера:

2,4012 г нитрата аммония ($M=80,04$)

2,5224 г формиата аммония ($M=63,06$)

В колбе на 1 литр растворить компоненты приблизительно в 900 мл бидистиллированной воды, используя муравьиную кислоту, довести при помешивании рН буфера до 3,65 и довести объем до 1 литра.

Органический буфер

Ацетонитрил (может быть использован прямо из поставляемых контейнеров).

Приготовление калибровочных стандартов

Основной раствор 50 мкмоль/л

Все стандарты приготавливаются в мерных колбах на 10 мкл и хранятся при температуре $+4^{\circ}\text{C}$

	Концентрация, мкмоль/л	Объем основного раствора, мл
Стандарт 1	2,5	0,5
Стандарт 2	5,0	1,0
Стандарт 3	10,0	2,0
Стандарт 4	25,0	5,0

4. Подготовка пробы.

к 30 мкл плазмы последовательно добавляется:

- 30 мкл 4 М р-ра NaBH_4 в 0.66 М р-ра Na OH и 33,3 % диметилсульфоксида,
- 10 мкл 1- октанола
- 20 мкл 1,8 М р-ра HCl , пробы оставляют на 3 минуты
- 100 мкл 1,5 М р-ра этилморфолинового буфера,
- 400 мкл бидистиллированной воды
- 20 мкл 0,025 М р-ра монобромбимана

Подготовка пробы завершается через 3 минуты добавлением 40 мкл ледяной уксусной кислоты.

5. Проведение анализа.

20 мкл пробы наносится на аналитическую колонку 5 μ C18(2)150x4.6 mm, используя аутосамплер, который осуществляет последовательный автоматический ввод проб на колонку. Колонка предварительно уравнивается буфером (30 mM нитрата аммония и 40 mM аммония формиата, pH – 3,65), содержащим 7% ацетонитрила. Гомоцистеин элюирует с колонки при линейном градиенте ацетонитрила (от 7% до 11%) в том же буфере. Хроматография проводится при комнатной температуре со скоростью тока 1.0 мл/мин. Детекция проб осуществляется на флуоресцентном спектрофотометре. Хроматографический пик гомоцистеина регистрируется на 11-й мин. Содержание гомоцистеина рассчитывается по калибровочной кривой. Линейность сохраняется в пределах измерений от 0 до 65 мкмоль/л.

Контроль качества осуществляется регулярно с использованием аттестованных коммерческих контрольных материалов.

Интерпретация полученных результатов.

При трактовке результатов анализов следует обязательно учитывать, что нормальные значения ГЦ существенно зависят от возраста и пола [7]. Если в детстве уровень ГЦ составляет примерно 5 мкмоль/л, то в течение жизни его концентрация постепенно повышается, причем у женщин репродуктивного возраста в среднем на 20% меньше, чем у мужчин. Отдельную группу

составляют беременные женщины, концентрация ГЦ у которых ниже, чем у небеременных женщин и составляет в среднем 5,6 мкмоль/л в первом триместре, 4,3 мкмоль/л во втором триместре, и 3,3 мкмоль/л – в третьем.

Пределы нормальных колебаний ГЦ плазмы.

Нижняя граница пределов нормальных колебаний колеблется от 3,5 до 5 мкмоль/л и не представляет интереса ни для научных, ни для практических целей. Верхней границей пределов нормальных колебаний большинство авторов в 90-х гг. считало концентрацию ГЦ 15 мкмоль/л [1-7]. Позже было показано, что риск развития сосудистой патологии при ГГЦ зависит от степени тяжести повышения ГЦ и отмечается уже при значениях выше 10 мкмоль/л [8].

Распределение уровней ГЦ в популяциях носит асимметричный характер. В связи с этим для определения верхней границы нормальных колебаний уровня ГЦ зарубежные авторы чаще всего используют 95 % перцентиль, полученный при исследовании подобранной по полу и возрасту контрольной группы. Однако в ряде крупных многоцентровых используют 90% или даже 80% перцентиль, что приводит к вариабельности верхней границы нормы для ГЦ [4]. Различия в пределах нормальных колебаний объясняются также использованием различных методик и выбором контрольной группы, а именно количеством фолата в рационе обследуемых. Достаточное количество фолата делает распределение уровней ГЦ более симметричным. На основе обследования 235 здоровых лиц до и после обогащения рациона фолиевой кислотой рассчитан оптимальный интервал ГЦ для разных возрастных категорий (приложение 3) [9].

На основании изучения контрольной группы в нашей лаборатории пределами нормальных колебаний считается уровень ГЦ от 4,5 до 13,5 мкмоль/л (среднее \pm 2 стандартных отклонения).

По степени повышения уровня ГЦ в плазме ГГЦ условно делят на легкую - до 20 мкмоль/л; умеренную - 20 - 70 мкмоль/л и тяжелую - более 70 мкмоль/л [10].

