

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГОМОЦИСТЕИНА НА АМИНОКИСЛОТНОМ АНАЛИЗАТОРЕ

Тудор БЫРСА, Светлана ГАРАЕВА, Галина ПОСТОЛАТИ, Галина РЕДКОЗУБОВА

*Центр метрологии и аналитических методов исследования АН Молдовы
Национальный Институт стандартизации и метрологии*

În articol sunt cercetate probleme privind homocisteinemia și homocistinuria, de asemenea este argumentată necesitatea screeningului homocisteinei în lichide fiziologice pentru diagnosticarea justă a acestor sindroame.

In the paper there is made the literature survey of syndromes in conditions of homocysteinemia and homocystinuria. It is well founded the necessity of straight homocysteine screening in physiological fluids for diagnostically appraisal of homocystinuria indication.

В 1962 году был открыт синдром гомоцистинурии [5], и с этого времени внимание врачей было направлено на исследование роли этой аминокислоты в обмене веществ в организме человека.

Гомоцистинурия связана с дефицитом фермента цистатионинсинтазы и имеет следующие клинические проявления: умственная отсталость, деформации костей, смещение хрусталика, прогрессирующие сердечно-сосудистые заболевания и очень высокая частота тромбоэмболии.

Гипергомоцистеинемия наблюдается при поражении глаз у больных сахарным диабетом и при глаукоме. У пациентов с возрастной катарактой также отмечается повышенный уровень гомоцистеина в крови. Имеются данные, что у пожилых людей с повышенным уровнем гомоцистеина повышается риск возникновения болезни Альцгеймера и старческого слабоумия [3]. Повышение содержания гомоцистеина в крови имеет место при нарушении функции почек, у больных псориазом, системной красной волчанкой, а также лимфобластным лейкозом, раком молочной железы, яичников, поджелудочной железы [4].

Особенно опасна гомоцистеинемия в акушерской практике. Микротромбообразование и нарушения микроциркуляции приводят к осложнениям в функционировании плаценты и фетоплацентарного кровообращения, а это может быть причиной репродуктивной недостаточности: невынашивания беременности и бесплодия в результате дефектов имплантации зародыша. На более поздних стадиях беременности гипергомоцистеинемия является причиной развития хронической фетоплацентарной недостаточности и хронической внутриутробной гипоксии плода, что приводит к рождению детей с низкой массой тела и к снижению функциональных резервов всех жизнеобеспечивающих систем новорожденного. Гипергомоцистеинемия может стать одной из причин позднего токсикоза беременности – гестоза, проявляющегося в нефропатии, преэклампсии и эклампсии. Рождение незрелого недоношенного ребенка в таких случаях сопровождается высокой детской летальностью и большим процентом послеродовых осложнений. Кроме того, гомоцистеин свободно переходит через плаценту и, предположительно, в высоких концентрациях способен оказывать тератогенное и фетотоксическое действие на плод [7]. Было доказано, что гипергомоцистеинемия является одной из причин анэнцефалии и незаращения костномозгового канала. Анэнцефалия приводит к 100%-ой летальности, незаращению спинномозгового канала – к развитию серьезных неврологических проблем у ребенка, включая моторный паралич, пожизненную инвалидность и преждевременную смерть [3,4].

Наконец, повышение общего содержания гомоцистеина в организме является независимым фактором развития сердечно-сосудистых заболеваний.

До недавнего времени содержание гомоцистеина определяли, используя метиониновую нагрузку. Этот тест не унифицирован, не подобрана оптимальная доза метионина для нагрузки, не установлены временные интервалы для стандартизации теста, что позволяет его использовать лишь для оценки склонности к гипергомоцистеинемии вместе с прямым скринингом гомоцистеина [4,7,9].

Прямой скрининговый анализ содержания гомоцистеина в физиологических жидкостях в настоящее время находит широкое диагностическое применение в зарубежной медицине. В Молдове определение гомоцистеина никаким методом не осуществляется.

Все изложенное обуславливает необходимость контроля содержания этой аминокислоты в плазме крови и моче с помощью хроматографического анализа. В лаборатории жидкостной хроматографии экспериментально были подобраны условия, дающие возможность детектировать пик гомоцистеина с помощью аминокислотного анализатора.

