

Hyperhomocysteinémie – nepoznané, nepoznatelné a zanedbané (homocystein – užitečný marker methylačních poruch z deficitu holotranskobalaminu a folátu)

Hyánek J., Dubská L., Pejznochová H., Pehal F., Vaingátová S., Martiníková V.

Metabolická ambulance a Oddělení klinické biochemie, hematologie a imunologie Nemocnice Na Homolce, Praha

SOUHRN

Ani po 35 letech úporných diskusí není možno prohlásit významně zvýšenou hladinu homocysteinu v krvi – hyperhomocysteinémii – za neškodnou metabolickou zajímavost bez patognomonických účinků na methylační pochody v organismu. Každé zvýšení > 30 $\mu\text{mol/l}$ je třeba analyzovat, zajistit doplňující diferenciálně diagnostická vyšetření (vitaminy skupiny B, hemokoagulační vyšetření, methylmalonát, tromboembolické mutace aj.), protože stále zůstává významným diagnostickým markerem deficitu vitaminů, výživových, kostních, nádorových, perikonceptčních, cévních, ledvinových onemocnění a hemokoagulačních či dědičných metabolických poruch. Doložené kazuistiky vyšetřovaných pacientů s vysokým homocysteinem v metabolické ambulanci jsou toho jasným dokladem.

Klíčová slova: homocystein, hyperhomocysteinémie, vitamin B₁₂, folát, metylace.

SUMMARY

Hyánek J., Dubská L., Pejznochová H., Pehal F., Vaingátová S., Martiníková V.: Hyperhomocysteinemia – unrecognized and neglected (Homocysteine – a useful marker of methylation disorders from deficit of holotranscobalamin and folate)

Even after 35 years of persistent discussions the significantly elevated blood level of homocysteine – hyperhomocysteinemia – cannot be considered as a harmless metabolic curiosity without pathological consequences for methylation processes in the organism. Each elevation > 30 $\mu\text{mol/l}$ should be analyzed, provide differential diagnostic examinations (vitamins of the B group, hemocoagulation examination, methylmalonate, thromboembolic mutations etc.) as it still remains a significant diagnostic marker of the deficits of vitamins, nutrition, osseous, tumorous, peri conceptual, vascular, and renal diseases as well as hemocoagulation or hereditary metabolic diseases. Documented case reports of examined patients with a high homocysteine in the out patient setting demonstrate in clearly.

Key words: homocysteine, hyperhomocysteinemia, B₁₂ vitamin, folate, methylation.

Úvod

Jakmile závěry norské studie NORVIT (2005) naznačovaly, že snižování zvýšené hladiny celkového homocysteinu (tHcy) – u mírné hyperhomocysteinémie (HHC) podáváním vitaminů skupiny B (VitB) nepůsobí žádné efektivní snížení výskytu kardiovaskulárních onemocnění (KVO), přestává „módní“ zájem kardiologů a ostatních o tuto metabolickou zvláštnost [Lippi, 2007]. Stále však platí, že zvýšený tHcy provází zvýšenou úmrtnost na KVO (studie Bostoma, Stehouwera, Ridkera, Tailora z let 1997–2001), ale nedovedeme vysvětlit, proč jeho snižování podáním VitB není již u vyvinutých KVO efektivní [Refsumová, 2007]. Zvýšená hladina tHcy však zůstává patognomonická pro rozvoj i dalších onemocnění: chronické ledvinové selhání, osteodystrofie, perikonceptční patologie, poruchy výživy aj. Hcy je snadno stanovitelný a přímo koreluje s hladinou ještě nebezpečnějšího metabolitu S-adenosylhomocysteinu (SAH) a nejvýznamnějšího inhibitoru metylace, který je pro svou 500krát nižší koncentraci obtížně dostupný, a tak pomocí tHcy můžeme pohodlně sledovat úroveň methylačních pochodů v organismu.

Je však stanovení tHcy jen zajímavé „opentlování chorobopisu“, nebo je diagnosticky přínosné? Neindikovat a nevyšetřovat tHcy, aby zmizel, jako zmizely překonané klinicko-biochemické markery jako např. Weltman, alkalická rezerva, CKMB? Jsou však laboratorní

markery, které „neuvadají“, přestože nemají orgánovou nebo diagnostickou specifitu (sedimentace, leukocytóza, CRP) – protože nemáme nic lepšího, čím bychom je nahradili. Do této kategorie můžeme zařadit i stanovení tHcy. Vzdělaný a zvědavý klinický biochemik vidí v HHC diagnostický problém, který je třeba dešifrovat. Není totiž orgán, u jehož patologických změn bychom zvýšený Hcy za 30 let zkušeností nenalezli. A podle toho, jak je tento biochemik snaživý, tolik se mu tohoto diagnostického poznání podaří dosáhnout. Výzkumy zatím ukázaly, že tHcy je dobrým markerem hypomethylace DNA – rozhodující epigenetické modifikace genomu, která snižuje genovou expresi mnoha metabolických chorob včetně onkogenní aktivity [Stanger, 2003, Loscalzo, 2006].

Tento kompilát má být pokusem obhájit na základě vlastních zkušeností diagnostickou cenu tHcy v rutinní klinicko-biochemické laboratoři. I když není Hcy asi ten hlavní metabolický aktér, přesto zůstává dobrým metabolickým markerem. Dokládáme to 15 kazuistikami z denního provozu, které nás o užitečnosti a významu stanovení tHcy neustále přesvědčují. Jestliže byl studií NORVIT zpochybněn význam mírné HHC pro diagnostiku rizika KVO, tak to neoslabuje diagnostickou cenu výrazně zvýšeného tHcy. Nikdo vzdělaný nepochybuje, že tHcy > 50 $\mu\text{mol/l}$, nebo dokonce > 100 $\mu\text{mol/l}$, který se díky dostupnější metodice stanovení objevuje stále častěji, už vyžaduje další metabolické řešení nebo alespoň symptomatickou léčbu.

Rozdělení, druhy a výskyt HHC

HHC znamená každé zvýšení hladiny tHcy nad referenční hodnoty a ty se dosti značně liší v závislosti na věku, pohlaví, výživě, etnické oblasti aj. Koncem minulého století se považovala za horní hranici HHC hladina tHcy 12 $\mu\text{mol/l}$, což je dnes hodnota sotva vhodná pro racionální pojednání. Nejnižší hodnoty tHcy nacházíme u fyziologické gravidity, děti mají nižší hodnoty než dospělí a nejvyšší fyziologické zvýšení mají senioři nad 65 let věku. Uplatňuje se však celá řada fyziologických či patologických vlivů, jako např. nesprávná výživa (vegani a vegetariáni mají vyšší hodnoty z deficitu vitamínu B₁₂), podvýživa a kachexie, stejně jako svalová zátěž – maratonci mají vysoké hladiny. Týdenní suplementace stravou bohatou na metionin však nevyvolá u zdravých zvýšení Hcy v krvi pouze u T > T-homozygotů genového polymorfismu MTHFR 677 (T > T); ve druhé polovině menstruačního cyklu se dají prokázat zvýšené hladiny. Hormonální produkce určuje zřejmě vyšší hodnoty u mužů (průměr 15 $\mu\text{mol/l}$) než u žen vlivem estrogenů (průměr 12 $\mu\text{mol/l}$). Ostatní zvýšení už má příčiny v patologických změnách organismu jako např. kouření, které Hcy zvyšují hlavně u T > T-polymorfismu nebo při deficitu betainu. Pro správné posouzení klinické významnosti hladiny Hcy je ještě třeba znát funkci ledvin, alespoň kreatininemii a hladiny kritických vitaminů: B₁₂, B₆ a folátu, eventuálně B₂, způsob výživy – etnickou zvláštnost aj. [Carmel, 2001].

Kang ve své práci z roku 1996 doporučil častěji nalézané HHC rozdělovat do tří kategorií:

- skupinu mírného zvýšeného tHcy nad referenční hodnoty do 30 $\mu\text{mol/l}$ představuje tzv. mírná hyperhomocysteinémie. Dnes je to ta nejvíce diskutovaná, přeceňovaná a zprofanovaná HHC, u které nacházíme jen problematické cévní změny; tyto HHC jsou nejsnáze ovlivnitelné vitaminy, diagnosticky jsou nejméně významné a jejich přecenění v prognostickém významu u KVO nejvíce uškodilo u nás i v zahraničí [Bostom, 1999]. Například nejvíce citovaná Framinghamská studie o pozitivním významu HHC jako rizikového faktoru pro KVO dokonce považuje za zvýšení už hodnoty > 11, 4 $\mu\text{mol/l}$ (1996);
- střední HHC 30–50 $\mu\text{mol/l}$ zůstává i dnes nejproblematičtější, s možností různé etiologie a patognomické působnosti, jež už nelze u pacientů přehlížet;
- HHC s nejvyšší hladinou tHcy > 100 $\mu\text{mol/l}$ zůstávala v minulosti vyhrazena pouze pro klasickou homocystinurii (KH), ale později se objevily studie pacientů s těmito hodnotami např. u ledvinného selhání, vitaminového deficitu B₁₂ či folátu ze získaných nebo dědičných příčin.

