

***Гомоцистеин в лабораторной медицине:
новый энзиматический метод анализа.***

Шевченко Ольга Павловна,

доктор мед. наук, профессор

Зав. лабораторией клинической и экспериментальной биохимии ФГУ «НИИ Трансплантологии и искусственных органов Росздрава», Москва.

Конец прошлого и начало нынешнего, XXI века, сопровождаются интенсивным развитием лабораторной медицины. Открытие новых биохимических маркеров в сочетании с разработкой более современных аналитических технологий создали возможность для быстрого внедрения в клиническую практику целого ряда новых методов лабораторной диагностики.

Яркие примеры активного появления новых лабораторных тестов в рутинной клинической практике можно наблюдать в кардиологии. Сердечно-сосудистые заболевания и их осложнения являются главной причиной заболеваемости, инвалидизации и смертности населения всех развитых стран. Прогнозы также неутешительны: к 2010 году смертность от ишемической болезни сердца (ИБС) станет ведущей причиной смерти во всех странах Земного шара. Это заставляет искать новые возможности прогнозирования, оценки риска, диагностики, профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний и их осложнений. Определенные успехи, достигнутые на этом пути в последние десятилетия, в значительной мере связаны с достижениями лабораторной медицины. Среди них:

- концепция развития атеросклероза как вялотекущего воспалительного заболевания;
- использование высокочувствительного теста на С-реактивный белок, фибриноген, другие маркеры воспаления для стратификации риска, контроля мер профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний и их осложнений;
- открытие и лабораторный контроль противовоспалительного действия гиполипидемических препаратов;
- внедрение новых биохимических маркеров повреждения (тропонины), дисфункции миокарда (натрийуретические пептиды) и др.;
- обнаружение новых лабораторных маркеров нестабильного течения ИБС
- предикторов грозных осложнений, таких как плацентарный фактор роста, ассоциированный с беременностью белок А (PAPP-A), растворимая форма CD40-лиганда. Эти тесты, очевидно, станут инструментами рутинных клинических исследований в ближайшей перспективе.

Значимое место в этом ряду занимает гомоцистеин. Повышение уровня гомоцистеина в плазме крови имеет большое прогностическое значение при сердечно-сосудистой патологии, при нейродегенеративных заболеваниях, осложнениях беременности, дефектах развития плода, некоторых других заболеваниях крови. Для клиницистов и специалистов лабораторной медицины важно своевременно получить информацию как о клиническом значении лабораторного теста, так и о методических возможностях, которые доступны

отечественному здравоохранению. Наиболее полные работы на русском языке, в которых представлены данные о патогенетическом и клинико-диагностическом значении гомоцистеина и гипергомоцистеинемии, и которые читатель отыщет без труда, указаны ниже.

Гомоцистеин – Патохимия крови для врачей. Шевченко О.П., Олефиренко Г.А., Червякова Н.В.- Москва, 2002., 48 С.

Гипергомоцистеинемия и ее клиническое значение. Шевченко О.П., Олефиренко Г.А. – Лаборатория.- 2002.- №1.

Гомоцистеин – новый фактор риска атеросклероза и тромбоза. Шевченко О.П. Клиническая лабораторная диагностика., 2004г. - №6.

Гомоцистеин при коронарной болезни сердца и сердечного трансплантата. Хубутя М.Ш., Шевченко О.П., Москва, 2004., 272 С.

Но если о важном клиническом значении определения уровня гомоцистеина сформировано представление у многих врачей, то доступность реализации этого теста в реальной отечественной практике пока еще не кажется очевидной.

Главная цель настоящей публикации – представить новый энзиматический метод измерения концентрации гомоцистеина, который может выполняться на биохимических анализаторах, широко распространенных в клинико-диагностических лабораториях.

Гомоцистеин и гипергомоцистеинемия.

Гомоцистеин – это серусодержащая аминокислота, естественный промежуточный продукт метаболизма метионина и цистеина. На уровень гомоцистеина влияет дефицит витаминов В₆, В₁₂ и фолиевой кислоты, необходимых для ключевых ферментов обмена гомоцистеина. Генетические нарушения, дефицит указанных витаминов, болезни почек и другие причины вызывают нарушение обмена гомоцистеина и повышение его уровня в плазме крови (Рис.1.). На уровень гомоцистеина оказывают влияние также пол, возраст, гормональный фон, характер питания.

