



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Sciences

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

## Vliv preanalytické fáze na enzymatické stanovení homocysteinu

# BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ

**Autor:** Eva Vosátková

**Vedoucí práce:** RNDr. Jana Plchová, Ph.D.

České Budějovice 2021

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „Vliv preanalytické fáze na enzymatické stanovení homocysteinu“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 12.8.2021 .....

podpis

### **Poděkování**

Tímto bych ráda poděkovala své vedoucí práce paní doktorce RNDr. Janě Plchové Ph.D za věcné rady a podporu při psaní bakalářské práce. Zároveň bych chtěla poděkovat vedení OKB Nemocnice Rudolfa a Stefanie Benešov a.s., vrchní laborantce Michale Bendové a paní doktorce RNDr. Janě Kalousové, a to za poskytnutí potřebného materiálu a vzorků k vypracování této práce.

## Vliv preanalytické fáze na enzymatické stanovení homocysteinu

### Abstrakt

Homocystein je jednou z vyšetřovaných látek, jejichž zvýšené hodnoty slouží jako možný ukazatel rizika vzniku kardiovaskulárních chorob. Jeho hladina je zjišťována také při deficitu vitamínu B12 a folátu či při podezření na dědičné metabolické poruchy. Homocystein je poměrně nestabilní, a proto je při zjištění jeho hladiny důležité dbát na dodržení správného preanalytického postupu. Ke stanovení hladiny homocysteinu se využívají různé analytické metody. V této práci bylo použito enzymatické stanovení hladiny homocysteinu v plazmě na automatizovaném biochemickém analyzátoru. Cílem této práce je poukázat na důležitost preanalytické fáze při laboratorních vyšetřeních biologického materiálu. Byla sledována koncentrace homocysteinu ve vzorcích, které byly zpracovány po uplynutí různého časového intervalu od odběru krve. Naměřené hodnoty koncentrací homocysteinu v plazmě ukázaly, že s narůstající časovou prodlevou mezi odběrem vzorku a samotným zpracováním, dochází k narušení stability stanovovaného analytu. Při skladování nezpracovaných vzorků došlo ke zvýšení koncentrací homocysteinu v průměru o 60% za 24 h. Rovněž byla ověřována stabilita plazmatického homocysteinu u vzorků zpracovaných bezprostředně po odběru krve a zanechaných při laboratorní teplotě.

**Klíčová slova:** homocystein, hyperhomocystenémie, preanalytická fáze, enzymatická metoda

# **Effect of preanalytical phase on enzymatic determination of homocysteine**

## **Abstract**

Homocysteine is one of the investigated substances, which increased values serve as a possible indicator risk of development cardiovascular disease. Its level is also determined in case of vitamin B12 and folate deficiency or suspicion of hereditary metabolic disorders. Homocysteine is relatively unstable, therefore is important to follow the correct preanalytical procedures during determination. Various analytical methods are used for this purpose. Enzymatic determination on an automated biochemical analyzer was used in this work. The aim of this work is to point out the importance of the preanalytical phase in laboratory examinations. The homocystein concentration was measured in samples with prolonged time between blood collection and their own processing. The measured values showed, that with the increasing time lag between sampling and processing, the stability of the determined analyte was impaired. The homocysteine concentration was increased on 60% during 24 hours by storing of unprocessed blood sample. Also, monitoring the stability of plasma homocysteine in samples processed immediately after blood collection and left at laboratory temperatures.

**Key words:** homocysteine, hyperhomocysteinemia, preanalytical phase, enzymatic method

## Obsah

1. Úvod .....	8
2. Homocystein .....	9
2.1 <i>Obecné vlastnosti</i> .....	9
2.2 <i>Metabolismus homocysteinu</i> .....	10
2.3 <i>Hyperhomocysteinémie</i> .....	12
2.4 <i>Indikace k vyšetření</i> .....	14
2.5 <i>Analytické metody stanovení homocysteinu</i> .....	15
3. Fáze laboratorního vyšetření .....	17
3.1 <i>Preanalytická fáze</i> .....	17
3.1.1 Pacient .....	17
3.1.2 Odběr vzorku .....	18
3.1.3 Transport vzorku do laboratoře .....	19
3.1.4 Identifikace vzorků .....	20
3.1.5 Příprava vzorků k analýze .....	20
3.1.6 Skladování vzorků .....	21
3.2 <i>Analytická fáze</i> .....	21
3.2.1 Analytické laboratorní metody .....	21
3.2.2 Kontrola kvality, validace a verifikace .....	22
3.2.3 Analytické vlastnosti metod .....	22
3.3 <i>Postanalytická fáze</i> .....	24
3.4 <i>Stanovení homocysteinu – preanalytická fáze</i> .....	24
4. Experimentální část .....	25
4.1 <i>Cíle práce</i> .....	25
4.2 <i>Hypotézy</i> .....	25
4.3 <i>Metodika</i> .....	25
4.3.1 Pokusné osoby .....	25
4.3.2 Odběr a zpracování vzorků .....	25
4.3.3 Kalibrace a kontrola kvality .....	26
4.3.4 Přístrojová technika .....	26
4.3.5 Reagencie .....	27
4.3.6 Princip metody .....	27
5. Výsledky .....	29
5.1 <i>Výsledky kalibrace a kontroly kvality</i> .....	29

5.2	<i>Výsledky měření</i> .....	30
5.2.1	Analýza homocysteinu a stabilita analytu .....	30
5.2.2	Porovnání a výpočty z naměřených hodnot.....	34
6.	Diskuze .....	40
7.	Závěr.....	42
8.	Seznam literatury .....	43
9.	Seznam příloh .....	48
9.1	<i>Tabulky</i> .....	48
9.2	<i>Obrázky</i> .....	48
9.3	<i>Seznam zkratk</i> .....	49

## 1. Úvod

V současné době laboratoře, a zejména laboratoře klinické biochemie, zpracovávají velké množství vzorků. Je proto třeba klást důraz na preanalytickou část laboratorního vyšetření. To je důležité právě při správném stanovení hladiny homocysteinu. Jednoduchá aminokyselina obsahuje síru a vzniká při metabolismu sirných aminokyselin. Fyziologicky je tato látka důležitá pro řadu biochemických pochodů v těle, například dodává methylové skupiny do reakcí buněčného dýchání. Zvýšené hladiny tohoto analytu působí toxicky. Příkladem je stimulace volných kyslíkových radikálů homocysteinem, které pak mohou poškozovat stěnu cévy. Nedbale provedená preanalytická část vyšetření může vést k falešně pozitivním výsledkům, a tudíž interpretace výsledků pacientovi může být chybná. Enzymatické stanovení homocysteinu je dostupná metoda pro běžné biochemické laboratoře a při správném postupu je nenáročná a spolehlivá. Nejčastěji se k analýze používají vzorky krevní plazmy.

V této práci je zdůrazněn význam preanalytické fáze laboratorního vyšetření od přípravy pacienta na odběr krve, až po vložení vzorků do plně automatického analyzátoru. Měřené budou hladiny homocysteinu v krevní plazmě v různých časových intervalech mezi odběrem a vlastním zpracováním vzorku, a sledovány rozdíly naměřených koncentrací. Výsledky ukážou maximální časovou prodlevu mezi odběrem a zpracováním vzorku, která ještě neovlivní výsledek. Podle výsledků může být případně upraven nebo doplněn laboratorní postup u těchto typů vyšetření.



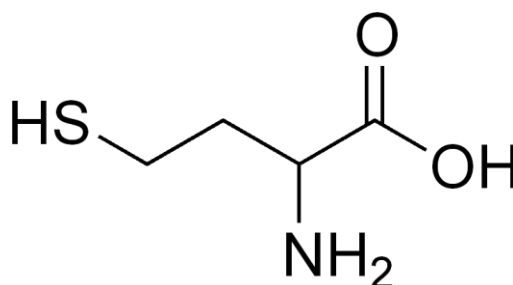
## 2. Homocystein

### 2.1 Obecné vlastnosti

Homocystein, 2-amino-4-merkaptomáselná (sulfanylbutanová) kyselina -  $\text{HS}(\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ , je jednoduchá neesenciální 4-uhlíkatá aminokyselina obsahující síru. Vzniká jako mezičlánek biochemického nitrobuněčného metabolismu esenciálních aminokyselin methioninu a cysteinu. Fyziologicky se homocystein vyskytuje v organismu ve více formách. Největší část tvoří homocystein vázaný disulfidickou nebo amidovou vazbou na proteiny (70-90%), nejčastěji na albumin a  $\gamma$ -globuliny (Brosnan a Brosnan 2006). Další část se vyskytuje v oxidované formě, disulfidickým můstkem je spojen s druhou molekulou homocysteinu, nebo s jinou aminokyselinou jako smíšený disulfid, v redukované formě a pouze malá část jako volný tzv. free homocystein (1-2%) (Jakubowski 2002).

Homocystein byl poprvé objeven a popsán v americké laboratoři biochemiky Butzem a Vigneaudem roku 1932. Později byl v téže laboratoři vytvořen homocystein také synteticky. Nejprve byl homocystein považován jen za další molekulu důležitou v řadě biochemických reakcí organismu, s diagnostikou kardiovaskulárních onemocnění začal být spojován až po dlouhé řadě let výzkumů. Byl objeven nejen v buňkách živočichů, ale i rostlin nebo bakterií (Přistoupilová et al. 1999).

