

Stanovení homocysteinu v biologickém materiálu

Dubská L., Hyánek J.

OKBHI Nemocnice na Homolce, Praha

SOUHRN

Pro stanovení hladiny homocysteinu v plazmě existuje v současnosti velké množství metod. Vedle instrumentálně náročných chromatografických metod jsou dnes k dispozici soupravy pro imunochemické analyzátory, pracující na principu FPIA, ICL i EIA. Velkého rozšíření doznaly i enzymatické metody, vhodné pro běžné typy biochemických analyzátorů. Zvýšenou pozornost je třeba věnovat preanalytické fázi stanovení. Nejpoužívanějším materiálem k vyšetření je EDTA plazma, krevní elementy je třeba oddělit ihned po odběru. Výsledná koncentrace je ovlivněna dietou, věkem, pohlavím, rasou, polohou při odběru i délkou zatažení paže při odběru. Biologická variabilita koncentrace tHcy je uváděna v rozmezí 7–15 %.

Klíčová slova: homocystein, enzymatické metody, preanalytická fáze.

SUMMARY

Dubská L., Hyánek J.: Determination of homocysteine in biological material

There are many methods now available for total plasma homocystein determination. The chromatographic methods require technically demanding instrumentation while immunoassays can be performed using the commercially available automated FPIA, ICL and EIA procedures. Enzymatic homocysteine assays are now widely used and these provide acceptable performance on many commonly used chemical analysers. The control of pre-analytical stage is crucial for all types of assays. The EDTA plasma is most commonly used samples and for these faster centrifugation is required. Plasma homocysteine concentration is influenced by diet, age, sex and ethnicity. Posture and venous stasis also have an effect. Intra-individual variations in plasma homocysteine concentrations have been reported to range from 7 to 15%.

Key words: homocysteine, enzymatic methods, pre-analytical stage.

Úvod

Homocystein se při fyziologickém pH v organismu vyskytuje v několika formách: volný homocystein (redukován; 1–2 %), oxidovaná forma – homocystin (5 až 10 %), smíšené disulfidy homocysteinu (5–10 %), vázaný na krevní bílkoviny (protein-disulfid) – 70–90 % [24]. Po odběru krve dochází ke změnám, podíl volného Hcy rychle klesá. Pro stanovení volného Hcy je proto nutné ihned po odběru zablockovat volné thiohy, a zabránit tak jejich vazbě na Hcy. To je v běžných podmínkách klinické laboratoře jen těžko splnitelné. Proto je dnes stanovován tzv. celkový homocystein (tHcy), tedy suma volné a vázané frakce.

Preanalytická fáze

Preanalytické fázi stanovení je třeba věnovat zvýšenou pozornost, a zabránit tak arteficiálnímu zvýšení koncentrace Hcy po odběru krve. Koncentraci Hcy ovlivňuje řada faktorů:

• **Vliv diety** – doporučen je odběr krve po 12hodinovém lačnění a lehké večeři večer před odběrem. Po dietě s vysokým obsahem proteinů dochází, podle některých autorů, po 4 hodinách k poklesu hladiny Hcy, vzestup na původní hladinu nastává po 8 hodinách od příjmu [8, 25], jiní autoři vliv diety neprokázali [9, 27]. Chronický abúzus alkoholu způsobuje zvýšení plazmatické hladiny homocysteinu [20].

• **Vliv věku, pohlaví a rasy** – s věkem dochází k vzestupu koncentrace Hcy v plazmě, souvisí to s poklesem glomerulární filtrace a s poklesem hladiny vitaminů B u starších osob. Ženy před menopauzou mají nižší hladiny Hcy než muži, existuje domněnka, že to souvisí

s rozdílným množstvím svalové hmoty u obou pohlaví, není vyloučen ani vliv pohlavních hormonů. Údaje o rozdílech v koncentraci tHcy u různých etnických skupin se liší, jeden z důvodů etnické variability může být rozdílnost v genetické výbavě. Například mutace C677T v genu pro MTHFR se vyskytuje u cca 10 % kavkazské populace, u africké a americké populace se tato mutace téměř nevyskytuje.

• **Vliv polohy při odběru** – při odběru vleže byl prokázán pokles tHcy cca o 5–10 % [8, 25].

• **Vliv délky zatažení paže při odběru** – po třímínutovém zatažení paže při odběru dochází k zvýšení koncentrace tHcy cca o 2,8 % [8].