Диагностика скрытой ГГЦ.

Для выявления скрытой ГГЦ используется нагрузочный тест с метионином. Тест проводится только у больных с нормальным базальным уровнем ГЦ. Кровь берут через 4 и 24 часа после приема per os метионина (из расчета 100 мг/ кг массы тела). Предел допустимых колебаний постнагрузочного уровня ГЦ в исследуемых точках рассчитан как среднее значение уровня ГЦ после нагрузки метионином в контрольной группе плюс два стандартных отклонения ($M+2SD$) и составляет 30,3 мкмоль/л через 4 часа и 20,4 мкмоль/л через 24 часа.

Иммуноферментный метод определения уровня гомоцистеина (с использованием тест системы производства Axis Shield Diagnostics Ltd).

Принцип метода.

Смесь дисульфидов и белок-связанной формы ГЦ восстанавливаются до свободного ГЦ при использовании дитиотреола. ГЦ далее превращается в S-аденозил-L-гомоцистеин (SAH) с использованием SAH-гидролазы в присутствии избытка аденозина. Следующий этап – твердофазный иммуноферментный анализ – основан на конкуренции между SAH в образце и SAH, иммобилизованными в ячейках планшета, за сайты связывания с моноклональными анти-SAH антителами. После удаления антител, не связавшихся с планшетом, добавляются вторые антитела, меченные пероксидазой. Активность пероксидазы измеряется на спектрофотометре после добавления субстрата. Полученная абсорбция обратно пропорциональна концентрации общего ГЦ в пробе.

Все необходимые реагенты содержатся в диагностическом наборе. Набор снабжен подробной инструкцией для проведения исследования. Отдельно поставляются коммерческие контроли ГЦ (три уровня – низкий, средний и высокий).

Нами проведена сравнительная оценка описанного метода ВЭЖХ и иммуноферментного метода определения ГЦ (с использованием наборов

фирмы AXIS-SHIELD, UK). Корреляция между методами была достаточно высокой ($r=0,89$, $n=120$, $p<0,001$). Отмечена тенденция к более низким показателям на ИФА, особенно при концентрациях ГЦ >20 мкмоль/л. В среднем разница между двумя методами составляла 2,0 – 4,5 мкмоль/л в зависимости от уровня ГЦ.

Воспроизводимость.

Коэффициент вариации (CV%) результатов измерения одной и той же пробы методом ВЭЖХ (серия из 8 определений) в течение одного дня составил 2,1, в разные дни - 2,4. Чувствительность метода - 0,5 мкмоль/л.

Коэффициент вариации для ИФА составил 4,3 и 5% (в течение одного дня и в разные дни, соответственно). Чувствительность метода - 1,0 мкмоль/л.

Оба метода могут эффективно использоваться в клинической практике для диагностики ГЦ. Выбор метода определяется наличием соответствующей материально-технической базы и обученного персонала, а также количеством проводимых исследований. ВЭЖХ является аналитическим референтным методом определения уровня ГЦ. ВЭЖХ позволяет выполнять исследование *sito*, работать с любым количеством проб и определять с высокой точностью значения ГЦ от 0,5 до 200 мкмоль/л. Кроме того, себестоимость анализа при ВЭЖХ ниже, чем при ИФА. К достоинствам иммуноферментного метода можно отнести доступность для широкого применения и высокую производительность. Данный метод использует стандартное оборудование для иммуноферментных анализов. Включая контроль (3 уровня) и калибраторы в дублях, 80 образцов могут быть проанализированы в течение 3,5 часов. ИФА в большинстве случаев демонстрирует хорошую воспроизводимость и корреляцию с референтным методом ВЭЖХ. В то же время оптимальный вариант использования коммерческого набора подразумевает одномоментное исследование 80 проб, т.е. необходимость накопления материала. Кроме того, значения ГЦ выше 50 мкмоль/л иммуноферментный метод позволяет определять только в разведениях (т.е. требует повторного анализа),

что затрудняет его применение для контроля эффективности лечения тяжелых форм тромбофилии и при проведении МНТ.

Возможные осложнения и способы их устранения.

Ортостатические реакции могут влиять на результаты анализа. Показано, что через 30 минут в положении лежа уровень ГЦ снижается на 19-30% (2,1-3,5 мкмоль/л). Забор крови следует осуществлять в положении сидя. Для определения базального уровня ГЦ рекомендуется воздержаться от богатой метионином пищи за 8-12 часов до забора крови.

Кровь должна быть отцентрифугирована не позднее чем через 30 минут после забора во избежание повышения показателей за счет выделения ГЦ из форменных элементов.

Обязателен учет величины плеча используемой центрифуги и количества оборотов для расчета кратности ускорения – g.