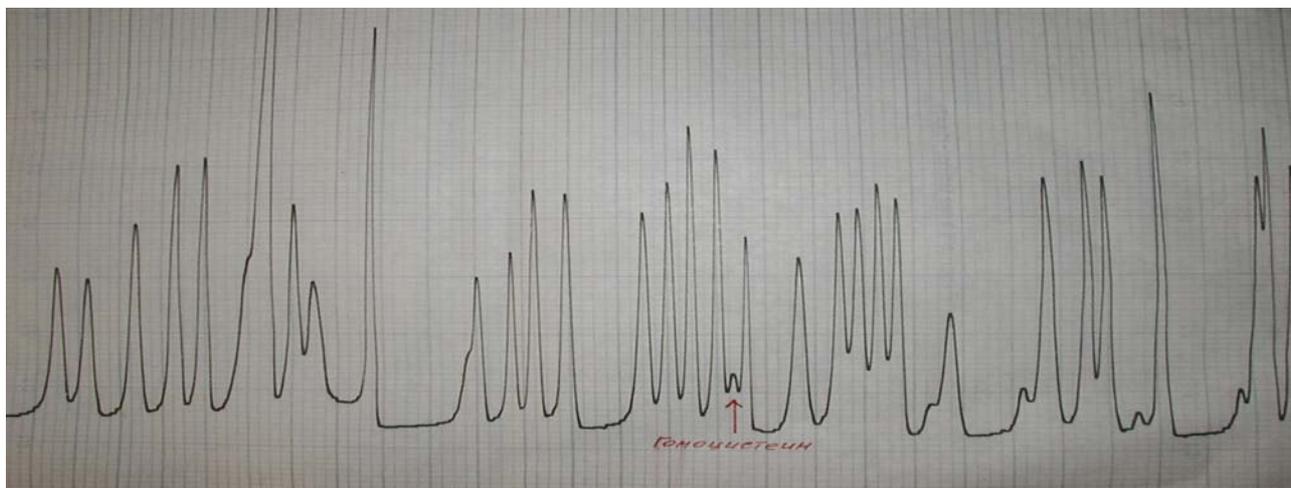
Технические условия анализа:

- высота хроматографической колонки 23 см;
- ионит LG-FA;
- рабочая температура хроматографической колонки 58° С;
- проточность буфера 13 мл/час;
- общая длительность анализа 270 мин.

На хроматограмме пик гомоцистеина фиксируется между пиками цистина и метионина на 82 минуте анализа.

Диапазон определяемых концентраций данного метода обусловлен чувствительностью прибора и составляет 1- 100 нмоль. Воспроизводимость методики – 6%.

Используемый для анализа аминокислотный анализатор ААА-339М (Чехия) дважды в год проходит метрологический контроль.



Гомоцистеин вымывается IV буфером pH 4,6. Данный литиевый буфер имеет следующий состав:

- 1) лимонная кислота 8,834 г/л;
- 2) цитрат лития 16,346 г/л;
- 3) хлористый литий 15,777 г/л.

Приготовление стандартного раствора гомоцистеина.

В химическом стакане на аналитических весах взвешивают 16,898 мг хроматографически чистого сухого D,L-гомоцистеина ($C_4H_9NO_2S$) и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, наполовину заполненную деионизированной дистиллированной водой. После полного растворения гомоцистеина содержимое колбы заполняют водой до метки. Полученному раствору приписывают концентрацию 2,5 мкмоль/1 мл раствора и используют как калибровочный раствор.

Подготовка образцов.

Плазма крови.

В центрифужную пробирку отбирают 1 мл сыворотки крови, взятой натощак из локтевой вены, добавляют равный объем 6%-ной сульфосалициловой кислоты, перемешивают и ставят в холодильник на 1 час для полного осаждения белков. Затем экстракт центрифугируют при 8000 об/мин в течение 20 мин. Надосадочную жидкость сливают в выпаривательную колбу и осуществляют отгонку на роторном испарителе при 45°С. Сухой остаток трижды промывают дистиллированной водой и перерастворяют в 1 мл литиевого стартового буфера pH 2,2. Хранят в морозильнике.

Источником ошибок при количественном исследовании гомоцистеина является неправильный отбор образцов плазмы для исследования. После взятия крови в эритроцитах продолжается синтез и

секреция гомоцистеина, в результате чего его содержание в крови с течением времени повышается (до 15% в час), причем степень повышения зависит от температуры [6]. Концентрация гомоцистеина в готовых образцах плазмы крови стабильна в течение суток при комнатной температуре, нескольких недель при +4°C и до года при -20°C. После получения крови образцы необходимо немедленно поместить на лед, а красные клетки крови в возможно более короткий срок удалить с помощью центрифугирования [3, 4].

Моча.

Проба, предлагаемая для анализа, как правило, отбирается из мочи, собранной за 24 часа. Определяют общий объем мочи и отбирают для анализа 5 мл. При хранении мочи в течение 2-3 дней ее помещают в морозильную камеру. Перед анализом пробу нагревают до комнатной температуры и подкисляют до pH 2,25 с помощью 6N HCL.

В норме у взрослых уровень гомоцистеина в плазме крови составляет 5-14 мкмоль/л, у детей и подростков – до 5 мкмоль/л. В течение жизни средний уровень гомоцистеина увеличивается на 3-5 мкмоль/л. У мужчин уровень этой аминокислоты на 20% выше, чем у женщин. Гомоцистеинемия диагностируется при содержании гомоцистеина в плазме крови более 15 мкмоль/л. Литературные данные относительно содержания гомоцистеина в моче отсутствуют.

Уровень гомоцистеина практически не зависит от питания перед исследованием, однако потребление пищи, излишне богатой белками, может привести к увеличению концентрации гомоцистеина на 15-20% [8].