• **Intraindividuální biologická variabilita** – je uváděna v rozmezí 7–15 % [8], 7–9,4 % [25], 7–11 % [21], 11 % [26]. Sezonní variabilita je zanedbatelná [25, 26].

• **Vhodný vzorek** – téměř všechny v současnosti používané metody stanovení tHcy dávají přednost stanovení v plazmě. Důvodem je možnost rychlé centrifugace, čímž je zabráněno uvolňování Hcy z erytrocytů do extracelulárního prostoru.

Nejčastěji používaným antikoagulačním činidlem je EDTA. Používá se i citrát sodný, heparin litný [22] a další aditiva, která stabilizují koncentraci Hcy v plazmě při laboratorní teplotě (fluorid sodný s heparinem, 3-deazaadenosin, kyselý citrát – konečné pH odebrané plně krve je cca 5,9 [19]). Některá z těchto aditiv nelze použít pro imunostanovení. V roce 2007 byla publikována německými vědci studie zabývající se využitím speciálních odběrových zkumavek, určených pro odběr krve na stanovení tHcy (Homocysteine-Primavette, KABE Labortechnik GmbH). Zkumavky obsahují EDTA a tHcy stabilizátor. V těchto zkumavkách může být plná krev ponechána až 40 hodin při laboratorní teplotě, aniž by

docházelo ke zvýšení hladiny tHcy. Vzorek je použitelný pro stanovení tHcy různými metodami (HPLC-FD, FPIA-Abbott, GC-MS, LC-MS i ICL-ADVIA) [23].

• **Stabilita homocysteinu ve vzorcích**

Vzorky plné krve [19] – skladování při laboratorní teplotě:

- za 1 hodiny vzrůst koncentrace tHcy o 10 %,
- za 4 hodiny vzrůst koncentrace tHcy o 20–35 %,
- za 24 hodiny vzrůst koncentrace tHcy o 60–75 %.

Pokud jsou vzorky odebrány do EDTA a zkumavky uchovávány na ledu, je tHcy stabilní nejméně 4 hodiny.

• **Vzorky plazmy**

Skladování při laboratorní teplotě:

- Hcy je v plazmě po centrifugaci a oddělení od krevních elementů stabilní 4 dny,
- při skladování za nízkých teplot (0–2 °C) je stabilita několik týdnů, při -20 °C několik let.

Analytické metody stanovení tHcy

Přehled metod uvádí tabulka 1.

Table 1. Main characteristics of the current analytical methods [8]

| Method* | Sample pretreatment | Plasma volume (µl) | Upper limit of linearity (µmol/l) | C.V. inter-assay for mean tHcy level (%) |
|------------------|--------------------------------|--------------------|-----------------------------------|--|
| GC-ID-MS | High workload + derivatization | 100 | 30–300 | 2.6–5.7 |
| LC-MS-MS | High workload | 100 | 60 | 5.9 |
| HPLC-FD | High workload + derivatization | 50–150 | 50–300 | 3.2–4.8 |
| HPLC-ED | High workload | 60 | 100 | 5.6 |
| IEC | Medium workload | 500 | 100–1000 | 7.8 |
| FPIA | none | 50 | 45–50 | 3.1 |
| ICL | none | 15 | 50 | 3.9 |
| EIA | Low workload | 25 | 50 | 6.2 |
| Enzymatic method | none | 5–100 | 80–100 | 2.8–3.7 |
| CE-LIF | High workload + derivatization | 100 | 200 | 7.8 |

* GC-ID-MS – gas chromatography-mass spectrometry with isotopic dilution

LC-MS-MS – liquid chromatography with tandem mass spectrometry

HPLC-FD – high-pressure liquid chromatography with fluorescence detection

HPLC-ED – high-pressure liquid chromatography with electrochemical detection

IEC – ion-exchange chromatography

FPIA – fluorescence polarization immunoassay

ICL – chemiluminescence immunoassay

EIA – enzyme-linked immunoassay

CE-LIF – capillary electrophoresis with laser induced fluorescence

Chromatografické metody mají značně vysoké požadavky na technické vybavení a erudovanost laboratorního personálu, nelze je běžně využívat v rutinní laboratoři. Specifikace jednotlivých metod jsou publikovány v řadě sdělení a přehledů [7, 8, 10, 11, 15, 16, 17, 18]. Výhodou je stanovení různých frakcí tHcy během jedné analýzy. Také kapilární elektroforéza umožňuje stanovení skupiny thiolů, včetně Hcy, při jedné analýze, ani tato metoda však není vhodná pro rutinní použití v biochemické laboratoři [12, 13]. Spíše pro vědecké účely jsou určeny vysoce senzitivní kolorimetrické senzory, které využívají barevnou reakci azoderivátů, obsahujících aldehydickou skupinu, s cysteinem a homocysteinem [14].