Podle našich 30letých zkušeností nacházíme HHC podle častosti výskytu především mezi seniory, dále u chronického ledvinného selhání, u deficitů vitaminů skupiny B, aterosklerózy provázející všechny druhy KVO, tromboembolie, arteriální trombózy, dále u vegetariánství, kostní dysplazie a osteodystrofie, dědičných metabolických chorob, vrozených defektů neurální trubice (NTD), gestózy, placentární abrupce, chronických

střevních onemocnění, malnutrice a také u některých endokrinních a nádorových onemocnění. HHC je nedílnou součástí dlouhé řady lékových interakcí (viz metodika). Některé interakce se dají využívat pro monitorování účinku protinádorové, proticholesterolové léčby či substituce [Valík, 2006; Štulc, 2005; Zeman, 2006]. Kauzální příčiny HHC v populaci pacientů z Nemocnice na Homolce, vyšetřovaných za posledních 15 let rutinně na tHcy, ukazuje tabulka 1. Dominují zde vitaminové deficity před chronickým ledvinným selháním (ChLS).

Table 1. Frequency and etiology of hyperhomocysteinemias detected in patients followed in Hospital Homolka oriented on cardiovascular diseases

Type of Hyperhomocysteinemia	Frequency
Mild (Men > 15 $\mu\text{mol/l}$, Women > 12 $\mu\text{mol/l}$)	1:52
Moderate (30-100 $\mu\text{mol/l}$)	1:390
Severe (> 100 $\mu\text{mol/l}$)	1:1940
B-12 Deficiency	47%
Renal Failure	32%
MTHFR and Folate Deficiency	18%
CBS Deficiency	1%
Liver Failure	2%

Základní fyziologie a patofyziologie HHC

Homocystein (Hcy) má molekulovou hmotnost 135, 2, je to 2-amino-4-merkaptobutanová kyselina (IUPAC); neesenciální 4-uhlíkatá aminokyselina, jejíž další methylenová skupina (-CH₂-) dovoluje vytvářet i kruhovou strukturu homocystein-thiolaktonu. Vysoká reaktivnost této molekuly (thiolace, homocysteinilace) však nedovoluje tvorbu stabilních peptidových vazeb; bílkovina je nestabilní, s tendencí ke štěpení a vysoké reaktivitě především k lysinovým a cysteinovým zbytkům. Na zvířeti a/nebo ve tkáňových kulturách byl toxický účinek zvýšeného Hcy-thiolaktonu prokázán i v koncentracích vyskytujících se v humánní patologii. Podle Hcy-thiolaktonové hypotézy Jakubowskiho (2000S) je část Hcy metabolizována methionyl tRNA syntetázou na Hcy-thiolakton – jako chybná reakce v syntéze proteinu, kde je Hcy nesprávně substituován za Met a tento špatný začátek syntézy ve svém důsledku vede ke zvýšené homocysteinylaci amidovou vazbou na proteinlysinové zbytky. Zvýšený Hcy inhibuje polymerizaci kolagenu z monomerových fibril na polymer účinkem lysyl-oxidázy, aby se kolagen síťoval (crosslinking). Monomer se hromadí a vyvolává proliferaci buněk hladkého svalstva v cévách, nekvalitního kolagenu a elastinu a je důvodem předčasných kostních a cévních změn [Myers, 1985; Lubec, 1996]. Jacobsen (2007S) prokázal stejné změny při „homocysteinylaci“ albuminu, metallothioneinu, fibronektinu, alfa-2-makroglobulinu aj. a při strukturálních studiích

GC/MS našel redukcí disulfidických můstků a tím změněných vlastností bílkovin. Sumárním výsledkem jsou patofyziologické deficity imunitní aktivity, trombogeneze a kolagenních struktur v různých orgánech.

Hcy se nezískává potravou, nýbrž vzniká štěpením esenciálního methioninu (Met) z bílkovin v „methioninovém cyklu“ za účinku celé plejády enzymů, koenzymů a substrátů a jako potenciálně „toxická“ látka je z organismu velmi rychle eliminována (obr. 1). Syntéza Hcy pokračuje přes S-adenosylmethionin (SAM), který je největším zdrojem methylových skupin v lidském organismu pro methylační reakce. SAM se demethyluje na S-adenosylhomocystein (SAH) a jeho hydrolýzou vzniká Hcy. Reakce hydrolázy SAH (SAHH) je obousměrná a za normálních fyziologických podmínek preferuje syntézu SAH, a tak kontinuální hydrolýza SAH rozhoduje o udržení správné úrovně „život regulující

methylace“ v organismu příznivé pro DNA, RNA, proteiny, fosfolipidy, histony, neurotransmitery na synapsích, polyaminy aj. Při zpomalení cyklu nastává hypomethylace a jejím následkem se rekrutuje celá plejáda genetických a epigenetických onemocnění s odlišnými klinickými projevy stimulovanými vitamínovým deficitem především folátu a vitamínu B₁₂ a dále polymorfismem genů MTHFR, které se manifestují až v proteomu [Finkelstein, 1990; Carmel, 2001]. Proti remethylaci, která probíhá ve všech tělních buňkách, je transulfurace omezena pouze na játrní, ledvinné, pankreatické a střevní buňky a jenom játra dovedou dostatečně syntetizovat SAM při dostatku Met. Jenom tkáň s aktivní CBS jsou pohotově responzivní na regulační pochody z nahromadění SAH a Hcy [Finkelstein, 2007S; Rosenová, 2007S]. Ostatní tkáň, které tuto aktivitu nemají (např. endoteliální buňky), jsou proto více vystaveny toxickým účinkům zvýšeného SAH a Hcy.