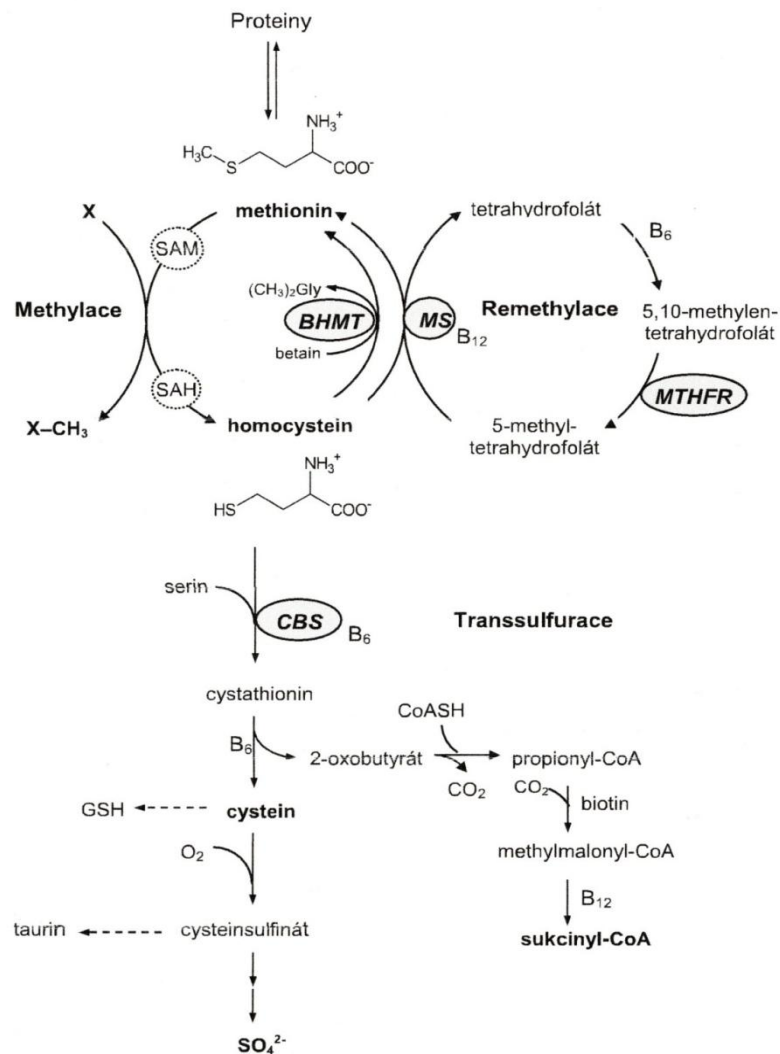
V lidském organismu se homocystein vyskytuje jak v buňkách, tak tělních tekutinách. Charakteristické vlastnosti homocysteinu určuje velikost molekuly, tvar a reaktivní sulfhydrylová skupina – SH. Podobně jako v případě sulfhydrylové skupiny i reakce homocystein-thiolátového aniontu mohou vést k tvorbě volných radikálů. Tento vodíkový atom reaguje rychle, snadno a agresivně s řadou dalších molekul (Škovierová et al. 2016).



Obrázek 1 - Vzorec homocysteinu

## 2.2 *Metabolismus homocysteinu*

Jak již bylo zmíněno, homocystein je neesenciální aminokyselina, která není součástí bílkovin, nemůže být tedy přijat potravou. Vzniká z proteinogenní aminokyseliny methioninu (Bolander-Gouaille a Bottiglieri 2003).



Obrázek 2- Schéma metabolismu homocysteinu (Králíková 2011)

Na správném fungování metabolických reakcí homocysteinu se podílí tři hlavní enzymy, methylen-tetrahydrofolát-reduktáza MTHFR, metyl-tetrahydrofolát-homocystein-methyltransferáza MTHFHMT a cystathionin- $\beta$ -syntáza CBS. Následně tři koenzymy, metylhydrofolát odvozený od kyseliny listové, metylecyanokobalamin odvozený od vitamínu B12 a pyridoxalfosfát odvozený od vitamínu B6. Remethylylace homocysteinu se v játrech a ledvinách může účastnit také betain-homocystein-

metyltransferáza BHMT (Pokorný 2015). Nedostatek nebo nefunkčnost některého z těchto enzymů a koenzymů může vést k poruchám metabolismu homocysteinu. Následně dochází k hromadění homocysteinu, a jeho zvýšená koncentrace v plazmě se nazývá hyperhomocysteinémie (Racek 2006).

Homocystein vzniká štěpením esenciální biogenní aminokyseliny methioninu působením výše zmíněných enzymů a koenzymů. Nejprve dochází k přeměně methioninu na aktivovaný S-adenosylmethionin (SAM), což je katalyzováno příslušnou transferázou. Tato reakce je energeticky velmi náročná, jako zdroj energie slouží ATP. S-adenosylmethionin se dále přemění na S-adenosylhomocystein odštěpením methylové skupiny a následně dojde k přeměně na samotný homocystein (Špička 2004). Ten může vstupovat do reakce, při které dochází ke sloučení s neesenciální biogenní aminokyselinou serinem katalyzované enzymem cystationin- $\beta$ -syntázou za vzniku cystationinu, po odštěpení homoserinu dojde ke vzniku cysteinu (Friedman et al. 2001).

Homocystein je z těla odbouráván třemi různými způsoby. První způsob je remethylace zpátky na methionin, která probíhá ve všech buňkách organismu. Druhý, již zmíněný způsob, je trassulfurace na cystein, k níž dochází v buňkách jater, ledvin, slinivky a střev. Třetí způsob je též remethylace na methionin buňkami jater a ledvin. Katalyzátorem této reakce je betain-homocystein-methyltransferáza (Pokorný 2015). Pokud dojde k poruše přirozeného odbourávání vzniklého homocysteinu z těla, jeho hladina se zvyšuje a je pro lidský organismus toxická. Toxicita homocysteinu působí například na cévy. Narušení stěny tepen a žil může vést k vyššímu riziku vzniku kardiovaskulárních onemocnění (Erben 2015).

Je několik teorií, jakým způsobem by mohl patologicky homocystein v organismu působit. Homocystein-thiolakton, jedna z forem homocysteinu, může vzniknout chybnou reakcí z methioninu, a je pak místo něj chybně zapojován do proteinů. Protein-lysinové zbytky s navázaným homocysteinem pak snižují schopnost polymerace kolagenu působením extracelulárního enzymu lisyloxydázy. Jeho zvýšená koncentrace zapříčiňuje rozpad disulfidových můstků aminokyseliny cysteinu. Hromaděním monomerů pak dochází k proliferaci buněk hladkého svalstva cév, a to způsobuje předčasné cévní, ale i kostní změny (Hyánek J. et al. 2009).

Jiná teorie zdůrazňuje vliv homocysteinu na produkci oxidu dusného, který působí vazokonstrikčně, a to pomocí inaktivace enzymu odbourávajícího inhibitor syntézy oxidu dusnatého (Racek 2006).

Nejspíše je homocystein zapojen ve více mechanismech, které vedou

k patofyziologickým změnám – poškození endotelu, zkrácení životnosti trombocytů, snížení fibrinolýzy, nebo vznik volných radikálů (Ganguly a Alam 2015).

### 2.3 *Hyperhomocysteinémie*

Hyperhomocysteinémií nazýváme zvýšenou hladinu homocysteinu nad referenční hodnoty, její příčina může být různá. Referenční rozmezí u fyziologického nálezu je rozděleno podle věku:

Tabulka 1- Referenční rozmezí homocysteinu

	μmol/l	μmol/l
děti do 15-ti let	5	10
15 – 65 let	5	15
nad 65 let	5	20

Hyperhomocysteinémií dělíme na tři typy podle výše hladiny homocysteinu v plazmě, na mírnou (16-30μmol/l), střední (31-100 μmol/l) a těžkou (>100 μmol/l) (Racek 2006).

Hyperhomocystémií můžeme rozdělit i podle jejího vzniku na vrozenou a získanou. V obou případech nedochází k dostatečnému metabolizování homocysteinu v remethylačním enzymatickém cyklu methioninsyntázy. Příčinou je buď vrozená porucha jednotlivých enzymů, nebo z deficitu enzymatického mechanismu kvůli nedostatku enzymů a koenzymů (Carmel 2011).

V průběhu šedesátých let byla pozorována a popsána dědičná choroba u pacientů postižených nadměrným hromaděním homocysteinu a methioninu v krevní plazmě a moči - homocystinurie. Příčinou byla porucha enzymu cystationin-β-syntázy, který se uplatňuje při přeměně homocysteinu na cystein, přesněji na meziproduct cystationin. Příznaky této nemoci zahrnují zpomalený psychický vývoj, defekt tvorby kostí, kardiovaskulární onemocnění, což vede k předčasné smrti v útlém věku do 30 let. U této nemoci dosahují hodnoty homocysteinu v tělních tekutinách (moč, krevní plazma) vysokých hodnot >100μmol/l (McCully 1999). U pacientů trpících homocystinurií (celosvětový poměr výskytu 1:200 000) je typickým nálezem tzv. rybích obratlů na páteři, dlouhých kostech a lebce (Al-Sadeq a Nasrallah 2020). Pacienti s mírnou

nebo střední hyperhomocysteinémií trpí zvýšenou křehkostí kostí o 40 – 200%. Podle studií se u nedostatku vitamínu B6 a B12 také vyskytují změny minerálního metabolismu kostí, deficit vitamínu D a značně snížená hustota kostní tkáně (Hyánek J. et al. 2009).

V roce 1969 byly pozorovány děti s homocystinurií, u kterých docházelo k předčasnému úmrtí v důsledku aterosklerózy a trombotických stavů. Doktor McCully navrhl termín hyperhomocysteinemia jako nezávislý rizikový kardiovaskulární faktor. Od této doby pokračoval výzkum a ukazovalo se, že i mírně zvýšená hladina homocysteinu v krvi se vyskytuje u ischemické choroby srdeční, stenózy periferních tepen, cévní mozkové příhody a žilní trombózy (Lai a Kan 2015).