Контроль температурного режима хранения проб и реагентов должен осуществляться постоянно. Плазма может храниться не более двух дней при комнатной температуре, 4 дня – при 4⁰С и больше года при -20⁰С.

Для получения правильных результатов необходимо точно соблюдать правила подготовки пробы. Крайне важно соблюдение временных интервалов и температурных режимов, указанных в описании методов.

Обязательным условием является регулярное использование контролей качества.

Контроль эффективности проводимой терапии рекомендуется осуществлять с использованием того же метода определения уровня ГЦ, который использовался при первичной диагностике.

Алгоритм выявления ГГЦ



Лечение гипергомоцистемии.

Особое внимание к тромбофилии, ассоциированной с ГГЦ, во многом объясняется возможностью эффективно снижать уровень ГЦ в плазме путем назначения доступных, недорогих и безопасных витаминных препаратов. Фолиевая кислота и В₁₂ ускоряют утилизацию ГЦ по пути реметилирования, а активная форма пиридоксина – пиридоксаль-фосфат повышает утилизацию ГЦ по пути деметилирования.

Поскольку рекомендации зарубежных и отечественных авторов по длительности приема и дозировкам фолиевой кислоты и витаминов В₆ и В₁₂ достаточно противоречивы, представляется целесообразным обобщить результаты собственного опыта, полученного в рамках проспективного трехлетнего наблюдения за 175 пациентами с ГГЦ. Важно отметить следующее:

1) Достоверное увеличение риска артериальных и венозных тромбозов отмечается уже при уровне ГЦ выше 10 мкмоль/л, т.е. формально в пределах так называемых нормальных значений. Снижение уровня ГЦ при значениях > 10 мкмоль/л обязательно при вторичной профилактике тромбообразования в группах высокого риска, таких как гипертоники, курильщики, пациенты с нарушениями углеводного обмена, наличием протромботических мутаций. При уровне ГЦ выше 10 мкмоль/л в указанных группах рекомендуется суточный прием 0,2-0,8 мг фолиевой кислоты, 3-30 мкг В₁₂ (лицам старше 60 лет 100 мкг) и 2-6 мг В₆. Если через 4-6 недель уровень ГЦ не снижается, то используют более высокие дозировки витаминов: 1-5 мг фолиевой кислоты, 100-600 мкг В₁₂ и 6-25 мг В₆.

2) Основным звеном витаминотерапии следует считать фолиевую кислоту, которая в ряде случаев может использоваться в качестве монотерапии. Монотерапия фолиевой кислотой оправдана в том случае, когда тщательно собранный анамнез и проведенные анализы позволяют полностью исключить не только клинический, но и субклинический дефицит других витаминов группы В, либо при наличии у пациента аллергических реакций на витамин В₆ и/или В₁₂.

3) Фолиевая кислота при назначении в дозах от 1 до 5 мг/день курсом не менее 3-х недель снижает исходный уровень ГЦ в среднем на 25%, при этом высокие дозы (> 3 мг/день) более эффективны у пациентов с начальным уровнем выше 15 мкмоль/л и/или сопутствующими индукторами ГГЦ (заболевания, приводящие к нарушению всасывания или повышенному расходу витаминов группы В, прием лекарственных препаратов, нарушающих метаболизм вводимых витаминов, наличие вредных привычек). Малые дозы (0,8-1 мг/день) достаточно эффективны при исходных значениях ГЦ < 15

мкмоль/л, здоровом образе жизни, сбалансированном питании, отсутствии индукторов ГГЦ.

4) Лицам с ТТ генотипом гена МТГФР показаны пролонгированные курсы терапии фолиевой кислотой и более высокие дозировки препарата как лечебные, так и поддерживающие.

5) Добавление к фолиевой кислоте кобаламина (в среднем по 0,5 мг/день) дает статистически значимое дополнительное снижение цифр ГЦ (в среднем на 7 %). Дополнительный прием кобаламина имеет особое значение для лиц старшей возрастной категории, подверженных В₁₂ дефициту.

6) Использование витамина В₆ обязательно для устранения ГГЦ, выявляемой после метиониновой нагрузки (т.е. когда ГГЦ вызвана генетическим дефектом фермента цистатионин-синтазы и/или дефицитом его кофактора – витамина В₆).

7) Для достижения оптимальных результатов рекомендуются комбинированные препараты, содержащие фолиевую кислоту, витамины В₆ и В₁₂ в лечебных дозировках (1-5 мг фолиевой кислоты, 100-600 мкг В₁₂ и 6-25 мг В₆).

8) В процессе лечения показан контроль уровня ГЦ, а также показателей гемостаза.

Эффективность использования новой медицинской технологии.

В ходе данной работы было обследовано 2050 больных в возрасте от 17 до 75 лет с артериальными и/или венозными тромбозами в анамнезе (1010 пациентов с тромбооблитерирующими заболеваниями артерий и 1040 пациентов с глубокими венозными тромбозами, посттромботической болезнью и/или ТЭЛА) и контрольная группа, в которую вошли 200 человек в возрасте от 16 до 70 лет без тромботических проявлений.