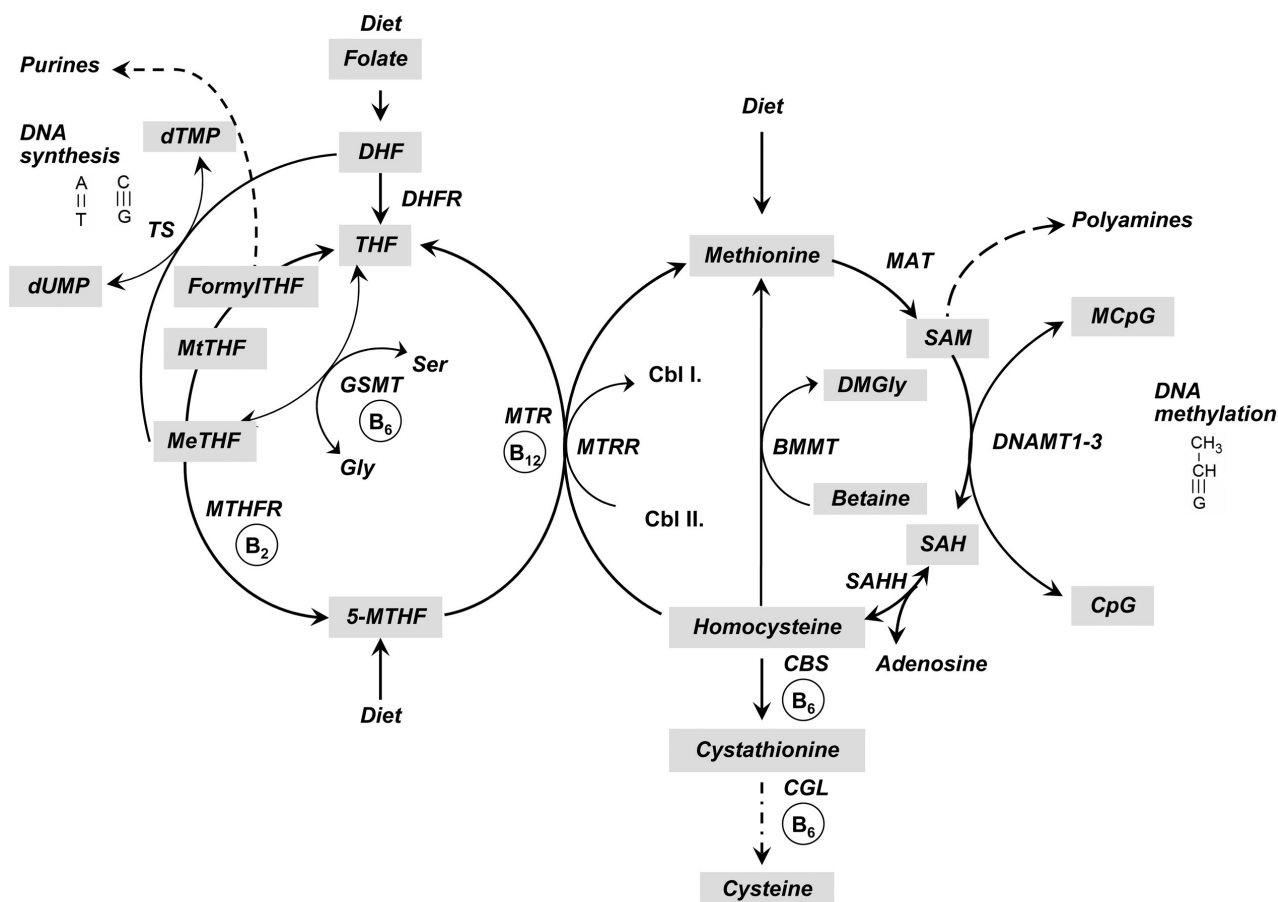


Fig. 1. Simplified Scheme of Methionine Cycle, One-Carbon Metabolites Cycle and Methylation of DNA and CpG in Humans

Abbreviations: BMMT – betaine methionine methyltransferase, CBS – cystathionine-beta-synthase, CGL – cystathionine-gama-lyase, DHF – dihydrofolate, DHFR – dihydrofolate reductase, DMGly – dimethylglycine, DNAMT – DNA methyltransferases, dUMP – deoxyuridine monophosphate, dTMP – deoxythymidine monophosphate, FormylTHF – formyltetrahydrofolate, GSMT – glycin/serin methyltransferase, MeTHF – methylenetetrahydrofolate, MtTHF – methenyltetrahydrofolate, 5-MTHF-5 – methyltetrahydrofolate, MTHFR – methyltetrahydrofolate reductase, MTR – methionine synthase, MTRR – methionine synthase reductase, SAM – S-adenosylmethionine, SAH – S-adenosylhomocysteine, SAHH – S-adenosylhomocysteine hydrolyse, THF – tetrahydrofolate, TS – thymidilate synthase

SAH se relativně pomalu hydrolyzuje a v mezičase inhibuje methyltransferázy v buňce, tím zpomaluje metylaci DNA, RNA, syntézu kreatinu a dalších. Metabolicky důležitějších methyltransferáz, které jsou více SAH (a méně Hcy) inhibovány, je kolem stovky; u lidí se nejvíce diskutuje o DNA methyltransferáze 1-3 [Liu, 2008]. Pro efektivní metylaci je základním požadavkem dostatek aktivního folátu: 5-methyltetrahydrofolátu (5-MTHF). Je to nejdůležitější forma folátu pro člověka a dosahuje v plazmě zhruba 7–25 nmol/l; z plazmy se dostává do buněk přes řadu membránových transportérů a v buňkách dosahuje mikromolárních koncentrací. Tetrahydrofolát (THF) z buněk nebo nově vznikající z 5, 10-methylen THF (MeTHF) musí být methylenetetrahydrofolát reduktázou (MTHFR) zredukován na 5-MTHF. Na redukováný THF se změní, když poskytne methylovou skupinu do složitě dvojice reakcí methionin-syntázy (MTR) (B -dependentní) (aktivní Cbl), ta je udržována v aktivním stavu pomocí dalšího enzymového systému reduktázy – methioninsyntázy (MTRR) a vyžadující dostatek aktivního kobalaminu (Cbl) – viz obr. 1. Kobalťový kationt se totiž v každém cyklu MS oxiduje a musí být znova redukován právě účinkem MTRR. Dvojitý enzymový systém přemění tak ubikviterní a potenciálně toxický metabolit Hcy na esenciální Met. Deficit Cbl z jakýchkoliv příčin způsobí tzv. methylovou past (methyl trap) a nedovolí demethylaci 5-MTHF, i když je ho ve tkáních dostatek. V této formě je v plazmě i erytrocytech ve vysoké koncentraci, ale není využitelný a vede nakonec po různé dlouhé době metabolického působení k megaloblastické perniciózní anémii z deficitu thymidilátsyntázy. Netvoří se totiž dostatek MeTHF, aby z něj vznikal dihydrofolát (DHF), a tak se dUMP nemění na dTMP – místo thyminu vstupuje do molekuly DNA uracil, což je příčinou dalších mutací a katastrofických cyklů DNA s následkem poruchy v tvorbě bílkovin. Tento dlouhý výklad má sloužit k lepšímu pochopení klíčového významu nedostatku jak vitamínu B₁₂, tak folátu při patogenezi HHC a následně hypomethylaci s metabolickým epigenetickým dopadem.

Jako substrát a donátor methylové skupiny slouží výhradně 5-MTHF připravovaný THF ve všech tkáních přítomnou (MTHFR) (B -dependentní), která je důležitým spojovacím článkem metabolismu Met a jednoduhlíkatých zbytků [Ueland, 2007] – viz obr. 1. Její nejvýznamnější genové mutace C677T a A1298G způsobují termální instabilitu enzymu, zhoršují vazbu na koenzym, snižují jeho aktivitu, zvyšují hladinu tHcy v krvi homozygotů T > T o 2,5 μmol a jsou tak nejčastější příčinou mírných hyperhomocysteinémií. Zvýšená hladina plazmatického folátu tento enzymový deficit odstraňuje. Výskyt homozygotů T > T činí v severoamerické a evropské populaci zhruba 10–12 %, v židovské populaci 44,7 %. U nás však v populaci postoperačních pacientů z kardiiovaskulárních oddělení Nemocnice na Homolce dosahuje až 37 %. V norské populaci pacientů se zvýšeným tHcy > 40 μmol/l má tuto mutaci dokonce 75 %. V indické populaci, deficitní na vitamín B₁₂, jsou hladiny tHcy už u zdravých vyšší (průměr 20 μmol/l) a výskyt mutace je častější. Vysvětlení, proč je tato mutace u bělohů relativně častá, se nabízí – snad chrání před karcinogenezí z deficitu folátů, kdy se vytváří více uracilu než thyminu [Tsai, 1996; Rady, 1999; Orendáč a Kožich, 1999; Wilcken, 1997; Hyánek, 2000]. Významnost ostatních enzymových systémů důležitých pro remethylační a transulfurační metabolismus především CBS (genový polymorfismus 844ins68), MS, MRR a dalších studovali pečlivě Kožich, Kraus et al. (1995) a neprokázali větší významnou spojitost mezi ATS a HHC.

HHC z deficitu Cbl je provázena výraznou hypermethylmalonémií. Cbl tentokrát jako adenosylCbl je důležitým kofaktorem další kritické metabolické reakce vedené methylmalonyl-CoA-mutázou, která přeměňuje methylmalonylCoA na sukcinylCoA. Stanovení kyseliny methylmalonové (MMA) je tak při diferencování HHC diagnosticky velice významné a zatím málo využívané.

HHC a poruchy methylace v onkogenezi

Deficit folátů představuje základní příčinu vývoje poruch methylace. Kromě adeninu, cytosinu, guaninu a thyminu je genomová informace fenotypu ještě ovlivňována distribucí 5-methylcytosinu v somatických

buňkách. Tento metabolit je dosti stabilní, aby přečkal meiózu a ovlivnil další genetické pochody u člověka [Laird, 2003].