Hyperhomocysteinémie, mírná až střední, má zpravidla jiné příčiny, než pouze defekt enzymu. Vznik a výskyt hyperhomocysteinémie ovlivňují také další faktory, jako jsou věk, pohlaví, dieta (veganství) nebo etnická příslušnost (Hyánek J. et al. 2009).

Relativně častými a poměrně snadno terapeuticky řešitelnými jsou deficity kofaktorů enzymů účastnících se metabolismu homocysteinu, které souvisí s nedostatkem vitamínů. K deficitu vitamínu B12 dochází především u poruchy absorpce, onemocnění žaludku nebo střev (př. Crohnova choroba, celiakie, chronická gastritida), případně u sníženého příjmu potravy (dieta založená na vegetariánství a veganství). Zdroje vitamínu B12 jsou hlavně živočišného původu, přirozeně se vyskytuje v mase, vnitřnostech, mléčných výrobcích a rybách. Člověk má v játrech zásobu vitamínu B12 na několik let, proto se jeho nedostatek může projevit až za nějaký čas. Mezi klinické příznaky patří megaloblastová anémie a neuropatie (Andrès et al. 2004).

Deficit vitamínu B9 - kyseliny listové nastává při nedostatečném příjmu potravy. Kyselina listová se nachází v živočišné i rostlinné stravě, lidský organismus si ji neumí syntetizovat sám. Klinickými projevy deficitu folátu jsou např.: megaloblastová anémie, zánět bukalní sliznice a sliznice jazyka, malabsorpce. Výrazný nedostatek může vést až ke sterilitě u obou pohlaví. U gravidity se doporučuje dodržet doporučenou denní dávku 400 µg/den, protože byla zjištěna spojitost mezi nedostatkem kyseliny listové a špatným vývojem neurální trubice v 1. a 2. trimestru těhotenství (Stránský 2011).

Deficit pyridoxinu - vitamínu B6 vzniká též u nedostatečného příjmu potravy, častěji u vegetariánů. Vitamin B6 je důležitým kofaktorem u mnoha biochemických procesů, nejčastěji metabolismus aminokyselin (transaminace, dekarboxylace). Dále je

vitamin B6 nezbytný pro syntézu hemu. Jeho nedostatek se klinicky může projevit jako mikrocytární anemie u fyziologických hodnot železa, křečové stavy nebo nespecifická dermatitida (Hellmann a Mooney 2010).

Fyziologicky dochází k zvyšování hladiny homocysteinu v plazmě s věkem. Důvodem je pokles glomerulární filtrace u starší populace a snižování koncentrace vitaminů skupiny B (Hyánek J. et al. 2009).

Dalším případem zvýšené hladiny homocysteinu mohou být stavy po dlouhých a rozsáhlých operacích. Oxid dusný  $N_2O$  je součástí celkové anestezie, zvyšuje koncentraci homocysteinu v plazmě, tento účinek je větší s delším trváním anestézie. Zvýšení koncentrace homocysteinu v plazmě vyvolané  $N_2O$  může způsobit závažné pooperační komplikace a být příčinou postoperativní mortality (Myles et al. 2008).

Genetická zatíženost pro vznik hyperhomocysteinémie je homozygotní nebo heterozygotní mutace MTHFR. Mutace 677CT je nejčastějším genetickým polymorfismem. Jedinci s genotypem 677TT mají o 2,5  $\mu\text{mol/l}$  vyšší hladinu celkového homocysteinu než ti s variantou 677CC. Další častou mutací MTHFR je záměna A za C na pozici 1298. Obě tyto mutace mají za následek snížení aktivity enzymu, což může vést ke vzniku mírné hyperhomocysteinémie (Hyánek J. et al. 2017).

Záleží také na hladině folátu a riboflavinu. Vitamin B2 je prekurzorem FAD a kofaktorem MTHFR. Ve studiích se uvádí, že jedinci s genotypem CT a TT pro mutaci MTHFR 677CT mají riboflavin v plazmě jako nezávislý ukazatel fyziologie nebo patologie celkového homocysteinu. Samostatné studie ukazují, že mutace MTHFR může omezovat vazbu FAD, což vede k její disociaci od enzymu MTHFR. Jak riboflavin, tak kyselina listová mohou chránit před ztrátou funkce enzymu MTHFR (Moat et al. 2003).

Většina dalších genetických polymorfismů v enzymech souvisejících s homocysteinem má malý vliv na jeho koncentraci v plazmě (Refsum et al. 2004).

#### **2.4 Indikace k vyšetření**

Z lékařského hlediska je vyšetření hladiny homocysteinu kromě diagnostiky homocystinurie pouze nezávislým rizikovým faktorem různých typů onemocnění. K jeho indikacím dochází nejčastěji z následujících důvodů:

- diagnostika vrozených metabolických poruch homocysteinu zejména u dětí a mladistvých (homocystinurie)

- rozpoznání pacientů s deficitem vitamínu B6, B12 a kyseliny listové a monitoring léčby pacientů s deficitem vitamínů B12 a kyseliny listové (Ueland a Schneede 2008)
- marker ke stanovení rizika vzniku kardiovaskulárních onemocnění (infarkt myokardu, ischemická choroba srdeční, aj)(Zhang et al. 2020)
- renální poškození (dialyzovaní pacienti)(Lai a Kan 2015)
- nezávislý faktor pro vznik různých forem demence (Alzheimerova choroba)
- zdůvodnění trombózy pacientů s fyziologickými hodnotami hemokoagulačních parametrů
- u těhotných v případech novorozeneckých defektů (Downův syndrom, defekty neurální trubice)(Refsum et al. 2004)
- pooperační hyperhomocysteinémie (Myles et al. 2008)

## 2.5 *Analytické metody stanovení homocysteinu*

V počátcích vyšetřování hladiny homocysteinu bylo obtížné zvolit správnou analytickou metodu. Jelikož je homocystein podobný více aminokyselinám nebo látkám se sulfhydrylovou – SH skupinou, docházelo k interferencím s těmito látkami. Nejprve byla nutná separace homocysteinu od podobných látek, a teprve poté následovala kvantitativní analýza homocysteinu. V současné době jsou již metody pro stanovení koncentrace homocysteinu zkrácené a zcela automatizované (Přistoupilová et al. 1999).

Stanovení homocysteinu patří mezi běžné rutinní vyšetření laboratoří klinické biochemie. Nejčastěji se analyzují vzorky krevní plazmy. Vyšetření homocysteinu z jiných tělních tekutin (mozkomíšni mok, semeno, aj) se běžně neprovádí, je součástí zejména výzkumu (Vodová 2010).

Ke stanovení hladiny homocysteinu se využívají různé analytické metody např.: chromatografie (kapalinová, plynová), kapilární elektroforéza, imunoanalýza, enzymatické metody a další.

Chromatografie je fyzikálně-chemická separační metoda. Hlavní výhodou je stanovení různých frakcí homocysteinu během jedné analýzy. Molekuly analytu se rozdělí mezi 2 části, mobilní (pohyblivou) a stacionární (pevnou) fázi.

Chromatografické analytické metody dělíme podle typu použité mobilní fáze na kapalinovou a plynovou (Humplíková S. et al. 2007). Používají se různé typy chromatografie, nejčastěji vysokoúčinná kapalinová chromatografie - HPLC s různými

typy detekce. Někdy k analýze slouží i plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (Králíková 2011).

Často využívanou metodou pro stanovení celkového homocysteinu je vysokoúčinná kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí. Nejprve musí dojít k derivatizaci thiolů homocysteinu v plazmě, poté následuje HPLC a jako fluorogenní látka se používá amoniak-7-fluorbenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-sulfonát. Výhodou je stabilita sloučenin a vysoká fluorescence (Ashavaid et al. 2003).

Dalším typem je kapalinová vysokoúčinná chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Výhodou je zkrácení analýzy vynecháním časově náročné derivatizace plazmy, která je potřeba u HPLC s fluorescenční detekcí. Jako nízkomolekulární redukční činidlo se používá 1,4-dithiothreitol. Tato metoda je vhodná pro stanovení hladiny celkového homocysteinu v plazmě i moči. Závěrečná analýza je uskutečněna pomocí hmotnostního spektrometru MS/MS (Humplíková S. et al. 2007).

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s fotometrickou detekcí je metoda založená na shlukování nanočástic zlata, ty jsou indukovány homocysteinem nebo cysteinem a následně snižují absorpci při vlnové délce 525 nm nebo zvýší absorpci při vlnových délkách 600 – 700 nm. Výhodou je stabilita a selektivita (Lu et al. 2007).

Kapilární elektroforéza je další používaná analytická separační metoda. Vzorek se pohybuje v elektrickém poli a rozděluje se podle rychlosti elektricky nabitých částic. U stanovení homocysteinu využívá thiolové skupiny (Ducros et al. 2002). Tato metoda je výhodná hlavně proto, že k samotné analýze je potřeba jen velmi malé množství vzorku. Kapilární elektroforéza ke stanovení homocysteinu využívá detekce laserové indukované fluorescence. Je to dostatečně citlivá metoda pro stanovení i velmi nízkých hladin analytu (Švábiková 2016).

Imunoanalytické stanovení homocysteinu je další analytickou metodou. Obecně jsou imuno-metody založené na reakci antigenu s protilátkou za vzniku komplexu, kdy jedna z těchto částí musí být označena pro následnou kvantitativní analýzu. Pro stanovení homocysteinu se používá chemiluminiscenční imunoanalýza, kde je indikátorem chemiluminiscenční barvička (Švábiková 2016).