ГГЦ в контрольной группе отмечена в 5 % случаев. У больных с артериальными тромбозами ГГЦ выявлена в 56% случаев. При венозных тромбозах частота встречаемости ГГЦ составила 49 %. У больных с наличием в анамнезе тромбозов и в артериальном, и в венозном русле ГГЦ отмечалась в 68% случаев. Частота встречаемости легкой и тяжелой ГГЦ при артериальных и венозных тромбозах составляет 31% и 2% соответственно. В то же

время для артериальных тромбозов характерен более высокий процент встречаемости умеренной ГГЦ (17% против 8%).

Частота встречаемости данной формы тромбофилии при венозных тромбозах в 2 раза выше, чем мутации фактора V Leiden и в 10 раз выше, чем мутации в гене протромбина. ГГЦ в 14 раз увеличивает риск идиопатического тромбоза.

Средний уровень ГЦ в группе больных с ретромбозами был статистически значимо выше, чем у больных с первым эпизодом тромбоза ($20,97 \pm 2,78$ мкмоль/л против $14,18 \pm 1,01$ мкмоль/л, $p < 0.001$). Для ответа на вопрос, в какой степени ГГЦ увеличивает риск рецидивирования тромбоза, мы сравнили частоту встречаемости ретромбозов среди больных с нормальным и с повышенным уровнем ГЦ. Повторные эпизоды тромбозов (артериальных и/или венозных) у больных с повышенным уровнем ГЦ в плазме отмечались в 58% наблюдений, в то время как среди больных без ГГЦ ретромбозы были в 23 % наблюдений (OR = 4,7; 95% CI: 1,81-12,37). Таким образом, риск развития повторного тромбоза у лиц с ГГЦ в 4,7 раз выше, чем у лиц с нормальным уровнем ГЦ.

Проведение МНТ позволило существенно улучшить диагностику тромбофилии, ассоциированной с ГГЦ. Так, среди обследованных больных с облитерирующим атеросклерозом сосудов нижних конечностей использование МНТ позволило выявить дополнительно 19% пациентов с ГГЦ. Общая частота встречаемости ГГЦ составила 72% (53% - явная ГГЦ и 19% - скрытая ГГЦ). Представляется особенно важным отметить, что очень высоким процент патологических результатов теста с метиониновой нагрузкой был в группе больных с тяжелым течением заболевания (80% у пациентов с ампутацией конечности против 30% в группе без ампутации). Последнее подтверждает роль не только явной, но и скрытой ГГЦ в индукции тромботических осложнений и ухудшении клинического прогноза течения заболевания.

Для тромбооблитерирующих заболеваний артерий статистически достоверное увеличение риска развития тромбоза по нашим данным отмечается уже при уровне ГЦ выше 11,6 мкмоль/л - RR=2,5 (95% CI: 1,6-3,7) $p < 0,0001$, а при ГГЦ >16,2 мкмоль/л увеличивается - RR=3,4 (95% CI: 2,3-5,06) $p < 0,0001$.

При венозных тромбозах риск, привносимый ГГЦ, становится статистически значимым при уровне >11 мкмоль/л - RR=1,8 (95% CI: 1,2-2,6)

$p=0,0009$, а при цифрах $>13,4$ относительный риск увеличивается до $RR=3,1$ (295% CI:12-4,51) $p<0,0001$.

Роль молекулярно-генетических исследований в диагностике тромбофилии, ассоциированной с ГГЦ.

Самой распространенной в популяции генетической предпосылкой ГГЦ является полиморфизм С677Т в гене МТГФР [10, 11]. Обследование пациентов с подозрением на тромбофилию включает молекулярно-генетическое исследование наиболее значимых маркеров наследственной тромбофилии, в том числе и гена МТГФР. По нашим данным, совпадающим с литературными источниками, частота встречаемости наследственных и приобретенных форм ГГЦ сопоставимы. Из всех случаев ГГЦ СС генотип выявлен у 35%, ТТ генотип - у 18%, СТ – в 47% случаев. Среди диагностированной ГГЦ у пациентов с облитерирующим атеросклерозом сосудов нижних конечностей на долю носителей ТТ генотипа гена МТГФР приходится всего 8%, 52% составляют гетерозиготные носители Т аллеля, и 40 % - носители СС генотипа гена МТГФР. Из сказанного следует, что молекулярно-генетическое обследование не может заменить определение уровня ГЦ при диагностике данной формы тромбофилии.