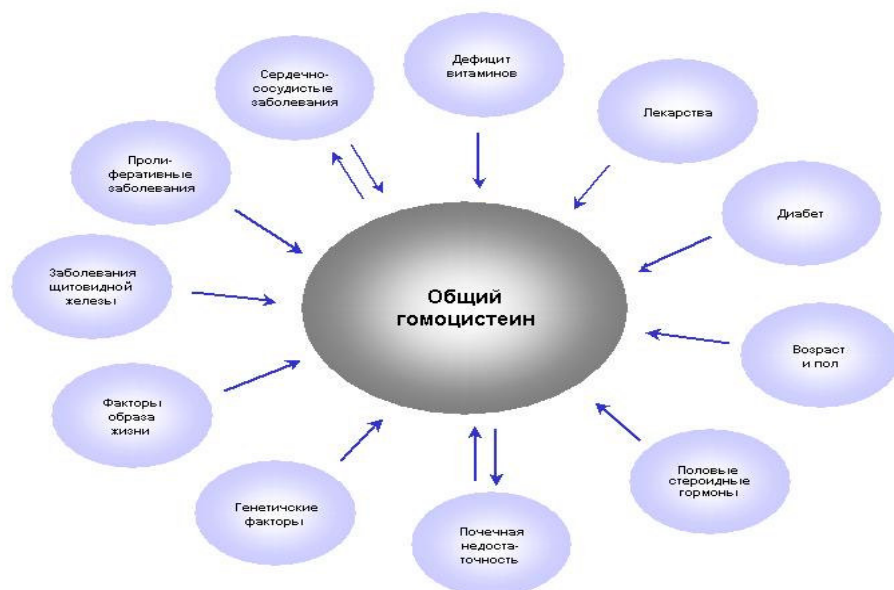
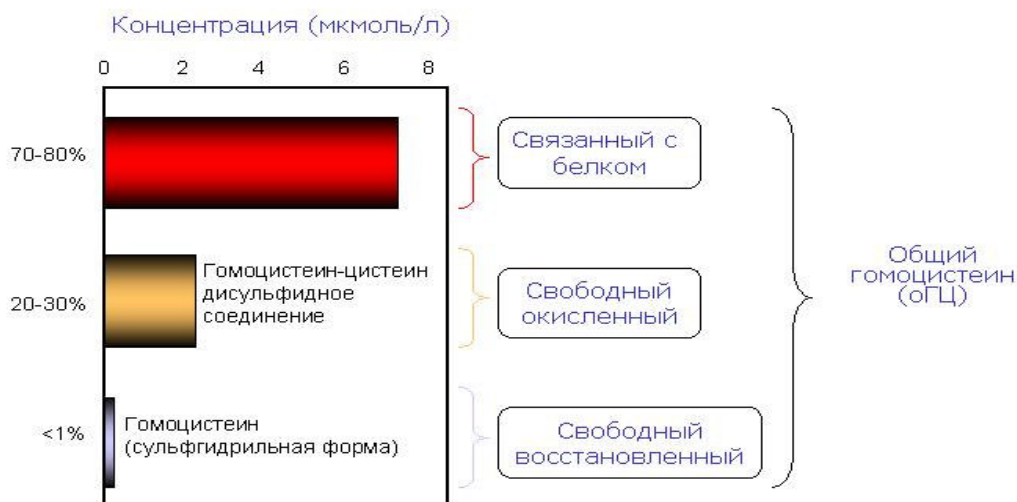


Рис. 1. Факторы, влияющие на концентрацию гомоцистеина.

В плазме крови гомоцистеин присутствует в трех молекулярных формах: свободный гомоцистеин, дисульфид гомоцистеина (гомоцистин) и дисульфид гомоцистеина с цистеином. Все эти молекулярные формы гомоцистеина могут быть как в свободном виде, так и в связанном через дисульфидную связь с белком, главным образом, альбумином. У практически здоровых лиц концентрация свободного гомоцистеина очень низкая и его количество не превышает 2% от общего гомоцистеина в плазме крови. Содержание дисульфидов гомоцистеина (гомоцистина и цистеин - гомоцистеина) составляет примерно 10-15% (Рис.2.).