Enzymatická stanovení homocysteinu jsou oblíbená pro svou jednoduchost a finanční dostupnost, proto jsou často využívány v rutinním provozu laboratoří klinické biochemie. Dochází u nich k několika po sobě jdoucích reakcí za vzniku produktů, které můžeme kvantifikovat. Publikovány jsou například aplikace na analyzátoře firmy Roche, které budeme využívat v praktické části této práce (Dubská, Hyánek, 2009)



### 3. Fáze laboratorního vyšetření

Laboratorní vyšetření biologického materiálu je nedílnou součástí diagnostiky pacienta. Výsledky, které laboratoř vydává, slouží nejen k diagnostickým účelům, ale také k průběžnému monitorování zdravotního stavu pacienta. Určují prognózu daného onemocnění a pomáhají při rozhodování týkající se další léčby. Existují též laboratorní vyšetření, která se provádí při preventivních prohlídkách nebo screeningu (Matouš 2010).

Klinická biochemie poskytuje 60 – 70% informací o stavu pacienta v rámci oborů laboratorní medicíny. Tato vyšetření jsou poměrně snadno dostupná a rychlá. Výsledky jsou většinou vyjádřeny číselnou hodnotou. Za správnost těchto výsledků laboratoř ručí, samozřejmě je dodržení správných postupů ve všech fázích laboratorního vyšetření (Čermáková a Štěpánová 2010).

Dělí se do tří částí – preanalytickou, analytickou a postanalytickou fázi. V každé z těchto tří fází může dojít k chybám, které mohou vést ke špatnému výsledku a až ke špatné diagnóze. Avšak nejčastěji dochází k těmto chybám právě v první, preanalytické fázi. Je to tím, že je nejdelší a nejvíce se zde uplatňuje lidský faktor (Racek 2006).

#### 3.1 *Preanalytická fáze*

Preanalytická fáze zahrnuje vše od doby, kdy lékař předepíše dané vyšetření až do samotné analýzy vzorku. Tato doba se ještě dělí na mimolaboratorní a laboratorní preanalytickou fázi, která začíná až převzetím vzorku laboratoří. Během tohoto času může výsledek ovlivnit řada faktorů.

##### 3.1.1 Pacient

Sám pacient je zatížen některými faktory, které nemůže ovlivnit. Mezi tyto faktory se řadí například pohlaví. Na výsledky většiny testů nemá vliv, ale u některých metod mají muži a ženy rozdílné referenční rozmezí (např. parametry krevního obrazu, železo, HDL–cholesterol, kyselina močová). Dalším faktorem je věk pacienta. Děti a dospělí mají fyziologicky jiná referenční rozmezí u některých vyšetřovaných analytů (př.: alkalická fosfatáza, kreatinin, urea, kyselina močová), s přibývajícím věkem také stoupá hladina některých analytů z důvodu zpomalení metabolických pochodů v těle (glomerulární filtrace, homocystein). Úplně jiná jsou referenční rozmezí některých analytů u novorozenců a kojenců (př.: albumin, celkový bilirubin, alkalická fosfatáza,

vápník, kyselina močová) (Racek 2006).

Fyziologicky nastávají změny v referenčních mezích také při graviditě žen. Při embryonálním vývoji se uvolňují do krve matky látky produkované trofoblastem nebo orgány plodu (př.: hCG, placentární alkalická fosfatáza, estrogény,  $\alpha$ -1 fetoprotein). Během těhotenství mají hormony vliv na některé běžné analyty (př.: hemoglobin, cholesterol, kreatinin, urea) (Racek 2006).

Biologický poločas stanovované látky je dalším neovlivnitelným faktorem. Jedná se o rychlost odbourávání látek z organismu, a je třeba ji zohlednit vždy u akutních nebo rychle se měnících stavů (př.: diagnostika infarktu myokardu podle aktivity enzymů a hladin svalových proteinů v séru). Stejně je to u probíhající nemoci, většinou chronické, která může mít za následek zvýšené hodnoty nesouvisející se současným akutním stavem pacienta, a tím ovlivnit diagnózu lékaře (př.: revmatoidní artritida a zvýšená hodnota C-reaktivního proteinu) (Guder a Narayanan 2015).

K dalším pacientem neovlivnitelným faktorům patří referenční rozmezí, jež je založeno na pravděpodobnosti, a proto část zdravé populace (většinou 5%) nemá hodnoty v referenčním rozmezí.

Na hladiny některých analytů mají vliv cyklické změny, a to buď denní, nebo měsíční (př.: kortizol, pohlavní hormony u žen). V závislosti na rase, etnické či sociální třídě obyvatel, jsou zjištěné různé četnosti onemocnění nebo genetické předpoklady pro metabolické poruchy (Racek 2006).

Na druhou stranu jsou jisté faktory, které pacient ovlivnit může. Těmi jsou hmotnost, jelikož nadváha může ovlivnit některé analyty (glykémie, cholesterol). Kouření působí na hladinu některých látek přímo (př.: fibrinogen, hemoglobin, železo) u některých působí na jejich metabolismus. Dieta může mít vliv na hladinu některých analytů (př.: jaterní enzymy ALT, AST, GGT). Během užívání léků mohou být vyšetření ovlivněna změnou rychlosti metabolismu stanovovaného analytu, nebo může docházet k interferenci reakcí. Při a po fyzické aktivitě se běžné hladiny některých látek v těle mění (př.: kreatininkináza, laktátdehydrogenáza, myoglobin, laktát, triacylglyceroly). Také operativní zákrok může ovlivnit některá biochemická vyšetření (př.: kreatininkináza, laktátdehydrogenáza, AST) (Young et al. 1975).

### 3.1.2 Odběr vzorku

Odběr vzorku biologického materiálu je dalším z ovlivnitelných faktorů

preanalytické fáze laboratorního vyšetření. Pro různá vyšetření jsou odebírány různé druhy biologického materiálu (př. krev, moč, stolice, sliny, mozkomíšní mok, výpotek, kostní dřeň). V laboratoři klinické biochemie se jako primární materiál využívá nejčastěji krev, u většiny analýz se jedná o venózní krev, ale některá vyšetření se provádí z kapilární či arteriální krve. Samotný odběr se různí podle charakteristiky odebíraného biologického materiálu, pacient musí být dostatečně poučen a připraven. V praxi se nejvíce provádí odběr venózní krve z loketní žíly. Dbá se na správnou polohu pacienta při odběru, nejčastěji je v sedě. Zaškrcení paže a cvičení by mělo být krátké (max 1 min.), na odběr se paže natáhne a škrtdlo uvolní po napíchnutí žíly. Po delší době zaškrcení paže může dojít k ovlivnění koncentrace a aktivity některých analytů. Je třeba se vyvarovat velkému podtlaku, aby nedošlo k mechanické hemolýze. Kapilární krev se odebírá z prstu nebo ušního lalůčku do skleněné nebo plastové kapiláry. Prohřátý prst (ušní lalůček) se nejdříve očistí alkoholem a malou jehlou lehce napíchne. Kapkou krve se pomalu naplní kapilára. Nejčastěji se takto provádí odběr na vyšetření glykémie či glykovaného hemoglobinu (prst) nebo hladina krevních plynů a acidobazická rovnováha (ušní lalůček) (Racek 2006).

Biologický materiál se pro snazší identifikaci odebírá do různých typů zkumavek. Zkumavky jsou odlišené velikostí a tvarem. Zkumavky na krev mají různobarevná víčka podle typu antikoagulačního činidla. Nejčastěji jsou používány uzavřené odběrové systémy (př. BD Vacutainer, Sarstedt). Při odběru většího množství krve je třeba dodržet správné pořadí zkumavek. Nejprve se odebírá krev do zkumavek bez protisrážlivého činidla, aby nedošlo ke kontaminaci dalších vzorků. Krev se nikdy nepřelévá ze zkumavky s protisrážlivým činidlem do zkumavky bez tohoto činidla (Zima T. 2008).

### 3.1.3 Transport vzorku do laboratoře

Transport biologického materiálu do laboratoře je dalším krokem preanalytické fáze. Měl by být vždy šetrný, co nejrychlejší a přizpůsobený nejen daným biologickým materiálům, ale i následnému typu vyšetření. Delší stání zkumavek s odebranou krví vystavené slunečnímu záření, a kontakt séra s krevními elementy, může ovlivnit koncentraci řady analytů. Odebraná krev by měla být uložena při adekvátní teplotě a vzorky určené k analýze některých analytů je doporučeno transportovat na tajícím ledu (např.: homocystein). V zimě je zase důležité, aby nedošlo k vystavení vzorků velkému

mrazu. Než dojde k transportu biologického materiálu do příslušné laboratoře, je dobré ho uchovávat v chladu při 4°C (Čermáková a Štěpánová 2010).

#### 3.1.4 Identifikace vzorků

Při příjmu biologického materiálu laboratoří začíná preanalytická fáze laboratorní. Nejprve dojde ke správnému popisu a identifikaci vzorku. Každý vzorek musí mít správně vyplněnou žádanku, která obsahuje jméno pacienta, identifikační (rodné) číslo, zdravotní pojišťovnu nebo doklad o zaplacení pokud jde o samoplátce, razítko lékaře a následně typ biologického materiálu a objednávku vyšetření.

Do laboratorního identifikačního systému (LIS) jsou zaevidovány informace ze žádanky. Vzorek je označen, nejčastěji štítkem s čárovým kódem, pod kterým je dále zpracováván. Výsledky analýzy se pak přenesou z analyzátoru přímo do LISu (Šálek T. et al. 2016).