В тоже время генотипирование способствует формированию групп высокого риска развития ГГЦ, поскольку ТТ генотип гена МТГФР предрасполагает к повышенному уровню ГЦ, особенно при недостаточном содержании в организме фолата, а также в сочетании с такими факторами риска, как курение и высокое потребление кофе. Так, у обследованных нами больных с ТТ генотипом средний уровень ГЦ составил 42,1 мкмоль/л при сочетании с привычно высоким потреблением кофе и курением, 21,0 мкмоль/л – в сочетании с одним из этих факторов против 12,1 мкмоль/л при отсутствии этих факторов.

Состояние системы гемостаза у пациентов с ГГЦ.

Скрининговые показатели коагулограммы (АПТВ, протромбиновый тест, тромбиновое время, уровень фибриногена) не информативны для диагностики данной формы тромбофилии. В наших исследованиях практически у

всех больных вне зависимости от уровня ГЦ они были в пределах нормальных колебаний. Общим для всех групп больных было достоверное увеличение по сравнению с нормой активности фактора VIII, активности и содержания фактора Виллебранда, а также суммы активных форм тромбоцитов и числа тромбоцитов в агрегатах. При этом у всех пациентов с ГЦ наблюдалась отчетливая тенденция к большей выраженности прокоагулянтных нарушений, которые в группе смешанных тромбозов достигали статистической значимости по таким показателям как активность фактора VIII, активность и содержание фактора Виллебранда, а также показателей внутрисосудистой активации тромбоцитов (ВАТ) (таб. 1).

Таблица 1.

Отдельные показатели гемостаза у больных с ГЦ и без ГЦ. (M±m)

Показатель	Группы больных	FVIII:C %	VWF R:Co %	VWF Ag %	Показатели ВАТ	
					Сумма активных форм тромбоцитов %	Число тромбоцитов в агрегатах %
Норма		100,3±4,1	97,83±5,51	98,3±7,3	12,8±0,5	6,8±0,4
BT	с ГЦ	162,6±14,83*	159,5±13,19*	169,2±18,42*	25,79±1,73*	9,9±0,7*
	без ГЦ	156,0±11,8*	138,0±11,55*	140,1±9,81*	22,73±1,39*	8,38±0,5*
AT	с ГЦ	157,2±15,65*	166,0±16,39**,	175,0±11,34*	20,0±1,67*	7,8±0,8*
	без ГЦ	140,6±7,7*	102,0±10,82**,	146,0±15,14*	20,8±1,89*	8,2±0,7*
ABT	с ГЦ	250,4±34,54**,	230,7±17,2*, **	230,4±17,3*, **	29,29±2,9*	9,8±1,1*
	без ГЦ	124,0±7,17*, **	123,0±7,46*, **	148,0±33,56**, **	24,75±3,2*	8,0±0,7*

* - $p < 0.001$, достоверное различие с нормой

** - $p < 0,05$, достоверны различия между двумя группами больных

Для тромбофилии, ассоциированной с ГЦ, помимо активации плазменно-коагуляционного и тромбоцитарного звеньев гемостаза характерно снижение активности естественных антикоагулянтов. Активность антитромбина III составила 107,8±4,9 у больных с ГЦ, а у больных без ГЦ – 127,3±4,5 по сравнению с 108,8±0,5 в контрольной группе. Эти данные отра-

зили тенденцию к угнетению системы естественных антикоагулянтов у больных с повышенным уровнем ГЦ в плазме.

Эффективность терапии, направленной на снижение уровня ГЦ.

Для оценки влияния терапии фолиевой кислотой и витаминами В₆ и В₁₂ на уровень ГЦ в плазме нами в динамике наблюдалось 175 лиц с исходно различными значениями ГЦ. До начала витаминотерапии у 5% пациентов была выявлена тяжелая ГГЦ (70-100 мкмоль/л), у 25% пациентов - умеренная ГГЦ (20-70 мкмоль/л), у 35% пациентов – легкая ГГЦ (13,5-20 мкмоль/л) и у 35% уровень ГЦ плазмы был в пределах пограничных значений (11-13,5 мкмоль/л).

Все обследуемые в течение первого месяца наблюдения получали лечебные дозировки фолиевой кислоты в сочетании с витаминами В₆ и В₁₂: 75% лиц с тяжелой и умеренной ГГЦ получали ежедневно в течение 1-2 месяцев фолиевую кислоту по 2 мг, а также витамины В₆ (5 мг) и В₁₂ (50 мкг), 25% лиц с тяжелой и умеренной ГГЦ получали ежедневно по 5 мг фолиевой кислоты. Пациенты с легкой ГГЦ и с пограничными значениями ГЦ плазмы получали фолиевую кислоту по 1 мг/сут. Характерная динамика изменения уровней ГЦ плазмы на фоне проводимой витаминотерапии через 1 месяц в подгруппах больных с различной степенью тяжести ГГЦ отражена в таблицах 2, 3, 4, 5.

Таблица 2.

Динамика уровня ГЦ на фоне витаминотерапии больных с тяжелой ГГЦ.