DNA methylace cytosinu, lokalizovaná do CpG dinukleotidových sekvencí (viz obr. 1), je hlavní epigenetický modifikátor genomu, který má schopnost inhibovat „umlčení“ (silence) genové exprese, udržova integritu a stabilitu DNA, instalovat mutace a zasahovat až do proteinu [Doothie, 2004]. Hypermethylace je zvýšená u seniorů a stářím se dále zvyšuje. Celkový obsah 5-methylcytosinu je závislý na přísunu folátu z potravy, vhodném genovém polymorfismu a enzymech zajišťujících jeho metabolismus. Prakticky však o metylaci rozhoduje SAM/SAH kvocient. Nadměrné preventivní podávání kyseliny listové ve velkých dávkách, jakého jsme svědky v posledních letech, budí obavy u seniorů s potenciální malignitou. Je známo, že kyselina listová urychluje růst nádorových buněk – na tomto pozorování spočívá přece objev profesorů S. Farbera a Folch-Pi z Harvardu: aminomethylpterin – metotrexát = aminoskupinou doplněná a methylovaná kyselina listová. Rozsáhlé epidemiologické studie v USA, Nizozemí a Švédsku dokazují nepřímou závislost mezi folátem a rizikem nejčastěji sledovaným kolorektálním karcinomem (CRC); v Ontariu našli dokonce snížení výskytu neuroblastomu ve folátem fortifikované populaci, ale o skutečném výskytu CRC není spolehlivě rozhodnuto. Na existující prekancerózy či neodhalené malignity může mít fortifikace folátem nepříznivý vliv [French, 2003; Kim, 2004].

Pro využití plazmatické hladiny tHcy při monitorování protinádorové léčby metotrexátem a včasnou registraci nežádoucích toxických účinků připravili dokonalý přehled Valík et al. (2005, 2006)

Kazuistika 1

36letá zdravotní sestra z chirurgie si nechává v rámci lipidové prevence vyšetřit celkový cholesterol (CCh) a tHcy; CCh 7,9 mmol/l a tHcy > 100 μmol/l; doplňující vyšetření vitamínu B₁₂ >75 pmol/l a holotranskobalamin (HoTC) neměřitelný; MCV 110 zřetelná makrocytární anémie. Hb snížený, plazmatické Fe 7 μmol/l; podrobnější vyšetření potvrzuje nálezy, ale CDT 7%. Doporučena fibroskopie, při které byl nalezen pokročilý ca žaludku; odperována.

Kazuistika 2

38letý řidič, úspěšně operovaný pro astrocytom, v pooperačním průběhu na JIP se stav komplikuje hlubokou žilní trombózou. Laboratorní vyšetření kromě vysokého D-dimeru ukazuje tHcy 97 μmol/l, TT-homozygot MTHFR 677, neměřitelný folát, HoTC 8 pmol/l, ostatní TEM negativní. Léčba doplněna o suplementaci folát a Milgama do normalizace hladin v krvi.

HHC a ledvinné selhání

Více než 50 % pacientů s ChLS a 10 % pacientů po transplantaci ledvin je provázeno 2–3krát vyšším tHcy proti normě, který jen částečně reaguje na hemodialý-

zu a suplementaci vitamínem B₁₂ a folátem. Zatímco kreatinin, B₁₂, CRP i folát se po dialýze snižují, tHcy nikoliv a jeho clearance zůstává nízká. U pacientů s T > T polymorfismem nalézáme nejvyšší hodnoty tHcy (50–100 μmol/l) [Teplan, Svoboda, 2005; Zounglas, 2005]. Příčina této HHC není etiologicky vysvětlena. Hcy vzniká při syntéze kreatinu jako vedlejší produkt Hcy, který je nedostatečně metabolizován v methioninovém cyklu, zvyšuje expresi transkripčního faktoru pro zánětlivé cytokiny, čímž přispívá k poškození ledvinových cév. Závislost mezi zvýšenou hladinou tHcy a úmrtností je významná, ale není lineární jako např. u kreatininémie nebo CRP. HHC při ChLS byla prokázána už v pionýrské studii u framighamských pacientů (1999) a byla příčinou velkého „homocysteinového boomu“ [Selhub, Bostom, 1995; Chadeaux, 1990; Ubbink, 1997]. Průměrná hladina tHcy dialyzovaných pacientů v NNH kolísá kolem 30 μmol/l, ale vyskytly se už i hodnoty > 100 μmol/l, častěji u pacientů s polytraumatem, akutní ledvinovou insuficiencí na ARO. Diabetičtí pacienti s ChLS nemají HHC tak výraznou, jaká by insuficienci ledvin odpovídala [Zeman, 2007S]. 75% Hcy je kovalentně vázán disulfidickou vazbou na albumin, čehož využili kanadští autoři objevem léku s thiolovou skupinou k navázání vysokého Hcy a následného snižování při hemodialýze. Podávaný preparát „Mesna“ snížil Hcy až o 68 % [Cutler et al., 2007S].

U ChLS je asymetrický dimethylarginin (ADMA) zvýšený stejně jako Hcy a přesněji určuje kardiovaskulární mortalitu než Hcy [Meininger, 2007]. Mechanismus patologického účinku ADMA na endoteliální změny a karotidální ztlustění intimy je odlišný a více specifický než Hcy [Guldener, 2007S]. Podáváním Vit B se tHcy snižuje, zatímco ADMA ne, jejich účinek na rozvoj aterosklerotických změn u ChLS je zřejmě rozdílný (podrobněji v publikacích Racek, Šedivá, Rajdl z let 2005, 2006 a 2007).

HHC – kardiovaskulární onemocnění a tromboembolie

Neléčení pacienti s klasickou homocystinurií, objevenou 1962, umírali do 30 let věku na tromboembolické komplikace, odtud vyplynul kauzální zájem o HHC hned dvou pracovních skupin od 70. let minulého století (Wilckenova u homocystinuriků a McCulleyho u pacientů z deficitu vitamínu B₁₂). Obrovskou vlnu zájmu o HHC způsobily sugestivní práce amerických autorů o efektivitě snižování Hcy opřené o důkazy ze seniorské framighamské populace (1999) i studie z mladší populace lékařů či zdravotních sester, které „dokazovaly“ jasný vztah mezi mírně zvýšenou hladinou Hcy a intenzitou aterosklerotických změn, počtem I. M., tromboembolií či mozkových příhod. Dominoval i jasný „léčebný efekt“ po suplementaci VitB [Stampfer, 1992; Selhub, 1995; Bostom, 1995; Malinow, 1994; Verhoef, 1997]. Když jsme se pokoušeli jejich nálezy zopakovat na souboru 1000 pacientů s bypasem, nepodařilo se závislost mezi hladinou tHcy a závažností cévní obliterace prokázat [Hyánek, 2005].

V USA byla dokonce – po dobrých zkušenostech s podáváním folátu na snížení rozštěpů páteře – doporučeno AHA rozšířit tuto úspěšnou prevenci, a to nejenom folátem (0,1 mg), ale také vitamínem B₁₂ (400 μg) a 50 mg B₆, která měla za cíl snížit počet infarktů a tromboembolií.

Po 10 letech se však léčebný efekt, i přes snížení tHcy vitamíny, nenalézal, až konečně retrospektivní studie projektu NORVIT jej zcela zpochybnila [Bona, 2006; Albert, 2008]. Ke stejnému závěru došli i další studie: VISP, HOPE2, FACS, WENBIT. Vyčkáváme na výsledky právě probíhající metaanalýzy Clarke et al. (2007S) ze 12 studií, která by měla definitivně rozhodnout o významu snižování tHcy v sekundární prevenci. Studie HOPE2 však potvrzuje 25% snížení u iktů, což dokladuje různou etiopatogenezi. Zjevně chybí výsledky prospektivních studií ve snižování Hcy v rizikové populaci, dříve než se typické endoteliální změny vyvinou. Hcy se svou reaktivní a destruktivní povahou a cíleným účinkem na 3 hlavní strukturální složky cévní stěny (elastin, kolagen a glykosaminoglykany) přece nemůže po 20–30 letech působení zůstat bez následků. HHC u zdravých dobrovolníků, vyvolaná podáváním L-Met, způsobila u homozygotů T>T zvýšení PAI-1 a snížení aktivity tPA. Heijer et al. (VITRO Trial Study) nenalezli snížení výskytu venózních trombóz při léčbě VitB (2007S), i když podání vitamínů snížilo tHcy. Přitom hyperhomocysteinemická populace pacientů v Nizozemí má delší trombinový čas, nižší tvorbu plasminu a zvýšenou hladinu PAI-1 (2007S). Etiologickou spojitost vysoké hladiny Lp(a) a HHC dokazují Chapman et al. (1994) takto: zvýšení tHcy > 20 μmol/l enzymaticky intervenuje na cringlu Lp(a) tak, že jej připodobní cringlu plasminogenu; v kompetici s ním je aktivita PAI-1 snížena, což zpomaluje aktivní fibrinolýzu a vede k trombóze. Celá třetina pozitivních nálezů trombembolických mutací (TEN) je provázena HHC [Hyánek, 2007].