Každá laboratoř má nastavený svůj vlastní vnitřní řád pro přijetí nebo odmítnutí biologického materiálu (laboratorní příručka – na základě normy ČSN EN ISO 15189), a proto se v základních bodech neliší. Laboratoř odmítne přijmout vzorek, pokud nastane některá z těchto situací: biologický materiál a žádanka, na které chybí nebo jsou nečitelné základní údaje a nelze je doplnit na základě dotazu; žádanka nebo odběrová nádoba znečištěna biologickým materiálem; materiál, u kterého došlo k porušení preanalytické fáze; neoznačenou nádobu s biologickým materiálem; biologický materiál bez žádanky (Kratochvíl J. et al. 2013).

#### 3.1.5 Příprava vzorků k analýze

V laboratoři klinické biochemie se analyzuje více druhů biologického materiálu. Příkladem je krev, moč, mozkomíšní mok, stolice a další tělní tekutiny. Nejčastějším vzorkem bývá sérum získané ze srážlivé krve. Krev se po odebrání musí nechat srazit 5 – 10 minut při laboratorní teplotě, poté se oddělí tekutá složka od buněčné. K centrifugaci by mělo dojít nejpozději do dvou hodin po odběru. Dřívější separace vede ke srážení již odděleného séra z důvodů aktivace fibrinogenu. Problém někdy nastává u pacientů s trombózou, protože užívají léky na ředění krve a ty zpomalují srážení i po odběru krve. Vysoké otáčky nebo delší doba centrifugace může zapříčinit částečnou nebo úplnou hemolýzu (Guder a Narayanan 2015).

### 3.1.6 Skladování vzorků

Pro uchovávání vzorků stejně jako pro transport jsou stanoveny postupy, které co nejméně naruší stabilitu analytů. Odběrové nádoby jsou skladovány tak, aby byly dodrženy podmínky preanalytické fáze, které jsou určeny typem požadovaných vyšetření. Pokud není laboratoř dostupná, je důležité skladovat vzorky v dobře uzavřené zkumavce (zabrání se kontaminaci nebo odpařování) v suchu, chladu (4°C) a tmě (sluneční záření ovlivňuje stabilitu některých analytů). Pro některá vyšetření je nutné sérum zamrazit z důvodu krátké stability analytu, ke sbírané moči se při požadavcích na určitá vyšetření přidává konzervant. Většina analytů má stabilitu několik dní při teplotě 4°C. Nejčastější vyšetření s krátkou stabilitou analytů jsou např. glykémie – glukóza je spotřebována erythrocyty jako zdroj energie (fluorid sodný NaF stabilizuje glykémii a laktát v plazmě, stejný účinek má včasné oddělení červených krvinek od séra centrifugací), K – uvolnění kalia z buňky erythrocytu, acidobazická rovnováha a krevní plyny – odebírané do kapiláry, pro transport a uchování se používá tající led (Racek 2006).

## 3.2 Analytická fáze

Jak již bylo zmíněno, vzorky získané od pacientů bývají různého charakteru. Vzorky jednoho pacienta mohou směřovat do rozdílných laboratoří, kde jsou vyšetřovány různými rutinními nebo speciálními metodami (Čermáková a Štěpánová 2010)

### 3.2.1 Analytické laboratorní metody

Ve většině laboratoří probíhá provoz v plně automatizovaných systémech. Důvodem je nejen rychlost vyšetření, ale i co největší eliminace lidské chyby. Při analytické části laboratorního vyšetření je nižší riziko chyby než během preanalytické části. Analytické metody se rozdělují z různých hledisek. Příkladem jsou způsoby stanovení analytu ve vzorku. Podle fyzikálně-chemické báze se dělí na separační metody – chromatografie (plynová, kapalinová), ELFO, hmotnostní spektrometrie; optické metody – refraktometrie, polarimetrie, AAS, AES, turbidimetrie, nefelometrie, fluorimetrie, spektrofluorimetrie; elektrochemické metody – potenciometrie, konduktometrie; radiochemické metody (Bland a Altman 1986).

Další možností je dělení podle získaného výsledku na kvalitativní metody –

pozitivní, negativní; kvantitativní metody – koncentrace analytů ve vzorku jsou vyjádřeny číselným údajem s jednotkou měření; semikvantitativní metody – přibližná koncentrace analytu ve vzorku, vyjadřují se pomocí dohodnutých jednotek, př.: přítomnost bakterií v moči 0 – 4 (Racek 2006).

### 3.2.2 Kontrola kvality, validace a verifikace

Laboratoř nese zodpovědnost za analytickou správnost výsledků. K tomu slouží povinnosti každé laboratoře, jako jsou standardizace metody, interní a externí kontrola kvality, validace a verifikace, certifikace a akreditace (Racek 2006).

Vnitřní kontrola kvality zahrnuje měření kontrolních vzorků a jejich porovnávání s očekávanými hodnotami. Cíl je minimalizovat analytické chyby metod. Kontrolu provádí v rámci laboratoře k tomu kvalifikovaná osoba. Kontrolní vzorky by měli být měřeny minimálně ve dvou hladinách (nízké a vysoké), podle typu stanovované látky zvolíme správnou frekvenci měření kontrol. Měří se stejně jako rutinní vzorky pacientů. Výsledky vnitřní kontroly lze použít k verifikaci, validaci a k odhadu nejistoty výsledku měření. Externí kontrola kvality porovnává výsledky vnitřní kontroly laboratoře s ostatními laboratořemi (Kratochvíla J. et al. 2008).

Validace znamená proces, který vyhodnotí, zda je námi zvolená analytická metoda vhodná pro stanovení právě tohoto analytu. Verifikace je schopnost laboratoře začlenit do provozu již validovanou metodu ke stanovení analytu a prokázat kvalifikaci personálu laboratoře a laboratorního zařízení k provádění tohoto konkrétního analytického měření (Šálek T. et al. 2016).

### 3.2.3 Analytické vlastnosti metod

Ke správné analýze je třeba mít nastavené analytické vlastnosti metody, jsou to takové vlastnosti, na jejichž základě se může s metodou dále pracovat:

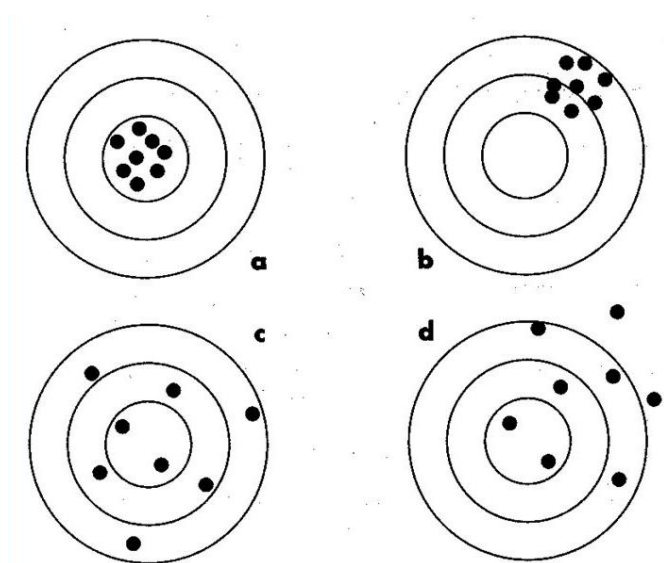
- přesnost, pravdivost a správnost metody
- senzitivita metody
- specifická metoda

Přesnost je míra shody mezi výsledky získané opakovanou analýzou téhož vzorku. Množství opakování je dostatečné zpravidla u dvaceti a více analýz. Opakovatelnost je ověřována analýzami na stejném zařízení se stejnou obsluhou a najednou. To charakterizuje metodu a preciznost jejího provedení. Reprodukovatelnost

se stanovuje postupnými analýzami na stejném zařízení s různou obsluhou. Určuje tedy stabilitu metody a jejího provádění. V případě mezilaboratorní reprodukovatelnosti se měření provádí na různých pracovištích, různých analyzátořech s různou obsluhou. Tím se zajišťuje porovnání úrovně přesnosti metody mezi jednotlivými laboratořemi (Racek 2006).

Přesnost metody je tedy statistickým ukazatelem náhodných chyb, které nelze úplně vyloučit. Opakované analýzy jsou ovlivněné řadou faktorů, které se v průběhu měření mění. Způsobují, že jsou výsledky pravidelně rozptýlené kolem průměrné hodnoty. Míru nepřesnosti udává směrodatná odchylka (Matthews a Farewell 2015).

Pravdivost metody se definuje jako těsnost shody mezi průměrem značného množství měření a dohodnutou referenční hodnotou. Správností metody je myšlena kombinace pravdivosti a přesnosti. Častým zobrazením vztahu mezi pravdivostí a přesností je přirovnání ke střelbě na terč (Racek 2006).



Obrázek 3- Zobrazení přesnosti a pravdivosti a) přesnost a pravdivost, b) přesnost a nepravdivost, c) nepřesnost a pravdivost, d) nepřesnost a nepravdivost (Racek 2006)

Senzitivita metody je citlivost analytické metody. Používá se pro stanovení rozsahu koncentrace dané metody. Je definována jako nejnižší odchylka koncentrací, kterou je možné s jistotou odlišit. Nejmenší množství analytu, které může být rozpoznáno, se označuje jako mez detekce. Výsledek nad tuto mez může být vydáván jako kvalitativní, tzn. pozitivní či negativní. Mez stanovitelnosti nám udává nejmenší koncentraci stanovované látky již v měřitelných číselných hodnotách, tedy kvantitativní

výsledek. Linearitou se rozumí schopnost metody poskytnout v určitém rozmezí koncentrací stanovované látky měřený signál, který je přímo úměrný měřené koncentraci (Barek J. et al. 2000).

