

УДК 616-053.1-007.12-071 + 616.153.96

ПЯТЬ ПАРАМЕТРОВ ФЕРМЕНТА ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ В СЫВОРОТКАХ КРОВИ БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН И ИХ ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ПЛАЦЕНТАРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Коханов А.В., Ямпольская И.С., Бисалиева Р.А., Мамиев О.Б., Мяснянкин А.А.
*ГБОУ ВПО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России,
Астрахань, e-mail: kokhanov@mail.ru*

У 74 женщин с физиологическим течением беременности и у 41 женщины с беременностью, осложненной плацентарной недостаточностью (ПН) I и II степени, в сроки 10–14, 20–22, 30–32, 39–41 недель гестации комплексно исследована динамика пяти показателей фермента щелочной фосфатазы (ЩФ): активность тотальной сывороточной ЩФ, активность и концентрация плацентарной ЩФ (ПЩФ), их отношение (удельная активность ПЩФ) и отношение активностей ПЩФ/ЩФ. Для каждого параметра определены референтные значения и точки отсечения (cut-off) физиологической беременности и беременности, осложненной ПН. Установлено, что в первом триместре беременности на 10–12 неделях высокоинформативной диагностической моделью ПН является определение в сыворотке крови у беременных ЩФ (более 100 Е/л), а самым эффективным тестом диагностики ПН II на 30–32 неделях гестации является выявление в сыворотке крови беременных ПЩФ в концентрации ниже 80 мкг/л, снижение активности ПЩФ ниже 114 Е/л и снижение отношения ПЩФ/ЩФ ниже 45%. Для доклинической оценки беременности, осложненной ПН, рекомендуется определять коэффициент удельной активности ПЩФ (Е/мкг) и отношение ПЩФ/ЩФ (%).

Ключевые слова: плацентарная щелочная фосфатаза, удельная активность, беременность, плацентарная недостаточность, ранняя диагностика, диагностическая эффективность теста

FIVE PARAMETERS OF ALKALINE PHOSPHATASE ENZYME IN THE SERUM OF PREGNANT WOMEN AND THEIR IMPORTANCE FOR THE DIAGNOSIS OF PLACENTAL INSUFFICIENCY

Kokhanov A.V., Yampolskaya I.S., Bisaliev R.A., Mamiev O.B., Myasnyankin A.A.
Astrakhan State Medical University, Astrakhan, e-mail: kokhanov@mail.ru

In 74 women with physiological pregnancy and 41 women with pregnancy complicated by placental insufficiency (PI) I and II degree in terms of 10–14, 20–22, 30–32, 39–41 weeks of gestation in a complex investigated the dynamics of the five indicators of the enzyme alkaline phosphatase (ALP) activity in serum total alkaline phosphatase activity and the concentration of placental alkaline phosphatase (PLAP), their ratio (specific activity PLAP) and activity ratio PLAP/ALP. For each parameter defined reference values and the cut-off point (cut-off) physiological pregnancy and pregnancy complicated by PI. It was found that in the first trimester of pregnancy at 10–12 weeks of investigation highly informative diagnostic model PI is determination of serum alkaline phosphatase in pregnant women (more than 100 U/L), and the most effective diagnostic test of PI II at 30–32 weeks of gestation is to identify in pregnant serum PLAP at a concentration below 80 µg/L, decreased activity PLAP below 114 U/L and the reduction of ratio PLAP/ALP below 45%. For preclinical evaluation of pregnancy complicated PI, it is recommended to determine the ratio of the specific activity of PLAP (U/µg), and the ratio of PLAP/ALP (%).

Keywords: placental alkaline phosphatase, specific activity, pregnancy, placental insufficiency, early diagnostics, diagnostic efficiency of the test

До настоящего времени остаются актуальными разработка и внедрение в клиническую практику новых современных диагностических методов, позволяющих выявлять патологические изменения фетоплацентарного комплекса на доклинической стадии заболевания [3, 8]. По данным отечественных авторов фетоплацентарная недостаточность (ФПН) в акушерской практике встречается с частотой от 10 до 24% [6, 7]. Наиболее ранними проявлениями (еще до заметной задержки развития плода) являются нарушения кровообращения в фетоплацентарном комплексе [7], на разработку методов выявления которой нацелено внимание современных исследователей [1, 2, 9].