Kazuistika 3

35letý zdravý kuřák bez rodinné zátěže pro KVO je přivezen na koronární jednotku (KJ) s typickým infarktem myokardu; klinický, laboratorní i EEG nález souhlasný, provedena PTCA pro uzávěr RIA, založeny stenty. Nečekaně hladina tHcy > 100 μmol/l, doplněno vyšetření HoloTC, který je neměřitelný; folát 6,0 nmol/l, Ery 2,7 T/l, MCV 123 μm, CCh 3,4 mmol/l, Fe 12,6 μmol/l, MMA > 75 μmol/l PPPB negativní, fibroskopický nález žaludku negativní. Pacient kromě kardiologické léčby a warfarinizace suplementován perorálně CNCbl (1000 μg/d) a folátem (10 mg/t) do normalizace všech laboratorních parametrů.

Kazuistika 4

Zdravý pacient-tělocvikář s pozitivní RA pro KVO a s tromboembolií u sourozence, pyknický typ byl přivezen na KJ s QI. M. s typickými kardiologickými příznaky, laboratorním i EEG nálezem; provedena PTCA pro uzávěr RIA, warfarinizován; tHcy > 100 μmol/l, opakovaně tHcy vyšetření – 220 μmol/l, B₁₂ 285 pmol/l, folát 23 nmol/; CCh 3,5 mmol/l. Met 344 μmol/l.

Ostatní laboratorní nálezy negativní. RTG kostí: typické změny dlouhých kostí, páteře i kalvy pro klasickou homocystinurii. Molekulárně genetické vyšetření CBS z fibroblastů – typická 833T > C mutace-pyridoxin senzitivní (Doc. MUDr. Kožich, CSc., ÚDMP). Výrazná refrakční vada a při dohledání zdravotnické dokumentace u dětského lékaře byl v 15 letech doporučen k vyloučení m. Marfan, což nebylo provedeno. Kromě kardiologické léčby je pacient léčen megadávkami vitamínu B₆ s normalizací laboratorního nálezu.

Kazuistika 5

42letý sportovec bez RA zátěže pro KVO s CCh 4,8 mmol/l je po několikadenní stupňující se dušnosti dovezen na KJ s podezřením na IM, který se laboratorně ani klinicky a EEG nepotvrzuje; plicní hypertenze přítomna; provedena PTCA s negativním výsledkem, CT – angio: masivní embolizace obou ramen *art. pulmonalis*; následuje úspěšná trombolýza warfarinizace; MCV 115 μm, Ery 3,8 T/l. Ale tHcy > 50 μmol/l – opakovaně 74 μmol/l; celkový B₁₂ < 75 pmol/l, MMA > 75 μmol/l; v rekonvalescenci provedena fibroskopie s nálezem atrofické gastritidy; Schillingův test < 5%. Suplementován im. CNCbl, po normalizaci perorální léčba kombinací OHcbl a CNCbl.

Za uplynulých 10 let registrujeme už 17 pacientů s „perniciózní anémií“ dosud nepoznanou a detekovanou až na KJ s akutní koronární příhodou jen díky nálezu vysokého tHcy.

Kazuistika 6

U 60leté pacientky po hluboké žilní trombóze s familiární hypercholesterolémií a vysokým rizikem KVO byla v rámci selektivního screeningu nalezena hladina Hcy 39 μmol/l, doporučeno metabolické vyšetření a nalezena hladina HoloTC 8 pmol, MCV 98 μm bez anémie, heterozygotka pro MTHFR 1298, pozitivní protilátky proti IF, PPPB pozitivní a genový deficit protrombinu II (G20210A); fibroskopický nález žaludku negativní, MMA 56 μmol/l; folát v normě; pacientka suplementována OHcb. Stejná mutace i u zdravé dcery a syna.

Kazuistika 7

54letý pacient, který přežil embolii plicnice, z velmi rizikové rodiny pro KVO, přichází k vyšetření tHcy a nalézáme hodnotu > 100 μmol/l, MMA > 75 μmol, celkový vitamin B₁₂ < 75 pmol/l, HoTC neměřitelný, fibroskopie žaludku s negativním nálezem, PPPB negativní, antiIF negativní, MCV 102 μm. Pacient suplementován *per os* 1000 μg CNCbl/ob den do normalizace hladiny HoloT a MMA. V lipidovém spektru do půl roku po embolii nalezen vysoký LDL-cholesterol 6,5 mmol/l; apoB 1,8 g/l; Lp(a) > 1200 mg/l; apoE ¾; pacient dále léčen statiny a ezetimibem.

Kazuistika 8

20letá studentka z rizikové rodiny pro KVO ze strany obou rodičů před odletem do Austrálie vzala HAK a za týden po přiletu umírá při nedostatečné zdravotní péči na embolii plicnice, jak zjišťujeme z pitevního nálezu

zaslaného rodičům koronerem. Ten potvrzuje homozygotku Leidenské mutace. U nás pak vyšetřena matka a babička obě s pozitivním nálezem Leidenské mutace a tHcy > 50 μmol/l, homozygotky T < T, které však HAK nikdy nebraly. Vyšetření pacientky před podáním HAK mohlo v této rizikové rodině úmrtí zabránit.

Kostní onemocnění, fraktury a osteoporóza

U homocystinurických pacientů je známa zřetelná závislost mezi tHcy a typickým nálezem rybích obratlů na páteři, dlouhých kostech, kalvě aj., avšak i pacienti s mírnou HHC mají prokázanou zvýšenou fragilitu kostí o 40–200 % [Selhub, 2004, 2007S]. Framinghamská studie ukázala, že u T > T polymorfismu se zřetelně projevuje nižší folát a nižší kostní denzita; u deficitu vitamínů B₁₂ a B₆ byly také nalezeny změny minerálního metabolismu kostí, deficit vitamínu D a zhoršení kostní denzity (BMD). U seniorů s HHC z důvodu ledvinné či jaterní insuficience pozorována zvýšená fragilita už Kangem (1974), který našel deficitní síťování kolagenních vláken, což Jackson (1973) vysvětloval reakcí zvýšeného Hcy s aldehydy kolagenu a eleastinu. Lubec (1996) a McKusick v experimentu na zvířeti i ve tkáňových kulturách pak prokázali inhibici lysyl-oxidázy, která rezultuje v deficitních kolagenních vláknech kostních i pojivových tkání. Studie HOPE 2 našla u souboru pacientek s HHC Hcy bez suplementace VitB vysokou incidenci fraktur krčku. Pokud se prováděla suplementace VitB nejméně 2 roky, pozorovali pokles fraktur o 80 % [Sato, 2005; vanMeurs, 2004]. Recentní studie Hermannova (2007) opět dokazují vzrůst kostní fragility, snížení histochemické kvality kostní tkáně a inhibici biochemických pochodů kostní tkáně při síťování kolagenu v závislosti na HHC nejenom u krys, ale i v kulturách lidských osteoklastů. Hcy má silný stimulační účinek na jejich růst při zvyšující se koncentraci a podání VitB tuto stimulaci snížilo.

Kazuistika 9

15letý aktivní sportovec přichází do metabolické ambulance s mnohočetnými zlomeninami končetin a žeber při fotbale, které se stále opakují. Hladina tHcy 45 μmol/l, folát < 5 nmol/l, vitaminy B₁₂ a B₆ v normě. Homozygot T > T pro MTHFR 677; RTG nález typické změny jako u klasické homocystinurie, BMD snížena. Pacient léčen intenzivně Calciferolem a folátem do normalizace hladin. Nyní je pacient pravidelně suplementován a monitorován, bez zlomenin, i když pokračuje ve sportu. Stejný nález HHC u jeho sestry a matky, ale ty nesportují.

Patologická gravidita a perikoncepční období

Fakt, že během fyziologické gravidity jsou pozorovány nejnižší hladiny tHcy detekovatelné u člověka

(2–5 $\mu\text{mol/l}$) jasně dokazuje, že se zdravý organismus těhotné ženy této toxické substance dokonale zbavuje účinkem ovariálních i placentárních hormonů, např. zvýšením aktivity betainmethyltransferázy [Scriver, 2001]. Kolísání Hcy v průběhu gravidity je nevýrazné, proto každé jeho zvýšení během gravidity je signálem patologických změn u matky nebo intrauterinního poškození plodu. Zhoršování funkce ovarií a placenty – ať už z cévního postižení (abrupce) nebo vlivem preeklampsie či gestózy – je provázeno HHC spolu se ztluštěním intimy na cévách z hypotrofických placent [Hyánek, Doležal, 1995]. U ovariektomovaných pacientek pro ca ovarií docházelo už za 12 hodin po operaci k signifikantnímu vzestupu tHcy, které bylo odstraněno hormonální suplementací estrogenů [Kaprál, 2005; Doodsová, 2006]; významné změny cysteinu a dalších S-obsahujících aminokyselin nebyly během patologické gravidity pozorovány [Víšková, 2008].