Specifičnost metody je schopnost měřit selektivně pouze stanovovanou látku (analyt). Stanovení analytu je ovlivněno přítomností jiných látek a tento rušivý vliv se nazývá interference. Ta může mít za následek nesprávnost výsledku. Častou interferencí bývá vliv léčiv nebo i hemolýza. Existují velmi specifické metody, které stanovují substráty (analyty) pomocí enzymů. Ale jsou i metody méně specifické, které stanovují celé skupiny chemicky příbuzných sloučenin. Mezi ty patří například imunochemické metody (Kroll a Elin 1994).

### **3.3 *Postanalytická fáze***

Poslední součástí laboratorního vyšetření je postanalytická fáze. V ní je důležitá celá řada faktorů. Jde hlavně o kontrolu laboratorních procesů, správný přenos výsledků z analyzátoru do laboratorního informačního systému, interpretaci výsledků lékařem a následně i klinickou práci s výsledky testování. Aby byl výsledek správný, musí proběhnout všechny části laboratorního vyšetření bez chyb. Cílem této poslední fáze je vytěžit co nejvíce informací ze zjištěného výsledku. Laboratorní výsledky mají v současné době velký diagnostický význam a někdy může i jeden výsledek rozhodnout o diagnóze klinického stavu člověka (Šálek T. et al. 2016).

### **3.4 *Stanovení homocysteinu – preanalytická fáze***

Pacient, který má indikované vyšetření homocysteinu, musí být před odběrem krve řádně poučen. Pacient by měl dodržet alespoň dvanáctihodinové lačnění. Odběr se provádí v ranních hodinách a před odběrem by pacient neměl kouřit (kouření může zvýšit hladinu homocysteinu). Používáme zkumavky k získání séra nebo plazmy s protisrážlivým činidlem K<sub>2</sub>EDTA, K<sub>3</sub>EDTA nebo heparinátem lithným, která navíc obsahuje separační gel. U některých odběrových systémů je nutné dodržovat poměr protisrážlivého činidla a odebrané krve. Po odběru by mělo dojít co nejdříve k separaci krevních elementů od plazmy. Pro transport vzorku je ideální použít tající led (Ducros et al. 2002).



## 4. Experimentální část

### 4.1 Cíle práce

Jelikož je homocystein poměrně nestabilní analyt, cílem této práce je ověřit jeho stabilitu v plazmě při laboratorní teplotě. Měření jsou provedena v různých časových intervalech. Rovněž se budou sledovat změny hladiny homocysteinu skladované při laboratorní teplotě.

### 4.2 Hypotézy

S narůstající časovou prodlevou mezi odběrem vzorku a jeho zpracováním dojde ke zvyšování hladiny homocysteinu ve vzorcích.

Nejvyšší rozdíl je očekáván mezi vzorky zpracovanými bezprostředně po odběru a po uplynutí nejdelšího sledovaného časového intervalu (24h). V ostatních, kratších, časových intervalech jsou očekávány méně výrazné rozdíly měřených koncentrací homocysteinu.

U vzorků zpracovaných co nejdříve po odběru se očekávají minimální změny koncentrací.

### 4.3 Metodika

#### 4.3.1 Pokusné osoby

Pro náš výzkum byly použity vzorky od 10 dobrovolníků z řad dárců krve (po domluvě s vedením Transfuzního a hematologického oddělení Nemocnice Rudolfa a Stefanie Benešov, a.s. a souhlasu dárců). Každému bylo odebráno 5 zkumavek krve. Všichni dárce byli poučeni a seznámeni se správnou přípravou na odběr krve (dokument Poučení dárce krve – k dispozici na webových stránkách oddělení). Před samotným odběrem dárce čestně vyplnili dotazník. Byla jim odebrána zkumavka krve na základní vyšetření (KO) a absolvovali konzultaci s lékařem.

#### 4.3.2 Odběr a zpracování vzorků

Pro odběr byly použité zkumavky uzavřeného systému BD Vacutainer s přídavkem protisrážlivého činidla heparinátem lithným a separačním gelem. Vlastní odběr vzorků prováděly kvalifikované zdravotní sestry po odběru darované krve. Označené zkumavky byly pak transportovány do Laboratoře klinické biochemie

Nemocnice Rudolfa a Stefanie Benešov, a.s., kde probíhalo vlastní zpracování a analýza vzorků. Od každého dobrovolníka byla jedna zkumavka ihned zpracována – vložena do centrifugy Allegra X-22 (Beckman Coulter). Centrifugace probíhala po dobu 7 minut za laboratorní teploty (21°C) při 3000 otáčkách/min. Po separaci byly zkumavky analyzovány na analyzátoru Cobas 6000 (Roche), na kterém byly před analýzou změřeny kontrolní vzorky. Samotné stanovení trvá 12 minut. Ostatní zkumavky byly zanechány ve svislé poloze ve stojanu a při laboratorní teplotě. Po 1 h, 3 h, 6 h a 24 h proběhlo zpracování zbylých vzorků a byla provedena další měření. Ke každému novému měření bylo provedeno kontrolní měření vzorku zpracovaného v čase 0 pro sledování stability analytu při laboratorní teplotě.

#### 4.3.3 Kalibrace a kontrola kvality

Před vlastní analýzou vzorků byla uskutečněna kalibrace metody s následnou kontrolou kvality. Kalibrace metody se provádí vždy při změně šarže reagentie, nebo pokud to vyžaduje proces kontroly kvality. Pro kalibraci byl použit kalibrační materiál Homocysteine Calibrator Kit (Roche). Jedná se o tekuté kalibrační látky na bázi lidského séra, které jsou nachystané přímo k použití. Kalibrátor je připraven z krve dárců testovaných na přítomnost HBsAg, HCV a HIV. Je nutné s ním zacházet podle pravidel o bezpečnosti práce s biologickým materiálem.

Ke kontrole kvality posloužily kontrolní materiály HCYS Control Kit (Roche), které jsou připravené ihned k použití. Jedná se o kapalně materiály na bázi lidského séra s deklarovanými hodnotami ve 2 hladinách (nízké a vysoké). Intervaly mezi kontrolami by měly být upraveny podle požadavků konkrétní laboratoře. Měří se ráno před hlavním provozem a zpracovávají se stejně jako vzorky pacienta. Výsledky se ukládají do cobas IT middleware (cITm), jsou průběžně vyhodnocovány výpočtem průměru, směrodatné odchylky a variačního koeficientu (systematická chyba ve sběru dat). Každá laboratoř musí sledovat příslušná nařízení a směrnice kontroly kvality.

#### 4.3.4 Přístrojová technika

Automatický analyzátor Cobas 6000 je plně automatický uzavřený systém firmy Roche umožňující řadu biochemických vyšetření. Zdejší analyzátor se skládá ze dvou analytických modulů c501 a e601. Měření homocysteinu se provádí v modulu c501. Modul obsahuje měřící technologie absorpční fotometrie, turbidimetrie a

potenciometrie. Dalšími součástmi jsou reakční disk se 160 pozicemi pro plastové kyvety, které jsou umístěné ve vodní lázni, pipetovací stanice (vzorková jehla s detektorem sraženiny, 2 reagenční jehly) a kruh pro 60 reagenčních kazet. Výkon analyzátoru je až 1000 testů za hodinu. Z jednoho vzorku biologického materiálu (sérum, plazma, moč, mozkomíšní mok) je možné stanovit více parametrů během jedné analýzy. Součástí analyzátoru je core jednotka se vstupem a výstupem pro pětipoziční stojánky rutinního provozu, vstupní pozice pro statimový stojánek a řídicí počítač.



Obrázek 4- Analyzátor Cobas 6000

#### 4.3.5 Reagencie

Souprava pro stanovení homocysteinu obsahuje:

- R1 - reagencie NADH (S-adenosylmethionin, Tris(2-karboxyethyl)fosfin, 2-oxoglutarát, NADH, pufr, konzervans, stabilizátor)
- R2 - reagencie s enzymy (homocystein S-metyltransferáza, glutamátdehydrogenáza, casein, pufr, konzervans, detergent)
- R3 - startovací reagencie (adenosindeamináza, S-adenosyl-homocystein hydroláza, casein, pufr, konzervans, detergent) (Homocystein enzymatic assay, 2019)

#### 4.3.6 Princip metody

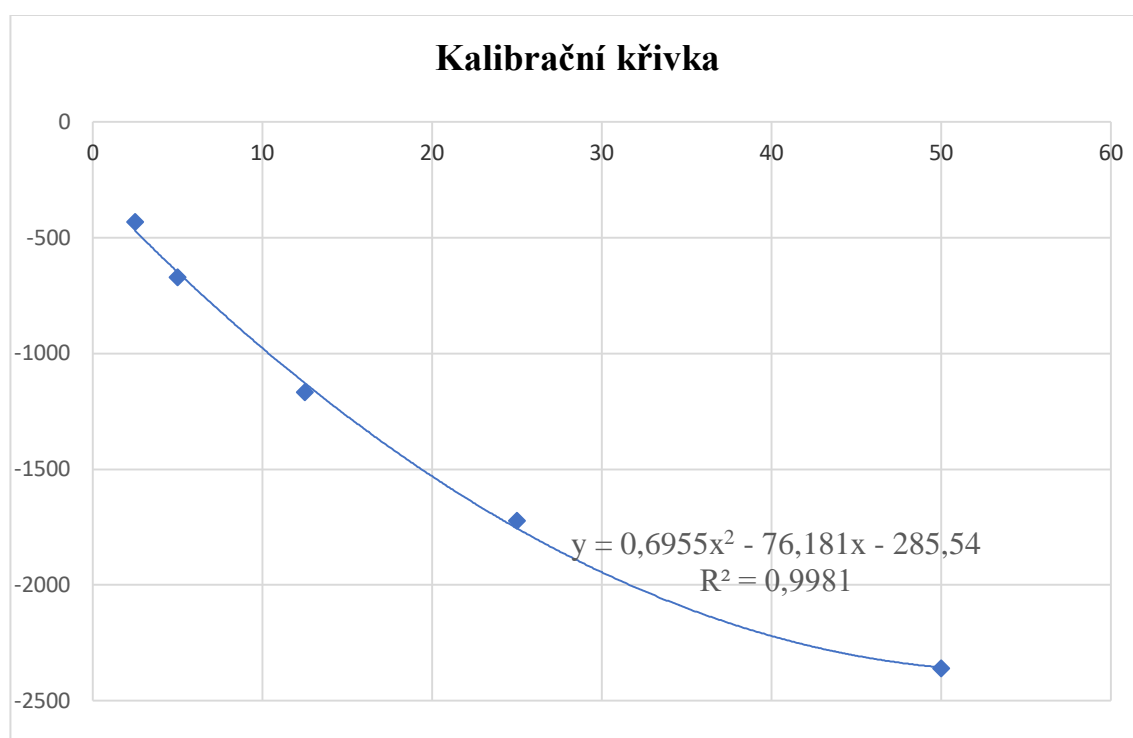
Principem použité analytické metody je stanovení látky vznikající při přeměně kosubstrátu. Nejprve je oxidovaný Hcy redukován na volný Hcy, který poté reaguje