ФИО	Возраст, г	Уровень ГЦ, мкмоль/л		
		До лечения	Через 1 мес.	Через 6 мес.
К-ва	42	70,0	18,5	14,8
М-й	40	90,0	36,0	11,0
Л-в	60	82,2	40	16
Я-в	30	76,8	48,9	20,0
Т-н	58	112,0	50,6	24,0

Таблица 3.

Динамика уровня ГЦ на фоне витаминотерапии у больных с умеренной ГГЦ.

ФИО	Возраст, г	Уровень ГЦ, мкмоль/л	
		До лечения	Через 1 месяц
К-й.	35	38,5	32,1
Ш-в А.	30	37,5	19,4
Ш-в Г.	56	33,6	10,6
Е-в	56	59,4	30,5
Щ-н	40	23,4	12,6
М-в	45	33,0	21,5
Т-в.	34	23,1	16,9
Д-ва	38	23,7	7,9

Таблица 4.

Динамика уровня ГЦ при витаминотерапии у пациентов с легкой ГГЦ.

ФИО	Возраст, г	Уровень ГЦ, мкмоль/л	
		До лечения	После лечения
Е-в	48	15,7	11,1
Н-в	44	14,9	9,0
Б-ва	61	16,0	10,3
А-а	35	16,7	10,6
Я-в	63	15,1	7,3
С-ва	58	15,5	8,4

Уровень ГЦ на фоне ежедневного приема фолиевой кислоты и витаминов В₆ и В₁₂ достоверно снижался у всех пациентов и лиц контрольной группы. При этом снижение уровня ГЦ как в абсолютных, так и в относительных значениях было тем существеннее, чем выше был исходный уровень ГЦ.

Таблица 5.

Динамика уровня ГЦ при витаминотерапии у лиц с исходно нормальными значениями ГЦ.

ФИО	Возраст	Уровень ГЦ мкмоль/л	
		До лечения	После лечения
Г-н	56	12,1	10,7
Б-ва	37	11,7	7,9
Л-ва	28	11,7	8,3
Б-в	44	12,0	5,7
З-на	51	11,3	9,3
И-в А.	41	12,9	8,8
Я-ва	23	11,0	5,3

У пациентов с тяжелой ГГЦ (исходные значения выше 70 мкмоль/л) за первый месяц терапии удалось снизить уровень ГЦ в среднем по группе на 46%, за 6 месяцев – еще на 52%. Нормальные показатели уровня ГЦ при пролонгации приема лечебных доз фолиевой кислоты и витаминов В₆ и В₁₂ до 1 года и более достигались в 96% случаев. При использовании более высоких доз фолиевой кислоты - 5 мг/сут в подгруппе из 40 человек с умеренной и тяжелой ГГЦ отмечалась тенденция к более быстрому достижению нормальных значений ГЦ. Однако отказ от дальнейшего приема витаминов либо попытки перехода с лечебных дозировок фолиевой кислоты на профилактические (0,2-0,8 мг/сут) приводил к нарастанию уровня ГЦ, в ряде случаев практически до исходных показателей.

В подгруппах с умеренной и легкой ГГЦ уровни ГЦ уменьшались у всех больных с высокой степенью достоверности ($p < 0.0001$). Средняя разница в уровне ГЦ через 1 месяц при умеренной ГГЦ составила 5,2 мкмоль/л, при легкой – 3,4 мкмоль/л. При наличии легкой ГГЦ в 99% случаев достигались нормальные показатели, что позволяло переходить на поддерживающие

дозы витаминов. Оптимальные сроки достижения желаемых значений ГЦ (<8 мкмоль/л) - 1 месяц при использовании низких дозировок фолиевой кислоты (0,8 – 1 мг) демонстрировали женщины до 35 лет без вредных привычек и тяжелых сопутствующих заболеваний. В этой же подгруппе нормальные значения ГЦ регистрировались в дальнейшем при использовании поддерживающих дозировок (0,4 – 0,8 мг). При наличии факторов, предрасполагающих к ГЦ, попытки ухода с лечебных доз на поддерживающие вели к возвращению исходной ГЦ.

Принимая во внимание тот факт, что фермент МТГФР является ключевым ферментом фолатного цикла в организме, представлялось интересным рассмотреть эффективность лечения фолиевой кислотой в зависимости от генотипа. Результаты лечения в зависимости от генотипа приведены в таблице 6.

Таблица 6.