Zvýšený Hcy, nízký folát u T > T polymorfismu jsou kauzálně spojovány s vyšším výskytem NTD [v. d. Put, 1997]. Podání folátu v perikoncepčním období snižuje výskyt NTD o 50–70 %, jak bylo ověřeno v posledních 20 letech. Tento známý fakt není dodnes jasně vysvětlen, podávání folátu před otěhotněním svůj účel plní, protože folát a někdy spolu s Cbl zlepšují metylaci [Schneiderka, 2007]. Blom (2007S) dokázal na kuřecích zárodcích, že snížený kvocient SAM/SAH kauzálně působí zřetelné rozšíření a neuzavírání páteřního kanálu tím, že snížená methylace postihne genovou expresi pro tvorbu kritických bílkovin. Finelli (2007S) vysvětluje příznivý účinek folátu přes folátový receptor.

Kazuistika 10

Zdravá, 40letá inženýrka s dysfertilitou, usilující řadu let o graviditu odeslána z genetické poradny k metabolickému vyšetření; v mládí prodělala peritonitidu po nepoznané a pozdě operované apendicitidě. t-Hcy 95 $\mu\text{mol/l}$, HoTC 4 pmol/l , MMA > 75 $\mu\text{mol/l}$, folát 24 nmol/l , KO v normě; fibroskopie negativní, MCV 110; parietální protilátky negativní, suspektně fosfolipidový syndrom. Suplementována *per os* CNCbl 1000 $\mu\text{g/obden}$. Po stabilizaci HoTC, poklesu tHcy i MMA absolvuje 2 ovulace a na 48 pmol/l HoTC koncipuje, donosí a porodí v termínu zdravé dítě. Trvale perorálně suplementována vitamínem B₁₂.

Kazuistika 11

Zdravá 37letá trenérka sportovního klubu, vegetariánka s dlouhodobou dysfertilitou odeslána se zcela normálním genetickým a gynekologickým nálezem do metabolické ambulance k vyšetření metabolického důvodu dysfertility. Vstupní hladina tHcy 79 $\mu\text{mol/l}$, MMA > 75 $\mu\text{mol/l}$; HoTC 4, 5 pmol/l ; PPPB negativní Fe a KO v normě; suplementována perorálně vitamínem B₁₂; v touze po dítěti začíná přijímat masitou stravu; hladina HoTC se stabilizuje na 38 pmol/l , MMA klesla pod 10 $\mu\text{mol/l}$, povolena koncepce, gravidita zatím probíhá fyziologicky.

Neuropsychiatrická a neurologická onemocnění

Hcy se uplatňuje svojí neurotoxicitou v patogenezi neurodegenerativních poruch, protože zvyšuje stimulaci N-methyl-D-aspartat-receptorů (NMDA); ve tkáňových kulturách vyvolává apoptózu neuronů a poruchu mitochondriálních funkcí. Hcy a především kyselina homocysteová se léta využívají k testování účinnosti antiepileptik, protože vyvolávají v experimentu podle velikosti dávky klonické křeče s typickým epileptogenním charakterem, které je možno odstranit antagonisty NMDA. Hladiny Hcy a SAH se ve stáří v likvoru zvyšují, Tau-protein negativně koreluje s methylačním kvocientem SAM/SAH a pozitivně s HHC. Spojitost s m. Alzheimer prokázali Clarke a Gueant (1998), když nacházeli deficitní metylaci a nižší folát při vyznačeném T > T polymorfismu. McMahon však nenašel po snížení hladiny Hcy podáním VitB žádné zlepšení kognitivních schopností u seniorů (2006). Miller et al. (2007S) prokázali v SALSA studii kauzální vztah deficitu folátu k etiologii demencí a poruch kognitivních funkcí; zvýšený tHcy přetrvává i po folátové suplementaci – je tedy spíše výrazem deficitu vitamínu B₁₂. Pacienti léčení antiepileptiky mají častější deficit vitamínu B₁₂ a folátu a častěji se u nich vyskytuje HHC – především u T > T polymorfismu, dále u seniorů, u žen hlavně v graviditě a u vegetariánek. Léčba hydantoináty a barbituráty zvyšuje spotřebu folátu a dalších VitB při jejich odbourávání v cytochromu CYP450, léčba valproátem nikoliv [Dvořáková, Kolínová et al. 2005]. Podání folátu a vitamínu B₆ při léčbě antiepileptiky je obecně uznáváno. Dlouhodobá fortifikace folátem ve stravě ohrožuje pacienty s deficitem vitamínu B₁₂ tím, že zůstává nepoznaná a neuropsychické příznaky se mohou zhoršit. Jen stanovením HoTC je možno tento deficit aktivního B₁₂ včas odhalit.

Kazuistika 12

19letý zdravý pacient je přivezen s akutní mozkovou příhodou na neurologické oddělení, kde je diagnostikována rozsáhlá mozková ischemie, na kauzální léčbě se stav upravuje, parézy mizí; v laboratorním nálezu tHcy 39 $\mu\text{mol/l}$, HoTC 5 pmol/l , MMA > 75 $\mu\text{mol/l}$, folát 5 nmol/l , MCV a KO v normě. Homozygot T < T, Schillingův test 25%; suplementován Millgamou, nyní Neuromaxem a folátem 2krát týdně. Stejný laboratorní nález u jeho 46leté matky homozygoty T < T.

Kazuistika 13

37letá pacientka po levostranném iktu odeslána k vyšetření výrazné HHC > 100 $\mu\text{mol/l}$ do metabolické ambulance; folát < 5 nmol/l , celkový vitamin B₁₂ < 75 pmol/l , MMA > 75 $\mu\text{mol/l}$, homozygotka T < T, heterozygotka Leidenská mutace; od 15 let užívala HAK. Suplementovaná *per os* CNCbl a folátem, hemiplegie trvá.

Za uplynulých 10 let evidujeme už 7 tzv. mladých iktů do 40 let věku u žen s T > T mutací MTHFR, nízkým folátem, středně zvýšeným tHcy, které všechny užívaly HAK.

HHC z deficitu vitaminů, u poruch výživy a endokrinopatií

HHC z deficitu vitaminů skupiny B jsou velmi časté hlavně dnes při dostupnosti metodik stanovení holotranskobalaminu (HoTC), folátu i pyridoxalfosfátu s maximem u seniorů. Zde hodnoty tHcy dosahují i vysokých hodnot > 100 μmol/l, které jsme dříve vídávali jen u KH. HHC z deficitu vitamínu B₁₂ nachází Green et al. (2007S) v americké populaci fortifikované podáváním kyseliny listové v 36 %. Dokládá to genovým polymorfismem transportního proteinu transkobalaminu G > G a jeho nižším obsahem u 12 % SALSA Study. V počáteční fázi DM I nalézáno zvýšení Hcy a jeho pokles v chronické fázi; stejně u hypothyreózy, azoospermie, deficitu ovariálních či placentárních hormonů. Chronická střevní onemocnění (např. celiakie, sprue) mají průměrně vyšší hladinu tHcy o 2 μmol/l, vyššenou osteoporózu a nižší BMD na páteři. Ke chronickým onemocněním patří i etylismus, který se vyznačuje masivní spotřebou vitamínu B₁₂ potřebného k metabolizování etanolu.

Kazuzistika 14

45letý inženýr-chemik bez rizika pro KVO, ale z rizikového pracoviště s toxickými látkami, přichází k vyšetření HHC, aby mohl požádat o změnu pracoviště; výsledek tHcy > 100 μmol/l, folát v normě, MMA > 75 μmol/l, celkový vitamin B₁₂ < 75 pmol/l, HoloTC nedekovatelný; MCV 130 μm; přeřazen z rizikového pracoviště a suplementován CNCbl 5 x 1000 μg i. m. týdně až do normalizace HoloTC, stabilizován a spokojen. Po 6 měsících nález HoloTC opět velice nízký – vzhledem ke špatné compliance stanoven CDT s výsledkem > 8 %. Pacient přiznává pravidelnou konzumaci tvrdého alkoholu 0,5–1,5 l/d; vyřazen, ale suplementuje se veterinárními megadávkami perorálního vitamínu B₁₂.