Ueland PM et al., J Nutr, 1996, 126(4 Suppl), 1281S-4S

Рис. 2. Различные формы гомоцистеина в плазме крови.

Содержание общего гомоцистеина в плазме крови здорового человека находится в диапазоне 5-15 мкмоль/л. Концентрация 15-30 мкмоль/л соответствует умеренной, 30-100 мкмоль/л – средней, выше 100 мкмоль/л – тяжелой гипергомоцистеинемии. Однако полученные в последние годы результаты масштабных проспективных исследований показали, что уровень гомоцистеина 10-12 мкмоль/л у лиц старше 50 лет, при наличии сопутствующих заболеваний (сердечно-сосудистые заболевания, заболевания почек и др.) и некоторых других факторов риска следует квалифицировать как умеренную гипергомоцистеинемии (Рис.3.).

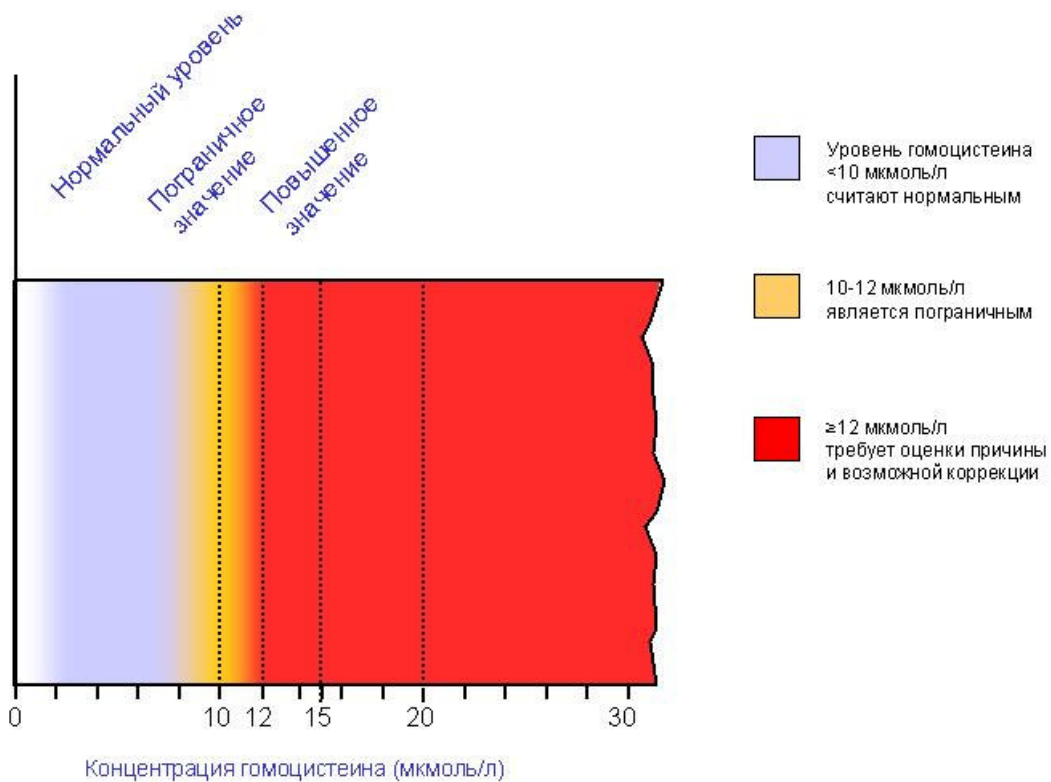


Рис. 3. Интерпретация значений уровня гомоцистеина в клинической практике.

Повышенный уровень гомоцистеина является предиктором риска развития ишемической болезни сердца и ее осложнений. Обнаружена достоверная связь уровня гомоцистеина с риском общей смертности. Последние исследования также показали роль гомоцистеина в развитии акушерской патологии, выкидышах и рождении детей с врожденными аномалиями развития.