На сегодняшний день ведущими методами диагностики плацентарной недоста-

точности (ПН) являются ультразвуковая биометрия, определение кровотока в сосудах плаценты, определение хорионического гонадотропина и плацентарного лактогена, ретроспективное послеродовое патологоанатомическое исследование последа. Однако диагностика, основанная на клинической оценке данных УЗИ, показателях функционального состояния беременной и признаках морфологической зрелости плода, не позволяет достаточно достоверно и своевременно оценить угрозу плацентарной недостаточности [7, 8].

В связи с этим помимо новейших инструментальных технологий особую актуальность приобретает поиск высокочувствительных иммунохимических маркеров ранней диагностики нарушений

фетоплацентарного гомеостаза, к числу которых следует отнести исследование в крови беременных уровня плацентарных белков, в том числе и плацентарной щелочной фосфатазы (ПЩФ) [2, 6, 7, 8, 9].

Цель исследования – оценка значения фермента щелочной фосфатазы и его плацентарного изофермента в диагностике плацентарной недостаточности.

Материалы и методы исследования

У 74 беременных женщин в возрасте от 18 до 35 лет с физиологическим течением периода гестации и у 41 женщины с беременностью, осложненной плацентарной недостаточностью I и II степени, в сроки 10–14, 20–22, 30–32, 39–41 недель гестации комплексно исследована динамика пяти показателей фермента: активность тотальной сывороточной ЩФ, активность и концентрация ПЩФ, их отношение (удельная активность ПЩФ) и отношение ПЩФ/ЩФ.

Клинический материал был собран на базе ГБУЗ АО «Городской клинический родильный дом» г. Астрахани. Все обследованные беременные (115 женщин) на основании оценки особенностей течения беременности и обследования состояния здоровья их 115 новорожденных ретроспективно были разделены на три клинические группы:

1) пациентки с физиологическим течением беременности, условно обозначенные как группа «ФБ» ($n = 74$);

2) беременные с компенсированной формой ПН, группа «ПН I ст» ($n = 28$);

3) пациентки с беременностью, осложненной субкомпенсированной формой ПН, группа «ПН II ст» ($n = 13$).

В качестве контрольной группы использовали 68 образцов сывороток крови женщин-доноров в возрасте от 23 до 50 лет, имевших в анамнезе срочные роды.

Клиническое обследование беременных, плодов и новорожденных осуществлялось с помощью стандартных клинических, лабораторных и биохимических методов, ультразвуковой диагностики, доплерометрии. Диагностика ЗРП до родов основывалась на данных наружного акушерского исследования и фетометрии.

Анализ данных акушерского анамнеза, течения беременности, родов, особенностей течения раннего неонатального периода проведен с использованием обменных карт и историй родов (уч. ф. № 96) и развития новорожденного (уч. ф. № 097/у), протоколов патологоанатомического исследования последов.

Забор крови у беременных для биохимических исследований осуществлялся на базе женской консультации ГБУЗ АО КРД г. Астрахани или в самом родильном доме путем венопункции из локтевой вены.

Сыворотки крови разливались по аликвотам в маркированные пробирки Эппендорфа по 0,5 мл и без добавления консерванта хранились в замороженном виде при -20°C до момента проведения анализа.

Активность щелочной фосфатазы во всех параллельных образцах нативных и прогретых при 65°C осветленных центрифугированием сывороток крови (ЩФ и ПЩФ в Е/л) определялась в клинико-диагностической лаборатории Федерального Центра сердечно-сосудистой хирургии (зав. лаб. – к.м.н. Петрова О.В.) на автоматическом биохимическом мно-

гоканальном анализаторе «MicroLab» с использованием стандартных наборов («Vitalab», Нидерланды) в соответствии с рекомендациями производителя. Для количественного определения плацентарной щелочной фосфатазы (ПЩФ) применяли тест-системы для встречного иммуноэлектрофореза и ИФА, полученные самостоятельно [5]. Антисыворотки к ПЩФ получены нами путем иммунизации и реимунизации кроликов очищенными антигенами с полным адьювантом Фрейнда по общепринятым схемам [4, 5]. Верификацию моноспецифических тест-систем проводили с референтными наборами на ПЩФ из банка тест-систем кафедры биохимии АГМУ.