Imunostanovení se rozšířila díky komerčně dostupným soupravám. Jedná se o rychlé, automatizované stanovení vhodné pro rutinní použití. Hcy vázaný na protein je redukován na volný homocystein a konvertován za katalýzy S-adenosyl-L-homocystein hydrolázy na SAH (S-adenosyl-L-homocystein). Tato fáze je všem

imunostanovením společná, podle detekční koncovky lze pak imunostanovení rozdělit do uvedených tří skupin (FPIA-IMx, AxSYM, Abbott Laboratories, ICL – Immulite 2000, DPC, Advia Centaur, Bayer Diagnostics [2, 6], EIA – Axis Biochemicals). Do této skupiny stanovení se řadí také v nedávné době publikovaná imunonefelometrická metoda stanovení Hcy na analyzátoru BN II, Dade Behring, využívající v koncovce nefelometrického měření imunokomplexů [1].

Enzymatická stanovení lze provádět na běžných rutinních analyzátoch. Jde o metody obsahující sled 2 nebo 3 reakcí, při nichž dochází k redukci a následně konverzi homocysteinu za vzniku druhotných produktů (H₂S, pyruvát, H₂O₂ aj.), které jsou v dalších reakcích kvantifikovány přímo či nepřímo.

Příkladem je enzymatické stanovení firmy Carolina Liquid Chemistries, Brea, CA [3, 24], které je velmi rozšířeno, publikovány jsou aplikace na analyzátory firmy Roche – Modular P800 [4], Hitachi 917 [5], Beckman Coulter [3, 24] aj.

Princip stanovení:

Hcy + L-serin → (cystationin-β-syntháza) → L-cystathionin

L-cystathionin → (cystationin-β-lyáza) → Hcy + pyruvát + amoniak

Pyruvát + NADH → (LD) → NAD + laktát, měří se pokles absorbance při 340 nm.

Manuální příprava vzorku před stanovením není potřebná. Enzymatické metody mají v porovnání s imunostanovením obvykle vyšší linearitu a nižší cenu.

Pro stanovení homocysteinu v plazmě je v současnosti k dispozici velké množství metod. Od HPLC s fluorescenční detekcí, která byla nejběžnější metodou ještě před nedávnou dobou, je dnes stále patrnější odklon ke snáze proveditelným imunostanovením a enzymatickým metodám.