s kosubstrátem, S-adenosylmethioninem. Vzniká methionin a S-adenosylhomocystein (SAH) za katalýzy homocystein-S-metyltransferázy. SAH je hydrolyzován na adenosin a homocystein hydrolázou-SAH. Homocystein se vrací do reakčního cyklu a tím zesiluje detekční signál. Vzniklý adenosin je ihned hydrolyzován na inosin a amoniak. V posledním kroku katalyzuje glutamátdehydrogenáza reakci amoniaku s 2-oxoglutarátem a NADH, za vzniku  $\text{NAD}^+$ . Koncentrace homocysteinu ve vzorku je přímo úměrná množství NADH přeměněného na  $\text{NAD}^+$ . Úbytek koncentrace NADH se měří fotometricky při vlnové délce 340 nm. Metoda není významně zatížena interferencí ikteru, hemolýzy nebo lipémie (Homocystein enzymatic assay, 2019).

## 5. Výsledky

### 5.1 Výsledky kalibrace a kontroly kvality

Pro tento výzkum byla použita kazeta s reagenčí č. šarže: 33572 serie: 02586. Kazeta obsahuje 100 testů. Kalibrace je pětibodová (tab. 2). Na obrázku 5 je zobrazena kalibrační křivka pro použitou reagenční kazetu.



Obrázek 5- Kalibrační křivka

Tabulka 2- Kalibrační monitor

Standard	Koncentrace Hcy $\mu\text{mol/l}$	Změna absorbance
1	2,5	-434
2	5	-673
3	12,5	-1169
4	25	-1724
5	50	-2361

## 5.2 Výsledky měření

### 5.2.1 Analýza homocysteinu a stabilita analytu

Vzorky s krví od dárců byly tedy zpracovány v pěti různých časových intervalech. Příprava a následná analýza vzorků v daných časech probíhala současně při průměrné laboratorní teplotě 21°C. Vzorek zpracovaný v čase 0 byl analyzovaný opakovaně, vždy po uplynutí časového intervalu pro měření dalšího vzorku. Naměřené hodnoty koncentrací byly dále využity k porovnávání a výpočtům.

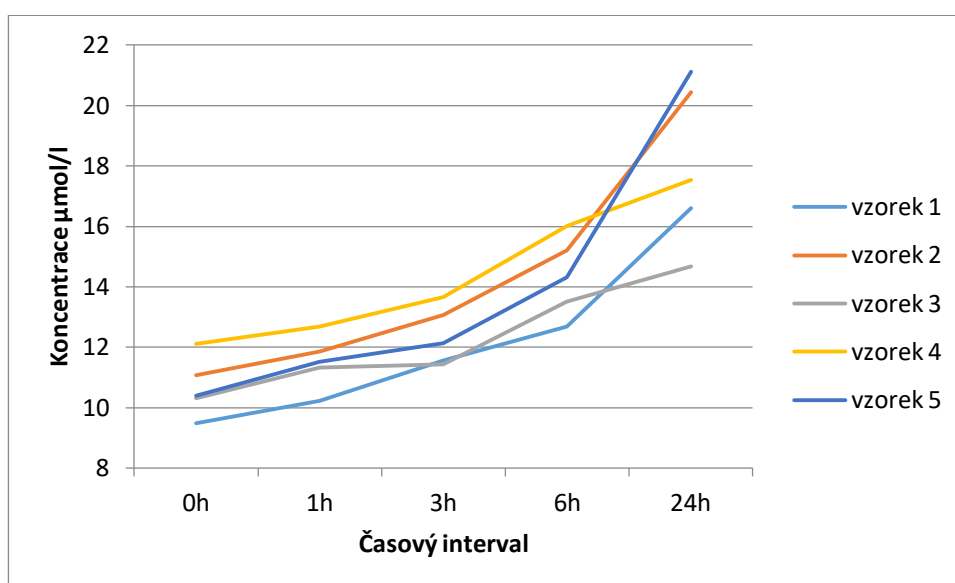
V tabulce 3 jsou zaznamenány a zeleně označeny hodnoty vzorků zpracovaných v čase 0 (tzn. bezprostředně po transportu vzorků do laboratoře).

Tabulka 3- Naměřené koncentrace Hcy v časových intervalech

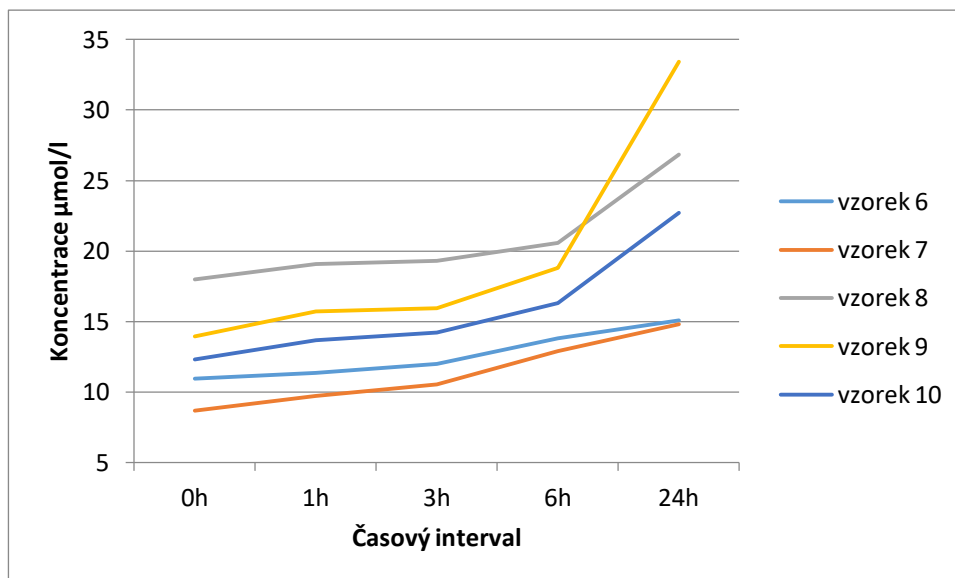
		koncentrace Hcy v $\mu\text{mol/l}$				
Dárce	Doba zpracování	0h	1h	3h	6h	24h
dárce 1	v čase 0		9,58	9,76	10,54	11,02
	před analýzou	9,49	10,22	11,56	12,68	16,6
dárce 2	v čase 0		11,07	11,19	11,24	12,27
	před analýzou	11,08	11,86	13,07	15,2	20,44
dárce 3	v čase 0		10,38	10,45	10,55	11,2
	před analýzou	10,32	11,34	11,44	13,52	14,68
dárce 4	v čase 0		12,36	12,36	12,67	13,5
	před analýzou	12,11	12,68	13,67	16,01	17,54
dárce 5	v čase 0		10,4	10,6	10,68	11,55
	před analýzou	10,4	11,53	12,13	14,31	21,11
dárce 6	v čase 0		10,45	10,83	11	11,63
	před analýzou	10,98	11,37	12	13,82	15,1
dárce 7	v čase 0		8,72	8,83	8,99	10,06
	před analýzou	8,71	9,71	10,57	12,92	14,8
dárce 8	v čase 0		17,2	17,61	17,98	18,06
	před analýzou	18,01	19,07	19,3	20,58	26,84
dárce 9	v čase 0		12,24	12,63	13,61	14,13
	před analýzou	13,97	15,72	15,93	18,83	33,44
dárce 10	v čase 0		11,94	12,02	12,11	12,75
	před analýzou	12,31	13,68	14,24	16,3	22,7

Vzorky zvýrazněné růžově byly zpracovány a změřeny bezprostředně před analýzou po 1 h, 3 h, 6 h a 24 h od odběru krve. V tabulce jsou v nezvýrazněném poli zapsány naměřené hodnoty vzorků pro sledování stability analytu. Jedná se o vzorky zpracované v čase 0, které byly zanechány ve svislé poloze při průměrné laboratorní teplotě 21°C. Další měření probíhalo po 1 h, 3 h, 6 h a 24 h.

Na obrázcích 6 a 7 jsou znázorněny výsledky měření hladiny homocysteinu. Zde je patrný postupný nárůst koncentrací v jednotkách  $\mu\text{mol/l}$ . Pro lepší orientaci byly výsledky rozděleny do 2 grafů. Pokud nedojde ke zpracování vzorku co nejdříve po odběru, již po hodině dochází k mírnému nárůstu koncentrace sledovaného analytu.