Полученные результаты подвергались статистической обработке с вычислением средних величин и их ошибок ($M \pm m$), достоверными считались различия при $p < 0,05$. В соответствии с критериями ВОЗ для оценки диагностической информативности полученных значений определяли чувствительность и специфичность с помощью ROC-анализа с использованием пакета Deductor Studio Pro версии 5.2. Диагностическую эффективность тестов оценивали путем расчета площади под ROC-кривой – AUC (Area Under Curve).

Результаты исследования и их обсуждение

В сыворотках крови женщин доноров общая активность ЩФ составила $98,8 \pm 10,65$ Е/л, а средняя активность термостабильной фракции ЩФ (то есть ПЩФ), измеренная в этих же образцах сыворотки после прогревания и обнаруживаемая только у 9 из 68 доноров (13,2%) составила $1,7 \pm 0,75$ Е/л. Доля ПЩФ от общего пула активности щелочных фосфатаз (отношение ПЩФ/ЩФ) составила в среднем всего $1,0 \pm 0,41\%$. Средняя концентрация ПЩФ в 68 сыворотках крови доноров, выявленная методом ИФА с чувствительностью 20 нг/мл у 4 из 68 доноров (5,9%), составила $1,2 \pm 0,57$ мкг/л, а удельная активность фермента $K_{\text{ПЩФ}}$ у 9 серопозитивных доноров – $0,54 \pm 0,24$ Е/мкг.

Динамика изменения всех показателей ЩФ сыворотки крови при физиологической беременности (ФБ) демонстрировала одинаковую тенденцию к плавному нарастанию всех значений с 10–12 к 30–32 неделе гестации и плато до родов (таблица).

При сравнении беременных групп «ФБ» и «ПН» на 10–12 неделях гестации при наличии ПН уровень активности сывороточной ЩФ достоверно выше (на 25–50%), чем при физиологической беременности, и повышается пропорционально степени ПН, однако в начале 3-го триместра, наоборот, достоверно ниже, чем при ФБ, и снижается пропорционально степени ПН (таблица).

Все остальные показатели ПЩФ у беременных с ПН на 10–12 и 20–22 неделях гестации статистически достоверно не отличались от соответствующего показателя при

ФБ (табл. 1). К 30–32 неделе беременности активность ПЩФ, концентрация ПЩФ и отношение ПЩФ/ЩФ снижались макси-

мально по сравнению с группой «ФБ», независимо от степени тяжести ПН (таблица), и сохранялись на низком уровне до родов.

Концентрация и активность ПЩФ в сыворотках крови беременных с различным сроком гестации во взаимосвязи со степенью выраженности ПН