Эффективность витаминотерапии в зависимости
от С677Т полиморфизма гена МТГФР

Генотип	Уровень ГЦ		Степень снижения уровня ГЦ
	До лечения	После лечения	
ТТ	31,9±6,2	20,3±3,7	36 %
СТ	15,9±1,1*	11,9±0,9*	25 %
СС	16,2±1,1*	12,5±1,3*	22 %

* - достоверное различие (p<0,05)

Пациенты с ТТ генотипом были более восприимчивы к проведенной витаминотерапии – уровень ГЦ снизился у них в среднем на 36% в сравнении с 25% при СТ генотипе и 22% при СС генотипе. Так как установлена зависимость между наличием С677Т полиморфизма и снижением уровня общего фолата в организме, в целом ряде исследований были предприняты попытки определить минимальную эффективную дозу и длительность приема фолиевой кислоты у лиц с данным генотипом. Мы выявили значимое снижение уровня ГЦ в группе с ТТ генотипом при использовании 2 мг/день фолиевой

кислоты курсом 3 недели. Однако для снижения значений ГЦ до желаемых (ниже 10 мкмоль/л) потребовались курсы длительностью не менее 3 месяцев (в ряде случаев до 6 месяцев).

При сравнительном анализе показателей гемостаза до и после проведенной терапии удалось выявить следующую закономерность – у больных с ГГЦ достоверно повысилась активность АТ III ($p < 0,0001$ в парном тесте). Средние значения активности АТ III до и после лечения также различались с высокой степенью достоверности ($118,5 \pm 5,9$ % и $156,7 \pm 9,2$ % соответственно, $p = 0,0014$).

Своевременная диагностика ГГЦ имеет большое клиническое значение, так как проведение патогенетической терапии витаминами группы В позволяет нормализовать уровень ГЦ, проводить адекватное лечение данной формы тромбофилии и профилактику ретромбозов. При тромбоблитерирующих поражениях артерий нижних конечностей устранение ГГЦ является обязательным компонентом комплексной терапии, что позволяет уменьшить проявления артериальной недостаточности – на фоне означенной терапии увеличивается дистанция ходьбы, уменьшается частота болей в покое, наблюдается заживление или тенденция к заживлению трофических язв.

Таким образом, для тромбофилии при ГГЦ характерны следующие клиничко-лабораторные особенности. Данная форма тромбофилии клинически проявляется как артериальными, так и венозными тромбозами. Это наиболее часто встречающаяся форма тромбофилии. Особенности физиологической адаптации системы гемостаза к беременности, а также повышенное потребление фолата плодом могут привести к манифестации тромбофилии, вызванной ГГЦ, во время беременности, что может проявиться как акушерскими осложнениями, так и тромбозами. ГГЦ может быть как наследственной, так и приобретенной. Целый ряд заболеваний, а также многие лекарственные препараты, широко используемые в клинической практике, могут индуцировать ГГЦ. Данная форма тромбофилии имеет патогенетическую терапию – витамины В₉, В₁₂ и В₆ в лечебных дозах. При отсутствии патогене-

тической терапии (использовании только стандартной противотромботической терапии) в высоком проценте случаев отмечается рецидивирование тромботических осложнений. Для ГГЦ характерна активация плазменно-коагуляционного и тромбоцитарного звеньев гемостаза с одновременным снижением активности естественных антикоагулянтов, что обязательно должно учитываться при ведении больных. Патологические эффекты ГЦ отмечаются при уровне выше 10 мкмоль/л. Помимо явной ГГЦ, выявляемой при определении базального уровня ГЦ, при диагностике данной формы тромбофилии необходимо исключать скрытую ГГЦ, выявляемую в тесте с метиониновой нагрузкой.

Список литературы.

1. D'Angelo A., Selhub J., Homocysteine and thrombotic disease // Blood. - 1997. –Vol. 9. - P.1-11.
2. Bolander-Gouaille C. Focus on Homocysteine and the Vitamins involved in its metabolism. // 2002 – Springer Verlag France. – 217 p.
3. D'Angelo A., Coppola A., Modonna P., et al. The role of vitamin B₁₂ in fasting hyperhomocysteinemia and its interaction with the homozygous C677T mutation of the MTHFR gene, a case – control study of patients with early – onset thrombotic events. // Thromb. Haemost. - 2000. - Vol.83. - P.563-570.
4. Carmel R., Jacobsen D.W. Homocysteine in Health and Disease. // 2001. - Cambridge University Press. – 500p.
5. Van der Griend R., Biesma D. H., Banga J. Postmethionine-load homocysteine determination for the diagnosis hyperhomocysteinemia and efficacy of homocysteine lowering regimens. Vascular Medicine – 2002. – Vol.7. – P. 29-33.
6. Fiskerstrand Y., Refsum H., Kvalheim G., Ueland P., Homocysteine and other thiols in plasma and urine: automated determination and sample stability. // Clinical Chemistry. – 1993. - Vol. 39. - P. 263-271.