Kazuistika 15

Dvě sestry (12 a 15 let) s molekulárně geneticky potvrzenou familiární hypercholesterolemií z rodiny s vysokým rizikem KVO, CCh > 9 mmol/l, apoB 1, 8 g/l, deficitem LDL receptoru, obě indikovány k medikamentózní léčbě. Starší léčena pro revmatickou horečku metotrexátem, hladina tHcy 35 μmol/l – není možno z obavy ze svalového i jaterního poškození nasadit statinovou léčbu. Užívá proto pouze 10 mg ezetimibu/d, s max. poklesem CCh jen na 7,5 mmol/l, zatímco u její mladší sestry při kombinaci ezetimib + statin pohodlně snižujeme CCh na 4,5 mmol/l.

Metodické poznámky ke stanovení tHcy

Tři čtvrtiny homocysteinu v plazmě jsou vázány disulfidickou vazbou na albumin a pouze jedna čtvrtina, která se zatím zdá klinicky nevýznamná, je volná. V 80. letech minulého století byl zaveden pojem tHcy-celkový homocystein (total): před vlastním stanovením redukčním činidlem se převedou všechny nestabilní frakce

Hcy, včetně smíšených bisulfidů a Hcy vázaného na albumin, do redukované formy homocysteinu, která se potom měří přímo nebo až po derivatizaci, a to chromatograficky, enzymaticky nebo imunochemicky v různých modifikacích. V rutině i vědecké laboratoři jsou nejčastější stanovení fluorescenční polaris. immunoassay (FPIA) prováděné na Abbott AxSYM přístrojích. Dosahují přesnosti a správnosti v rozsahu 5–10 % při dostatečné dostupnosti a metodické pohodlnosti i v rutinním provozu. Chromatografické metody prováděné – ať už na aminokyselinových analyzátoch či HPLC s UV, fluorescencí či elektrochemickou detekcí – jsou náročnější povahy. Zvláště přesné jsou metody na GC/MS, LC/MS nebo MS/MS, ale jsou náročné na obsluhu, a tedy drahé. Dovolují však stanovit i některé další potřebné metabolity – MMA, thioaminokyseliny aj. [Refsumová, 2004; Ueland, 2007]. Inaccuracy nemá přesahovat < 10 % a imprecision < 5 % s analytickým rozsahem od 10 do 100 μmol/l a CV 5–7 %. Problém standardizace stanovení Hcy však zůstává vzhledem k široké metodice stanovení stále nedořešen. Naše externí kontrola je kvalitně zajišťována v ERDNIMu a INSTANDu.

Z praktických a úsporných důvodů už řadu let používáme lacinější fotometrickou metodu setem Carolina po 3stupňové enzymatické konverzi Hcy na cystathionin účinkem CBS, který se CGL změní na Hcy, pyruvát a amoniak; pyruvát se kineticky stanovuje na Synchron LX20 Beckman-Coulter.

Preanalytická fáze stanovení tHcy je velice důležitá!

Posturální a dietní změny před odběrem jsou nevýznamné, pouze kouření tHcy mírně zvyšuje. Odběr do EDTA, citrátu nebo heparinu dává stejně dobré výsledky; v séru jsou hodnoty tHcy o 10 % vyšší vlivem koagulačních změn. Z porušeného stromatu erytrocytů unikají methyltransferázy a hlavně SAH, z něhož se hydrolyzou zvyšuje hladina tHcy. Zkumavku třeba alespoň chlazit a maximálně do 30 minut po odběru oddělit erytrocyty centrifugací. Pokud se odebírá do 3-deazaadenosinu, stačí centrifugovat do 1–2 hodin. Arteficiální chyba ve smyslu zvýšení tHcy může být při špatném odběru a pozdním zpracování obrovská – až několik set procent, což může být zdrojem rozporů a nedůvěry kliniků k tomuto stanovení. Podrobné studie vhodných a nevhodných konzervačních činidel – viz publikace Refsumová et al. (2008). Léková interference hladiny tHcy je častá:

- zvýšení vyvolávají antifolika (metotrexát), anti-epileptika – hydantoináty, antagonisté B₁₂ a B₆, fibráty, cyklosporin, L-DOPA, theofylin;
- snížení působí estrogeny, TSH, Downův syndrom, betain, kreatin, tamoxifen, statiny, Mesma, Penicilamin, N-acetylcystein.

Diskuse

Stanovení tHcy se dnes stalo snadno metodicky dostupným, je laciné a hrazeno pojišťovnou, je možno provádět jako rutinní vyšetření. Nyní přináší i praktický

užitek, dříve jen vyhrazený k diferenciaci metabolických poruch sirných aminokyselin [Ueland, 2007]. Selektivní screening HHC v rizikových skupinách pacientů z NNH přinesl důkaz o vysoké incidenci HHC a vynucuje si diskusi o diagnostické významnosti stanovení tHcy.

Dokládají to kazuistiky 15 pacientů se zachycenou HHC u typických infarktů myokardu na KJ s nepoznanou perniciózní anémií, rakovinou žaludku, mozkových krvácení, plicních a mozkových embolií, u pacientek s pozitivním nálezem TEM nevyšetřených řádně před podáním HAK nebo hormonální suplementací v menopauze. Často překvapivé nálezy HHC provázející plicní embolie a infarkty myokardu bez zvýšeného cholesterolu, HHC u osteoporózy, nepoznané mírné či KH. Snadné a dostupné stanovení tHcy mohlo těmto často dramatickým příhodám pacientů zabránit, protože nález výrazné HHC vždy indikuje další dražší vyšetření vitaminů, koagulačních faktorů, MMA či TEM. V naší laboratoři je tHcy zařazen mezi rutinní vyšetření rizikových faktorů KVO s výtěžností rovnocennou stanovení CRP, s nímž také mírně koreluje (korelační koeficient 0,03909, $p = 0,02$). Mírné zvýšení tHcy $< 25 \mu\text{mol/l}$ zřejmě není diagnosticky významné.

Závěr

HHC představuje rizikový faktor, jehož toxické následky a závislosti nejsou zatím nedostatečně prozkoumány. Vzhledem ke své velice reaktivní skupině -SH- se jeho účinky projevují současně a nespecificky na mnoha orgánech, jsou velice různorodé. Zřejmě se projevují podle genové výbavy jedince, jeho věku, způsobu výživy a především dalších environmentálních vlivů. I když hlavním metabolickým aktérem poruch methylace je zřejmě folát nebo Cbl, Hcy je evidentním markerem, který nás ke správné etiologii dovede. Doporučujeme jeho vyšetření v těchto případech:

- a) při očekávaném nebo nejasném deficitu vitaminů skupiny B;
- b) při vysokém riziku KVO v sekundární prevenci u pacientů bez pozitivních typických rizikových markerů či lipidových nálezů nebo při neúspěšnosti účinné medikamentózní léčby [Soška, 2006];
- c) při nejasném chronickém onemocnění spojeném s poruchou výživy;
- d) při přetrvávající dysfertilitě a zvýšené perinatální morbiditě (aborty, abrupce, gestózy);
- e) při výskytu embolií, tromboembolií nejasné etiologie či rekurentních trombóz;
- f) nevysvětlitelné osteoporóze, zvýšené lomivosti kostí a kostních dysplazií;
- g) u pacientů s marfanoidním habitem, vysokou myopií či ektopií čočky, mentálním opožděním, dystrofií, nevysvětlitelných makrocytárních či megaloblastických anémií;
- h) při monitorování léčby antiepileptiky, metotrexátem a dalšími antifoliky.

Seznam použitých zkratk:

ADMA	– asymmetric dimethyl arginine
AHA	– American Heart Association
ATS	– ateroskleróza
BMD	– bone mineral density
Cbl	– kobalamin
CBS	– cystathionin-beta-syntasa
CGL	– cystathionin-gama-lyasa
CCh	– celkový cholesterol
CDT	– carbohydrate deficient transferin
CNCbl	– kyanokobalamin
CRC	– kolorektální karcinom
HoTC	– holotranskobalamin
ChLS	– chronické ledvinové selhání
IF	– intrinsic factor
KH	– klasická homocystinurie
KJ	– koronární jednotka
KVO	– kardiovaskulární onemocnění
Met	– methionin
MCV	– median cell volume
MMA	– methylmalonová kyselina
NNH	– nemocnice na Homolce
OHCbl	– hydroxykobalamin
PAI-1	– inhibitor plasminogen aktivátoru
PPPB	– protilátky proti parietálním buňkám
RA	– rodinná anamnéza
SAH-S	– adenosylmethionin
SAM-S	– adenosylmethionin
TEM	– tromboembolické mutace (Leiden, Protrombin II, MTHFR C677T, A1289G)
tHcy	– celkový (total) homocystein
tPA	– tkánový plasminogen aktivátor
TT-T>T	– genotyp polymorfismu MTHFR C 677T
VitB	– skupina vitaminů B významná pro methylaci (doporučená suplementace podle pro AHA podle Malinowa 1999: B ₁₂ 400 $\mu\text{g/d}$, B ₆ 25 mg/d , folát 100 $\mu\text{g/d}$).