Показатель	Срок гестации, нед.	ФБ (n = 74)	ПН I ст (n = 28)	ПН II ст (n = 13)	Доноры (n = 68)
ЩФ (Е/л)	10–12	82,9 ± 5,15	104,7 ± 8,98*	123,1 ± 11,39*	98,8 ± 10,65
	20–22	120,1 ± 6,69	121,5 ± 9,09	126,8 ± 9,43	
	30–32	246,5 ± 11,00	201,5 ± 13,37*	204,3 ± 11,54*	
	39–41	228,2 ± 10,95	204,5 ± 10,09	217,4 ± 11,86	
ПЩФ (Е/л)	10–12	10,7 ± 1,47	11,6 ± 1,94	11,9 ± 5,41	1,7 ± 0,75
	20–22	33,3 ± 3,22	30,8 ± 3,36	29,9 ± 4,26	
	30–32	152,5 ± 9,38	85,5 ± 6,25*	93,3 ± 9,79*	
	39–41	132,6 ± 7,94	94,8 ± 9,23*	93,8 ± 12,50*	
ПЩФ (мкг/л)	10–12	12,7 ± 2,23	13,6 ± 2,53	15,4 ± 4,02	1,2 ± 0,57
	20–22	43,8 ± 4,12	38,6 ± 3,70	40,0 ± 6,79	
	30–32	162,2 ± 10,72	102,9 ± 8,59*	101,5 ± 11,65*	
	39–41	150,8 ± 11,19	112,9 ± 11,28*	126,2 ± 20,18	
K _{пщф} (Е/мкг)	10–12	0,47 ± 0,06	0,61 ± 0,077	0,52 ± 0,104	0,54 ± 0,24
	20–22	0,75 ± 0,033	0,78 ± 0,034	0,79 ± 0,039	
	30–32	0,96 ± 0,014	0,88 ± 0,038*	0,97 ± 0,069	
	39–41	0,94 ± 0,020	0,86 ± 0,055	0,77 ± 0,039*	
ПЩФ/ЩФ (%)	10–12	10,1 ± 1,23	13,7 ± 1,45	14,4 ± 2,17	1,0 ± 0,41
	20–22	25,7 ± 1,79	26,0 ± 2,40	23,9 ± 3,07	
	30–32	60,1 ± 1,78	43,9 ± 2,61*	46,0 ± 4,41*	
	39–41	57,0 ± 1,43	47,0 ± 4,32*	42,5 ± 5,00*	

Примечание. * – p < 0,05 статистически значимые различия по сравнению с физиологической беременностью соответствующего срока гестации (группа «ФБ»).

Коэффициент удельной активности K_{пщф} в сыворотке крови у беременных с ПН был достоверно ниже физиологической нормы только в конце беременности, причем на 30–32-й неделях гестации при ПН I достоверно еще ниже, чем при ПН II (таблица). Таким образом, депрессия ферментативной активности ПЩФ на фоне ФПН связана не только со снижением биосинтеза фосфатазы, но и с угнетением ее активности, что кардинально изменяет тактику медикаментозной коррекции ПН (рекомендуются активаторы и реактиваторы фермента ЩФ, например ионы магния).

Проведенный ROC-анализ показал, что для диагностики ПН на 10–12 неделях гестации наибольшую диагностическую значимость с чувствительностью модели – 76,9% и специфичностью – 79,3% имеет повышение уровня ЩФ в крови более 100 Е/л (AUC = 0,802).

На 20–22 неделях гестации из пяти исследованных параметров фосфатазы ROC-анализ не выявил ни одного эффективного диагностического теста для диагностики ПН.

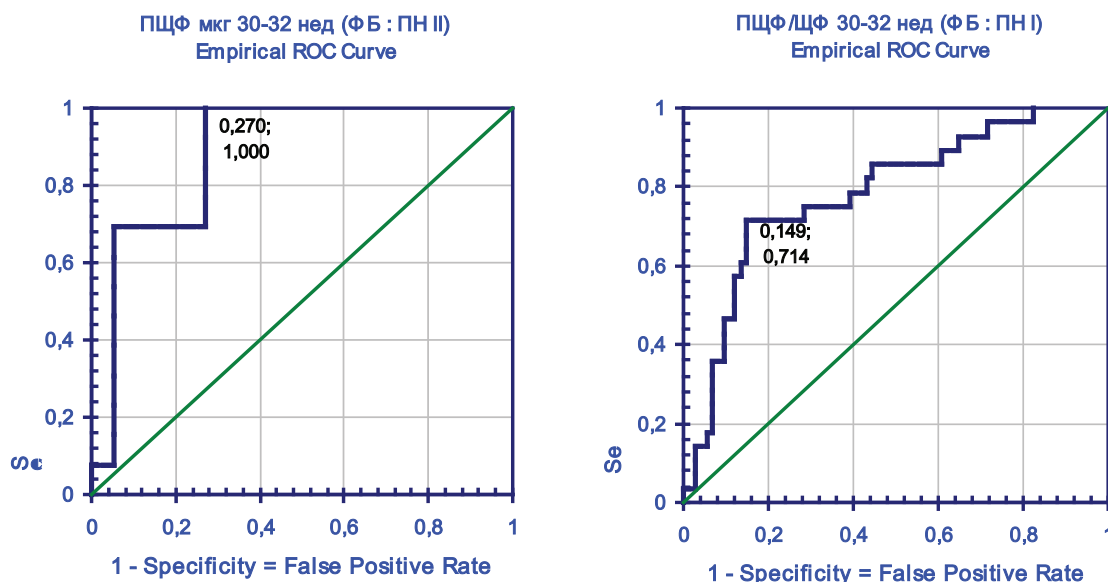
Однако на 30–32 неделях гестации ROC-анализ позволил обнаружить максимальное число высокоинформативных диагностических моделей ПН: тест на ЩФ, на все варианты и отношения ПЩФ. Для всех диагностических моделей p < 0,05.