7. Nygard O., Refsun H., Ueland P., Vollser S. Major life-style determinations of plasma total homocysteine distribuoin: The Hordaland Homocysteine Study. // Am. J. Clin. Nutr. – 1998. – Vol. 67. – P.163-170.
8. Malinow MR., Bostom A.G., Krauss RM., Homocysteine, diet and cardiovascular diseases: A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee, American Heart Association. // Circulation. - 1999. - Vol. 99. – P. 178-182.
9. Rasmussen K., Moller J., Lyngbak M., et al., Age and gender specific reference intervals for total homocysteine and methylmalonic acid in plasma before and after vitamin supplementation. // Clin. Chem. - 1996. - Vol.42. - P.630-636.
10. Gaustadnes M., Rudiger N., Rasmussen K. et al. Intermediate and severe hyperhomocysteinemia with thrombosis: a study of genetic determinants. // Thromb Haemost. - 2000. – Vol.83. – P. 554-558.
11. Shmeleva V., Kapustin S., Papayan L., Sobczynska-Malefora, Harrington D., Savidge G.F. Prevalence of hyperhomocysteinemia and the the MTHFR C677T polymorphism in patients with arterial and venous thrombosis from North Western Russia. // Thrombosis Research. - 2003. – Vol.11. – P. 351-356.

Приложение 1. Абсолютные и относительные показания к определению уровня ГЦ.

Обязательное определение уровня ГЦ	Желательное определение уровня ГЦ
<p>Артериальный тромбоз Атеросклероз</p> <p>Венозный тромбоз, ТЭЛА</p> <p>Семейный анамнез тромбоза</p> <p>Почечная недостаточность</p> <p>Отягощенный акушерский анамнез</p> <p>Метаболический синдром</p> <p>Вегетарианство</p> <p>Состояние после резекции желудка и 12-перстной кишки</p>	<p>Симптомы анемии у пожилых</p> <p>Артериальная гипертензия</p> <p>Сахарный диабет</p> <p>Гиперлипидемия</p> <p>Прием препаратов, являющихся антагонистами витаминов группы В</p> <p>Ревматоидный артрит, СКВ, рассеянный склероз</p> <p>Гипотиреоз</p> <p>Лимфопролиферативные заболевания</p> <p>Длительный прием комбинированных оральных контрацептивов</p> <p>Деменция, депрессия, когнитивные нарушения, атаксия</p>

Приложение 2. Детерминанты уровня гомоцистеина.

Детерминанты уровня гомоцистеина	влияние
<p>Генетические факторы:</p> <p>Гомозиготный дефект гена ЦБС</p> <p>Гомозиготный дефект гена МТГФР</p> <p>Мутации в гене кобаламина</p> <p>Гетерозиготный дефект гена ЦБС</p> <p>Гетерозиготный дефект гена МТГФР</p>	<p>↑↑↑</p> <p>↑↑↑</p> <p>↑↑↑</p> <p>↑</p> <p>↑</p>
<p>Физиологические детерминанты:</p> <p>Возраст</p> <p>Мужской пол</p> <p>Сниженная функция почек</p> <p>Беременность</p>	<p>↑</p> <p>↑</p> <p>↑</p> <p>↓</p>
<p>Образ жизни:</p> <p>курение</p> <p>потребление алкоголя и кофе</p> <p>низкая физическая активность</p> <p>стресс</p> <p>вегетарианство</p> <p>прием витаминов</p> <p>сбалансированное питание</p>	<p>↑</p> <p>↑</p> <p>↑</p> <p>↑</p> <p>↑↑</p> <p>↓</p> <p>↓</p>
<p>Лекарственные препараты:</p> <p>метотрексат, омега-3, фибраты и ниацин, бигуаниды, антиконвульсанты, леводопа, циклоспорин, теофиллин, диуретики, триметоприм, гидроксихинолины</p>	<p>↑</p>
<p>Патологические состояния:</p> <p>Дефицит В₁₂</p> <p>Дефицит фолата</p> <p>Дефицит В₆</p> <p>Ревматоидный артрит,</p> <p>Системная красная волчанка</p> <p>Рассеянный склероз</p> <p>Псориаз</p> <p>Почечная недостаточность</p> <p>Сахарный диабет</p> <p>Заболевания щитовидной железы (гипотиреоз)</p> <p>Желудочно-кишечные заболевания (атрофический гастрит, болезнь Крона, язвенный колит)</p> <p>Онкологические заболевания</p>	<p>↑↑↑</p> <p>↑↑</p> <p>↑</p> <p>↑</p> <p>↑</p> <p>↑</p> <p>↑</p> <p>↑↑</p> <p>↑</p> <p>↑</p> <p>↑</p> <p>↑</p>

Приложение 3. Оптимальные уровни ГЦ с учетом пола и возраста.

Возраст	Пол	Уровень гомоцистеина, мкмоль/л
< 30 лет	Мужчины и женщины	4,6-8,1
30-59 лет	Женщины	4,5-7,9
30-59 лет	Мужчины	6,3-11,2
>60 лет	Мужчины и женщины	5,8-11,9