Обмен гомоцистеина может быть нарушен и при других заболеваниях: болезнях желудочно-кишечного тракта, болезнях почек, сахарном диабете, гипотиреозе, системных ревматических и хронических воспалительных заболеваниях (Рис.4.).



Рис. 4. Эффекты гипергомоцистеинемии.

Ниже перечислены группы пациентов, для которых измерение уровня гомоцистеина является необходимым.

- **Сердечно-сосудистые заболевания (пациенты с высоким риском)**
 - Диабет
 - Курение
 - Гипертония
 - Почечная недостаточность
 - Гиперлипидемия
- **Недостаточность витаминов**
- **Гомоцистинурия**
- **Нейродегенеративные заболевания**
 - Болезнь Альцгеймера
 - Депрессия
 - Деменция

В первую очередь, скрининг на гипергомоцистеинемию необходимо проводить лицам с высоким риском развития ИБС. Это пациенты с диагностированной окклюзией коронарных сосудов, тромбозом, гипертонической болезнью, метаболическим синдромом, диабетом, почечной недостаточностью, неблагоприятным семейным анамнезом. Доказана связь между гипергомоцистеинемией и другими факторами риска ИБС.

Иммунохимический метод определения гомоцистеина

Широкие клинические исследования гомоцистеина стали возможны после разработки иммунохимических методов определения его концентрации. В основе большинства методов иммунохимического определения уровня общего гомоцистеина лежит использование моноклональных антител против S-аденозилгомоцистеина. Для этого сначала производят:

- восстановление гомоцистеина дитиотрейтолом;
- затем - энзиматическое превращение гомоцистеина в S-аденозилгомоцистеин;
- конкурентный иммунохимический анализ с использованием конъюгированного аденозилгомоцистеина и антител и различных методов детекции.

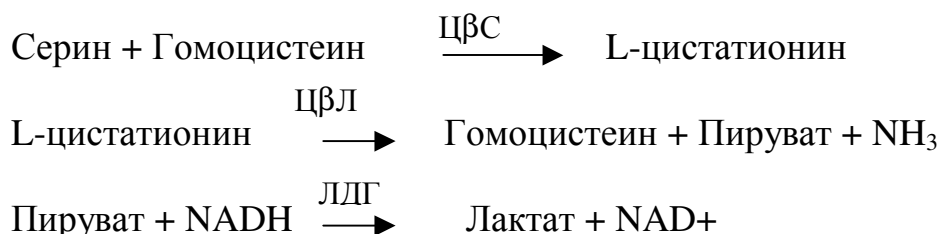
Энзиматический метод определения гомоцистеина.

Компания «PLIVA-Lachema Diagnostika» предлагает набор для определения уровня общего гомоцистеина в сыворотке или плазме крови. Это простой, легко адаптируемый биохимический метод, позволяющий проводить анализ на любом биохимическом анализаторе вместе с определением других маркеров.

ПРИНЦИП ЭНЗИМАТИЧЕСКОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ГОМОЦИСТЕИНА

- Связанный или димеризованный ГЦ (окисленная форма) восстанавливается до свободного гомоцистеина.
- Свободный ГЦ реагирует с серином, в результате чего образуется L-цистатинин. Реакция катализируется цистатинин-*b*-синтазой (ЦбС). L-цистатинин, в свою очередь, расщепляется с формированием гомоцистеина, пирувата и аммиака. Реакция катализируется цистатинин-*b*-лиазой.

- Впоследствии пируват под действием лактатдегидрогеназы превращается в лактат, коферментом в этой реакции является NADH.
 - Отношение NADH к NAD⁺ прямо пропорционально концентрации ГЦ.
- Общая схема химических реакций при энзиматическом методе определения концентрации гомоцистеина представлена ниже.



Для определения концентрации гомоцистеина рекомендовано использовать свежую ЭДТА или гепаринизированную плазму крови без гемолиза и мутности. Для сбора сыворотки можно использовать специальные сепараторные пробирки. При определении концентрации гомоцистеина в динамике у одного больного, не рекомендуется использовать и гепаринизированную, и ЭДТА плазму. Образцы крови необходимо поместить на лед сразу после сбора, они должны быть отцентрифугированы в максимально короткие сроки (в течение 1 часа). Для проведения анализа не подходят сильно липемичные образцы. Образцы можно хранить при 2-8⁰С в течение 48 часов, либо при необходимости их можно заморозить при -20⁰С.