Literatura

1. **Zappacosta, B., Persichilli, S., Minucci, A. et al.** Analytical evaluation of new immunonephelometric method for homocysteine measurement. *Clin. Chimica Acta*, 2007, 375, p. 165–168.
2. **Demuth, K., Ducros, V., Michelsohn, S. et al.** Evaluation of Advia Centaur automated chemiluminescence immunoassay for determining total homocysteine in plasma. *Clin. Chimica Acta*, 2004, 349, p. 113–120.
3. **Zappacosta, B., Persichilli, S., Minucci, A. et al.** Evaluation of a new enzymatic method for homocysteine measurement. *Clin. Biochemistry*, 2006, 39, p. 62–66.
4. **Roberts, R., Roberts, W.** Performance characteristics of a recombinant enzymatic cycling assay for quantification of total homocysteine in serum or plasma. *Clin. Chimica Acta*, 2004, 344, p. 95–99.
5. **Kellogg, M., Parker, R., Ricupero, A. et al.** Evaluation of an enzymatic homocysteine assay for the Hitachi series chemistry analyzer. *Clin. Chimica Acta*, 2005, 354, p. 117–122.
6. **Tewari, P., Zhang, B., Bluestein, B.** Analytical and clinical evaluation of the Bayer ADVIA Centaur homocysteine assay. *Clin. Chimica Acta*, 2004, 342, p. 171–178.
7. **Nekrassova, O., Lawrence, N., Compton, R.** Analytical determination of homocysteine: a review. *Talanta*, 2003, 60, p. 1085–1095. Dostupný na www.sciencedirect.com.
8. **Ducros, V., Demuth, K., Sauvant, M. P. et al.** Methods for homocysteine analysis and biological relevance of the results. *J. Chromatography B*, 2002, 781, p. 207–226.
9. **Hyánek, J.** Diferenciace mírných hyperhomocysteinemií a jejich diagnostický význam u dětí z rizikových rodin pro kardiovaskulární onemocnění. Grant Nemocnice na Homolce.
10. **Mihnuti, G., Piana, A., Armani, U. et al.** Determination of plasma and serum homocysteine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatography A*, 1998, 828, p. 401–405.
11. **Chatko, G., Bald, F.** Determination of different species of homocysteine in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatography*, 2002, 949, p. 141–151.
12. **Seong Ho Kang, Jong-Won Kim, Doo Soo Chung** Determination of homocysteine and other thiols in human plasma by capillary electrophoresis. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 1997, 15, p. 1435–1441.
13. **Cassé, E., Terrier, R., Champagne, S. et al.** Quantitation of homocysteine in human plasma by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection. *J. Chromat. A*, 1998, 817, p. 181–185.
14. **Zhang, D., Zhang, M., Liu, Z. et al.** Highly selective colorimetric sensor for cysteine and homocysteine based on azo derivatives. *Tetrahedron Letters*, 2006, 47, p. 70093–7096. Dostupné na www.sciencedirect.com.
15. **Proksch, B., Jelesnianski, S., Oberrauch, W. et al.** Adaptation of a high-performance liquid chromatographic method for quantitative determination of homocysteine in urine. *J. Chromat. B*, 2005, 828, p. 122–125.
16. **Melnyk, S., Pogribna, M., Pogribny, I. et al.** A new HPLC Method for the simultaneous determination of oxidized and reduced plasma amino thiols using coulometric electrochemical detection. *J. Nutr. Biochem.*, 1999, 10, p. 490–497.
17. **Frick, B., Schrocksnadel, K., Neurauter, G. et al.** Rapid measurement of total plasma homocysteine by HPLC. *Clin. Chimica Acta*, 2003, 331, p. 19–23.
18. **Kun, J., Gotting, Ch., Kleesiek, K.** Rapid micro-scale assay for homocysteine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin. Biochemistry*, 2006, 39, p. 164–166.
19. **Theoret, Y., Rivard, G. E., Rivard, C. I. et al.** Stability of total plasma homocysteine in perinatology. *Clinica Chimica Acta*, 2002, 319, p. 63–66.
20. **Hillemacher, T., Reulbach, U., Bayerlein, K. et al.** Plasma homocysteine concentrations do not influence craving in alcohol withdrawal. *Alcohol*, 2004, 34, p. 211–215.
21. **Cobbaert, Ch., Arentsen, J., C., Mulder, P. et al.** Significance of various parameters derived from biological variability of lipoprotein(a), homocysteine, cysteine and total antioxidant status. *Clin. Chem.*, 1997, 43, 10, p. 1958–1964.
22. **Caliskan, S., Kuralay, F., Onvural, B.** Effect of anticoagulants on plasma homocysteine determination. *Clin. Chimica Acta*, 2001, 309, p. 53–56.
23. **Bisse, E., Epting, T., Kogel, G. et al.** Clinical validation of a new blood collection tube for the accuracy of total homocysteine measurement by different methods. *Clin. Biochem.*, 2007, 40, p. 739–743.
24. **Huijgen, H. J., Tegelaers, P. W., Schoenmakers, Ch. et al.** Multicenter analytical evaluation of an enzymatic method for the measurement of plasma homocysteine and comparison with HPLC and immunochemistry. *Clin. Chem.*, 2004, 50, No. 5, p. 937–940, Technical briefs.
25. **Thirup, P., Ekelund, S.** Day-to-day, postprandial and orthostatic variation of total plasma homocysteine. *Clin. Chem.*, 1999, 45, No. 8, p. 1280–1283, Technical briefs.
26. **McKinley, M. C., Strain, J. J., McPartlin, J. et al.** Plasma homocysteine is not subject to seasonal variation. *Clin. Chem.*, 2001, 47, 8, p. 1430–1436.
27. **Fokkema, M. R., Gilissen, M. F., van Doormaal, J. et al.** Fasting vs nonfasting plasma homocysteine concentrations for diagnosis of hyperhomocysteinemia. *Clin. Chem.*, 2003, 49, No. 5, p. 818–821, Technical Briefs.

Do redakce došlo 17.3.2009

Adresa pro korespondenci:

Ing. Ladislava Dubská

Oddělení klinické biochemie, hematologie a imunologie

Nemocnice Na Homolce

Roentgenova 2

150 30 Praha 5

e-mail: ladislava.dubska@homolka.cz