Самым эффективным (AUC = 0,884) тестом диагностики ПН II в этот срок является выявление в сыворотке крови беременных (рисунок) ПЩФ в концентрации ниже 80 мкг/л (чувствительность модели – 69,2% и специфичность – 94,6%), снижение активности ПЩФ ниже 114 Е/л (AUC = 0,803, чувствительность – 85,7% и специфичность – 71,6%) и снижение отношения ПЩФ/ЩФ ниже 45% (AUC = 0,784, чувствительность – 71,4% и специфичность – 85,1%).

Перед родами на 39–41 неделях гестации ROC-анализ показал, что в диагностике ПН информативными диагностическими моделями хорошего качества является определение в сыворотке крови у беременных всех вариантов ПЩФ (≤ 84 Е/л, ≤ 80 мкг/л и ≤ 0,78 Е/мкг) и отношения ПЩФ/ЩФ (≤ 37%).

Таким образом, по повышению сывороточного уровня ЩФ можно прогнозировать наличие ПН на ранних стадиях гестации в конце 1-го триместра, а по пониженному

уровню ЩФ, ПЩФ и коэффициентов их отношения между собой в начале 3-го триместра можно достоверно прогнозировать наличие ПН на поздних стадиях беременности.



ROC-кривые диагностических моделей высокого качества на 30–32 неделе:
ПЩФ для ПН II и отношение ПЩФ/ЩФ для ПН I

Полученные нами результаты указывают на важную роль ПЩФ в становлении фетоплацентарного гомеостаза: несоответствующий сроку гестации уровень биосинтеза ПЩФ в организме матери, а также снижение удельной активности этого фермента отражаются на развитии плаценты и являются факторами формирования ПН.

Выводы

1. В сыворотках крови беременных уровни активности ЩФ, ПЩФ, концентрации ПЩФ и коэффициенты их отношений коррелируют со степенью тяжести ПН. Для каждого параметра определены референтные значения и точки отсечения (cut-off) физиологической беременности от беременности, осложненной ПН.

2. Для доклинической оценки беременности, осложненной ПН, рекомендуется определять коэффициент удельной активности ПЩФ (Е/мкг) и отношение ПЩФ/ЩФ (%). Определение ЩФ, ПЩФ и коэффициентов их отношений повышает эффективность комплексной диагностики ПН и может применяться для контроля ранних негативных изменений фетоплацентарного гомеостаза.

3. Установлено, что депрессия ферментативной активности ПЩФ на фоне ПН объ-

ясняется не только снижением биосинтеза фермента в плаценте, но также угнетением энзиматической активности фосфатазы, что следует учитывать при медикаментозной коррекции ПН.