Literatura

1. **Albert, Ch., Cook, N. R., Gaziano, M.** Effect of folic acid and B vitamins in risk of cardiovascular events and total mortality among women at high risk of coronary vascular diseases: a randomized trial. *JAMA*, 2008, 290, p. 2027–2036.
2. **Boonaa, K. H., Njolstad, I., Ueland, P. M. et al.** Homocysteine Lowering and cardiovascular events after myocardial infarction. *NEJM*, 2006, 354, p. 1578–1588.
3. **Carmel, R., Jacobsen, D. W.** *Homocysteine in Health and Disease*. Cambridge: Cambridge University Press 2001.
4. **Clarke, R.** Homocysteine and risk of ischaemic heart disease and stroke. A meta-analysis. *JAMA*, 2002, 288, p. 2015–2022.
5. **Clarke, R., Svand, J. G., Schneede, J. et al.** Vitamin B₁₂ and folate deficiency in later life. *Age and Ageing*, 2004, 33, p. 34–41.
6. **Dodds, E. Fell, D. F., Dopleit, K. C. et al.** Effect of homocysteine concentration in early pregnancy on gestational hypertensive disorders and pregnancy outcomes. *Clin. Chem.*, 2008, 54, p. 326–334.

7. **Duthie, S. J.** Folate, DNA stability and colorectal neoplasia. *Pro. Nutr. Soc.*, 2004, 63, p. 571–578.
8. **Green, R., Miller, J. W. Garrod, M. G. et al.** Assessment of vitamin B-12 status and its genetic determinants as risk factors for hyperhomocysteinemia in a folic acid fortified population. World Congress HHC, Saarbrücken 2007.
9. **Hermann, M., Wildemann, B. Claes, L. et al.** Experimental Hyperhomocysteinemia reduces bone quality in rats. *Clin. Chem.*, 2007, 53, p. 1455–1461.
10. **Hyánek, J., Matalon, R., Rady, P. et al.** Hyperhomocysteinemia, MTHFR or MTRR polymorphism in Czech patients suffering from cardiovascular diseases. *Klin. Chem. Metab.*, 2002, 10, s. 72–76.
11. **Jacobsen, D. W.** Molecular targeting of protein cysteine residues by homocysteine: a mechanism of vascular pathogenesis. World Congress on HHC, Saarbrücken 2007.
12. **Jakubowski, H.** Molecular basis of homocysteine toxicity in humans. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2004, 61, p. 470–87.
13. **Jakubowski, H.** The Pathophysiological hypothesis of homocysteine- thiolactone mediated vascular disease. World Congress on HHC, Saarbrücken 2007.
14. **Kang, S. S.** Treatment of HHC, physiological basis. *J. Nutr.*, 1996, 126, p. 1273–1275.
15. **Kim, Y. I.** Will mandatory folic acid fortification prevent or promote cancer? *Am. J. Clin. Nutr.*, 2004, 80, p. 1123–1128.
16. **Kožich, V., Kraus, E., de Franchis, R. et al.** Hyperhomocysteinemia in premature arterial disease: examination of cystathionine beta synthase alleles at the molecular level. *Hum. Mol. Genet.*, 1995, 4, p. 623–629.
17. **Laure, P.** The power and the promise of DNA methylation markers. *Nature Reviews (Cancer)*, 2003, 3, p. 253–266.
18. **LeBooff, M. S., Narweker, R., KaCroix, A. et al.** Plasma homocysteine and risk of hip fracture among postmenopausal women in the Women's Health Initiative. World Congress on HHC, Saarbrücken 2007.
19. **Lippi, G., Tragher, G. Franchini, M. et al.** Has homocysteine shrunk? *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2007, p. 1419–1420.
20. **Loscalzo, J.** Homocysteine trials-outcomes for complex reasons. *NEJM*, 2006, 354, p. 1629–1632.
21. **Malinow, M. R.** Plasma homocyst(e)ine and arterial occlusive diseases: a mini-review. *Clin. Chem.*, 1994, 40, p. 173–176.
22. **Malinow, M. R., Bostom, A. G., Karcus, R. M.** Homocyst(e)ine, diet, and cardiovascular diseases: a statement for healthcare professional from the Nutrition Committee AHA Circulation. 1999, 99, p. 178–182.
23. **McMahon, J. A., Green, T.J., Sejjaff, M. et al.** A controlled trial of homocysteine lowering and cognitive Performance. *NEJM*, 2006, 354, p. 2764–2772.
24. **vanMeurs, J. B.** Homocysteine levels and the risk of osteoporotic fracture. *NEJM*, 2004, 350, p. 2033–2041.
25. **Rady, P. L., Tyrting, S. K., Hudnall, S. D. et al.** Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR): Incidence of mutations C677T a A1298C in the Askenazi Jewish Population. *Amer. J. Med. Genet.*, 1999, 86, p. 380–384.
26. **Refsum, H., Smith, D. A., Ueland, P. M. et al.** Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clin. Chem.*, 2004, 50, p. 3–32.
27. **Sato, Y., Honda, Y., Iwamoto, J. et al.** Effect of folate and mecolamin on hip fractures in patients with stroke: a randomized controlled trial. *JAMA*, 2005, 293, p. 1082–1088.
28. **Scriver, C.R. et al.** *Metabolic Bases of Inherited Diseases*. (8th Ed.) Toronto: Mc. Graw-Hill 2001.
28. **Soška, V.** Hyperhomocysteinemie jako rizikový faktor: fakt nebo fikce? *Vnitř. Lék.*, 2005, 51, p. 395–396.
29. **Stanger, O., Hermann, W., Pietrzik, K. et al.** Konsensus der D. A. CH-Liga Homocystein über den rationellen klinischen Umgang mit Homocystein, Folsäure und B-Vitamin bei kardiovaskulären und thrombotischen Erkrankungen. Richtlinien und Empfehlungen. *J. Kardiol.*, 2003, 10, 2, p. 9.
30. **Schneiderka, P.** Homocysteinémie a folatémie v éře fortifikace folátem. *Klin. Biochem. Metab.*, 2007, 16, s. 228–232.
31. The Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) 2 Investigators. Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. *NEJM*, 354, 2006, p. 1567–1577.
32. **Ueland, P. M. Clarke, R.** Homocysteine and cardiovascular risk: considering the evidence in the control of study design, folate fortification, and statistical power. *Clin. Chem.*, 2007, 53, p. 807–809.
33. **Ueland, P. M., Midttun, O., Windelberg, A et al.** Quantitative profiling of folate and one-carbon metabolism in large scale epidemiological studies by mass spectrometry. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2007, 45, p. 1737–1745.
34. **Valík, D., Radina, M., Štěrba, J. et al.** Homocysteine: a promising biomarker of folate antagonist chemotherapy. *Klin. Biochem. Metab.*, 2006, 14 (35), s. 75–86.
35. **Wilcken, D. E. L., Wilcken, B.** The natural history of vascular disease in homocystinuria and the effective treatment. *J. Inher. Metab. Dis.*, 1997, 20, p. 296–300.
36. **Zoungas, S., McGrath, B. P. Branley, P. et al.** Cardiovascular morbidity and mortality in the atherosclerosis and folic acid supplementation trial (ASFAST) in chronic renal failure: a multicentre, randomized, controlled trial. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2005, 47, p. 1108–1116.
37. **Žák, A., Tvrzická, E., Vecka, M. et al.** Effects of hyperhomocysteinemia on fatty acid composition and oxidative modification of plasma. *Ateroskleróza*, 2001, 5, s. 12–18.

Do redakce došlo 4. 2. 2009.

Adresa pro korespondenci:
 Prof. MUDr. Josef Hyánek, DrSc.
 Nemocnice na Homolce
 Roentgenova 2
 150 30 Praha 5
 e-mail: josef.hyaneck@homolka.cz