При трактовке результатов анализа необходимо иметь в виду, что на уровень гомоцистеина влияет прием целого ряда лекарств [9], в частности – противосудорожных, сахаропонижающих препаратов, цитостатиков. Механизм их действия может быть связан с влиянием их на биохимическую активность витаминов, на функцию почек и на уровень гормонов. Особенное значение имеют метотрексат, который является антагонистом фолиевой кислоты и часто применяется для лечения псориаза. Противосудорожные препараты также опустошают запасы фолиевой кислоты в печени. Закись азота, которая используется для наркоза и при обезболивании родов, инактивирует витамин B₁₂, а метоморфин, использующийся для лечения сахарного диабета, влияет на всасывание этого витамина. Эуфиллин подавляет активность витамина B₆, его часто применяют в акушерской практике для лечения гестозов [4].

Осуществляя диагностический поиск, необходимо иметь в виду, что к причинам увеличения содержания гомоцистеина относятся следующие:

1. Генетические дефекты, приводящие к неполноценности ферментов, ответственных за метаболизм этой аминокислоты.
2. Недостаток поступления с пищей витаминов – кофакторов ферментов, необходимых для полноценного метаболизма гомоцистеина (фолиевая кислота, витамины группы B), восполнение которых может привести к нормализации его концентрации.
3. Ряд сопутствующих заболеваний.
4. Использование некоторых лекарственных препаратов.
5. Курение.

Селективный скрининг на гомоцистеинурию рекомендуется [1,2,] следующим категориям больных:

- со скелетными аномалиями (марфаноидный фенотип);
- с поражением глаз;
- кардиоваскулярной патологией;
- цереброваскулярной патологией;
- умственной отсталостью;
- шизофренией;
- тромбозами и тромбоземболиями;
- острыми панкреатитами;
- сахарным диабетом;
- женщинам, планирующим беременность, с отягощенным акушерским анамнезом;
- с целью пренатальной диагностики плода;
- лицам, получающим терапию препаратами, которые могут привести к повышению уровня гомоцистеина в крови;

- имеющим наследственную предрасположенность к атеросклерозу;
- пациентам, перенесшим операцию на желудке;
- лицам, у родственников которых были инсульты, инфаркты и тромбозы в возрасте до 45 лет.

Необходимо добавить, что в качестве дополнительного теста оценки склонности к гипергомоцистеинемии возможно определение толерантности к метионину. При проведении теста дают метионин внутрь в дозе 0,1 г/кг массы тела. До нагрузки, а также через 6, 24 и 48 часов после нее, измеряют содержание гомоцистеина. Концентрация гомоцистеина достигает максимума через 6 час после введения метионина. У здоровых лиц максимальный уровень гомоцистеина не превышает 30 мкмоль/л и его снижение происходит быстрее, чем у пациентов, склонных к гипергомоцистеинемии.

К общему числу пациентов, у которых гипергомоцистеинемия выявляется прямым скринингом крови, взятой натощак, использование нагрузки метионином позволяет выявить дополнительно еще более 25% лиц, склонных к гипергомоцистеинемии.

Таким образом, диагностика гипергомоцистеинемии является важным методом своевременной профилактики и лечения большого числа синдромов. Ионнообменная жидкостная хроматография, в частности, аминокислотный анализатор ААА 339М, является адекватным методом для скрининга гипергомоцистеинемии и гипергомоцистинурии в физиологических жидкостях.

Литература:

1. Вельтищев Ю.Е., Бочков Н.П. Наследственная патология человека. - Москва, 1995. - 239 с.
2. Козлова С.И. Наследственные синдромы и медико-генетическое консультирование. - Москва, 1995. - 410 с.
3. Шевченко О.П., Олефиренко Г.А. Гипергомоцистеинемия и её клиническое значение // Лаборатория. - 2002. - №1. - С.3-7.
4. Шевченко О.П., Олефиренко Г.А., Червякова Н.В. Гомоцистеин. - Москва, 2002. - 47 с.
5. Gerritsen T., Waisman H. Homocystinuria, an error in the metabolism of methionine // Pediatrics. - 1964. - Vol.33. - P.413-420.
6. McCaddon A., Davies G., Hudson P. Total serum homocysteine in senile dementia of Alzheimer type. Int. L. Geriatr // Psychiatry. - 1998. - Vol.13. - P.235-239.
7. Pogribna M., Melnic S., Pogribny I. Homocysteine metabolism in children with Down syndrome: in vitro modulation // Amer. J. Hum. Genet. - 2001. - Vol.69. - No1. - P.5-14.
8. Ubbink J., Vermaak W., Hayward J. The effect of blood sample aging and food consumption on plasma total homocysteine levels // Clinica Acta. - 1992. - Vol.207. - P.119-128.
9. Ueland P., Refsum H., Brattstrom L. Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: plasma levels in health, disease and drug therapy // J. Lab. Clin. Med. - 1989. - Vol.114. - P.473-501.

Prezentat la 10.12.2007