Минимальная концентрация гомоцистеина, определяемая с помощью энзиматического метода, составляет 0,40 мкмоль/л.

Преимущества энзиматического метода.

В отличие от методов, в которых используются антитела, - это настоящий энзиматический метод определения концентрации гомоцистеина.

- Метод можно адаптировать к различным биохимическим анализаторам, поэтому анализ гомоцистеина можно проводить вместе с определением других маркеров.
- Небольшое количество манипуляций, что уменьшает вероятность ошибок, временные и трудовые затраты.
- Реагенты жидкие, стабильные, полностью готовы к использованию.
- Для проведения анализа используют только 3 реагента.
- Построение калибровки проводится всего по двум калибраторам, линейность калибровки до 90 мкмоль/л (Рис.5.).

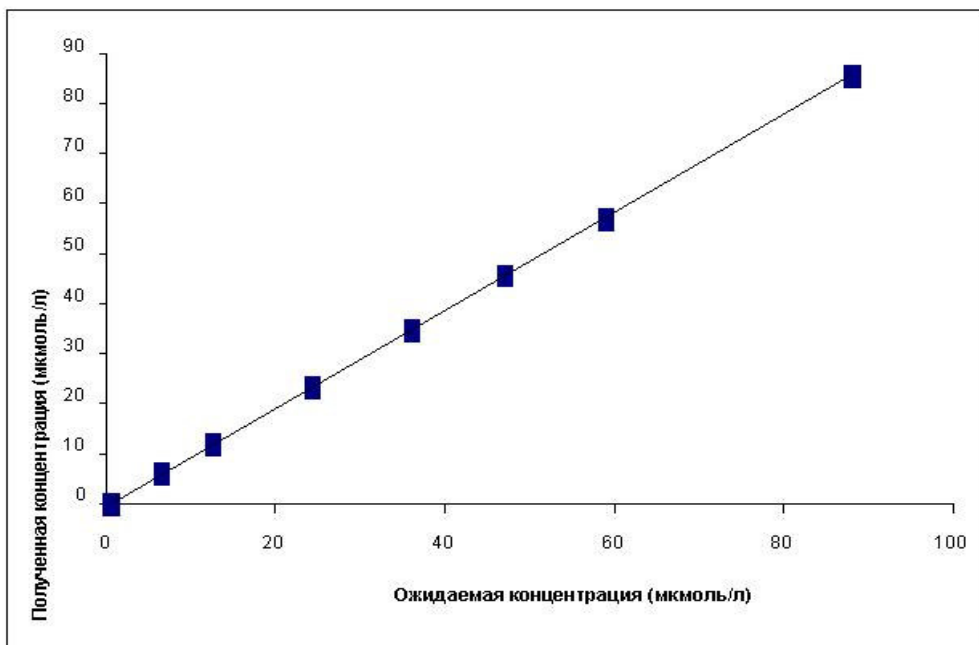


Рис.5. Энзиматический метод определения концентрации гомоцистеина (проведен на Beckman Synchron CX5). Тест на линейность (образцы плазмы разведены нулевым калибратором).

- Широкий диапазон определяемых значений позволяет не проводить повторный анализ образцов с высокой концентрацией ГЦ.
- Реагенты можно хранить на борту анализатора. Стабильность реагентов на борту анализатора 30 дней.
- Для анализа можно использовать сыворотку, ЭДТА или гепаринизированную плазму крови. Нет необходимости использовать определенный вид образца.
- Быстрота проведения анализа: первый результат можно получить через 12 минут, скорость 36 тестов в час.
- Высокая воспроизводимость результатов.
- Метод позволяет получать результаты, которые хорошо сходятся с результатами других исследований – ВЭЖХ и иммунохимического метода.

Благодаря появлению новых методов анализа, определение уровня гомоцистеина превратилось из специализированного научно-исследовательского теста в рутинный клинико-лабораторный тест. Энзиматический метод - современное, простое, надежное и оптимальное решение для биохимических лабораторий.