Список литературы

1. Аржанова О.Н. Плацентарная недостаточность: диагностика и лечение: учебное пособие / О.Н. Аржанова [и др.]. – СПб.: Нордмед Издат, 2004. – 32 с.
2. Бурлев В.А., Зайдиева З.С., Тютюник В.Л. Современные технологии в доклинической диагностике плацентарной недостаточности // *Мать и дитя: Матер. VIII Всеросс. науч. Форума.* – М., 2006. – С. 49–50.
3. Гужвина Е.Н. Клинические и прогностические критерии плацентарной недостаточности в условиях нарушенной адаптации к родовому стрессу у матери и плода: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Волгоград, 2013. – 43 с.
4. Коханов А.В., Белопасов В.В., Мяснянkin А.А., Ямпольская И.С., Луцева О.А. Способ получения и очистки плацентарной щелочной фосфатазы // Патент России № 2492868. 2013, Бюл. № 13.
5. Коханов А.В. Разработка тест-системы для индикации сывороточных уровней плацентарной изоформы щелочной фосфатазы / А.В. Коханов, О.В. Мусатов, А.А. Мяснянkin, Р.И. Асфандияров, И.С. Ямпольская // *Астраханский медицинский журнал.* – 2011. – № 3. – С. 229–230.
6. Липатов И.С., Мельников В.А., Тезиков Ю.В. Оценка степени тяжести плацентарной недостаточности у беременных // *Рос. вестн. акуш.-гин.* – 2008. – № 5. – С. 38–43.
7. Сидорова И.С., Макаров И.О. Клинико-диагностические аспекты фето-плацентарной недостаточности – М.: МИА, 2005. – 295 с.

8. Стрижаков А.Н., Тимохина Т.Ф., Баев О.Р. Фетоплацентарная недостаточность: патогенез, диагностика, лечение // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2003. – № 5. – С. 53–63.

9. Ямпольская И.С., Коханов А.В., Мамиев О.Б. Сывороточные уровни некоторых белков беременности в оценке синдрома задержки развития плода // *Мать и дитя: материалы XIII Всероссийского научного форума*. – М., 2012. – С. 209–210.

References

1. Arzhanova O.N. Placentarnaja nedostatochnost': diagnostika i lechenie: uchebnoe posobie / O.N. Arzhanova [i dr.]. SPb.: Nordmed Izdat, 2004. 32 p.

2. Burlev V.A., Zajdieva Z.S., Tjutjunik B.L. Sovremennye tehnologii v doklinicheskoj diagnostike placentarnoj nedostatochnosti // *Mat' i ditja: Mater. VIII Vseross. nauch. Forum. M., 2006*. pp. 49–50.

3. Guzhvina E.N. Klinicheskie i prognosticheskie kriterii placentarnoj nedostatochnosti v uslovijah narushennoj adaptacii k rodovomu stressu u materi i ploda: avtoref. dis. ... d-ra med. nauk. Volgograd, 2013. 43 p.

4. Kohanov A.V., Belopasov V.V., Mjasnjankin A.A., Jampol'skaja I.S., Luceva O.A. Sposob poluchenija i ochistki placentarnoj shhelochnoj fosfatazy // *Patent Rossii no. 2492868*. 2013, Bjul. no. 13.

5. Kohanov A.V. Razrabotka test-sistemy dlja indikacii syvorotochnyh urovnej placentarnoj izoformy shhelochnoj fosfatazy / A.V. Kohanov, O.V. Musatov, A.A. Mjasnjankin,

R.I. Asfandijarov, I.S. Jampol'skaja // *Astrahanskij medicinskij zhurnal*. 2011. no. 3. pp. 229–230.

6. Lipatov I.S., Mel'nikov V.A., Tezиков Ju.V. Ocenka stepeni tjazhesti placentarnoj nedostatochnosti u beremennyh // *Ros. vestn. akush.-gin.* 2008. no. 5. pp. 38–43.

7. Sidorova I.S., Makarov I.O. Kliniko-diagnosticheskie aspekty fetoplacentarnoj nedostatochnosti M.: MIA, 2005. 295 p.

8. Strizhakov A.N., Timohina T.F., Baev O.R. Fetoplacentarnaja nedostatochnost': patogenez, diagnostika, lechenie // *Voprosy ginekologii, akusherstva i perinatologii*. 2003. no. 5. pp. 53–63.

9. Jampol'skaja I.S., Kohanov A.V., Mamiev O.B. Syvorotochnye urovni nekotoryh belkov beremennosti v ocenke sindroma zaderzhki razvitija ploda // *Mat' i ditja: materialy XIII Vserossijskogo nauchnogo foruma. M., 2012*. pp. 209–210.

Рецензенты:

Николаев А.А., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой химии, Астраханский государственный медицинский университет, г. Астрахань;

Тризно Н.Н., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии, Астраханский государственный медицинский университет, г. Астрахань.

Работа поступила в редакцию 25.12.2014.