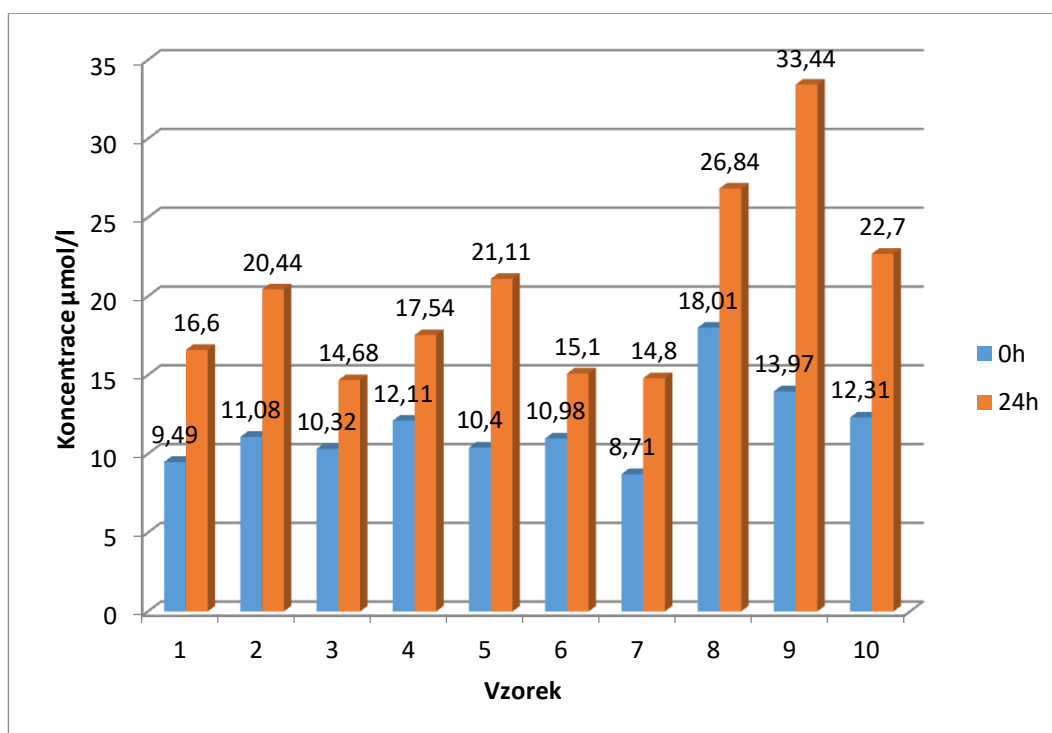


Obrázek 6- Křivka koncentrací Hcy v různých časových intervalech mezi odběrem a vlastním zpracováním vzorku (1)



Obrázek 7- Křivka koncentrací Hcy v různých časových intervalech mezi odběrem a vlastním zpracováním vzorku (2)

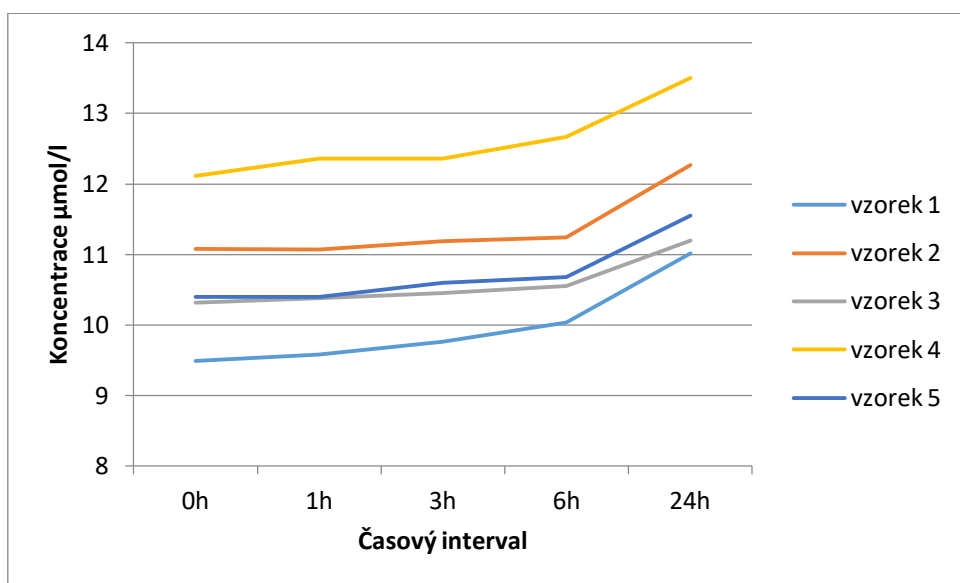
Na obrázku 8 je přehledně znázorněný největší rozdíl naměřených koncentrací homocysteinu v jednotkách  $\mu\text{mol/l}$ . Jedná se o vzorky zpracované v čase 0 a 24 h od odběru krve.



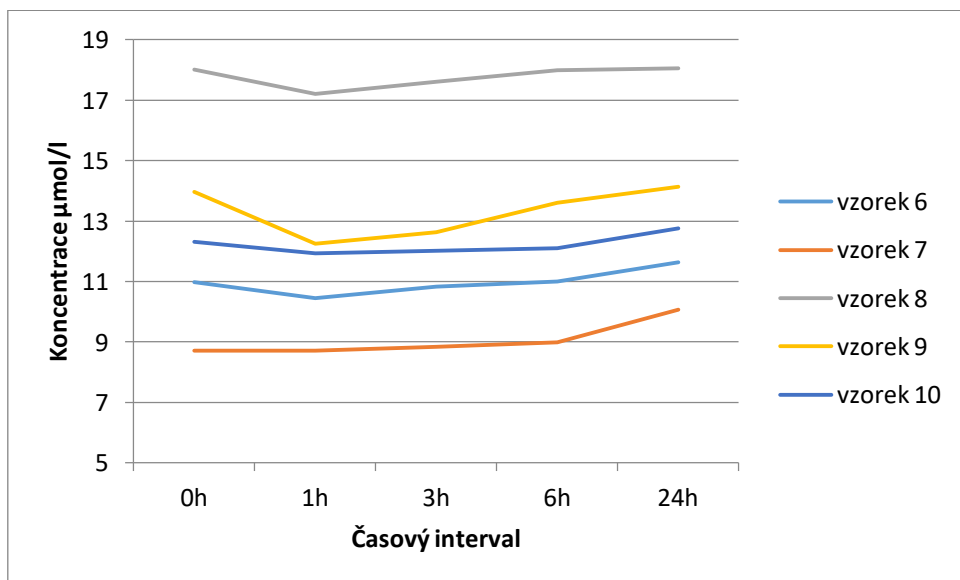
Obrázek 8- Největší rozdíl koncentrací Hcy zpracovaných v časech 0 a 24h od odběru



Na obrázcích 9 a 10 jsou znázorněné postupné změny koncentrací hladiny homocysteinu při sledování jeho stability. Jako u předchozích grafů jsou pro lepší orientaci výsledky rozdělené a křivky barevně odlišené. V případě okamžitého zpracování vzorků nedochází k výraznému zvyšování koncentrací homocysteinu i při delším skladování vzorků při laboratorní teplotě.



Obrázek 9- Křivka koncentrací Hcy při sledování stability analytu (1)



Obrázek 10- Křivka koncentrací při sledování stability analytu (2)

### 5.2.2 Porovnání a výpočty z naměřených hodnot

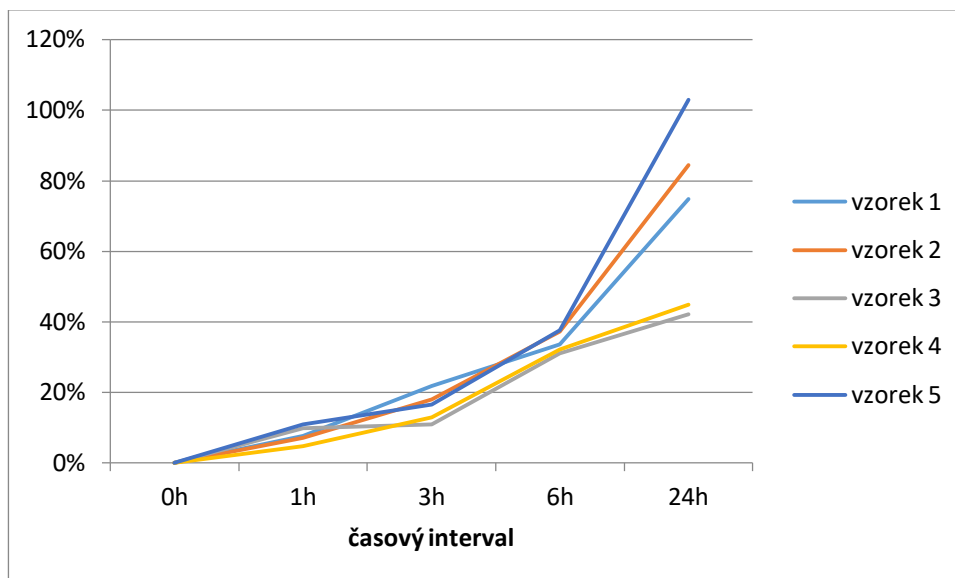
V tabulce 4 jsou zeleně zvýrazněné hodnoty vzorků zpracovaných a změřených v čase 0, porovnány jsou s hodnotami vzorků zpracovaných a naměřených v časech 1 h, 3 h, 6 h a 24 h od odběru, rozdíl byl vypočítán v procentech.

Tabulka 4- Naměřené koncentrace ( $\mu\text{mol/l}$ ) s výpočtem rozdílu v %

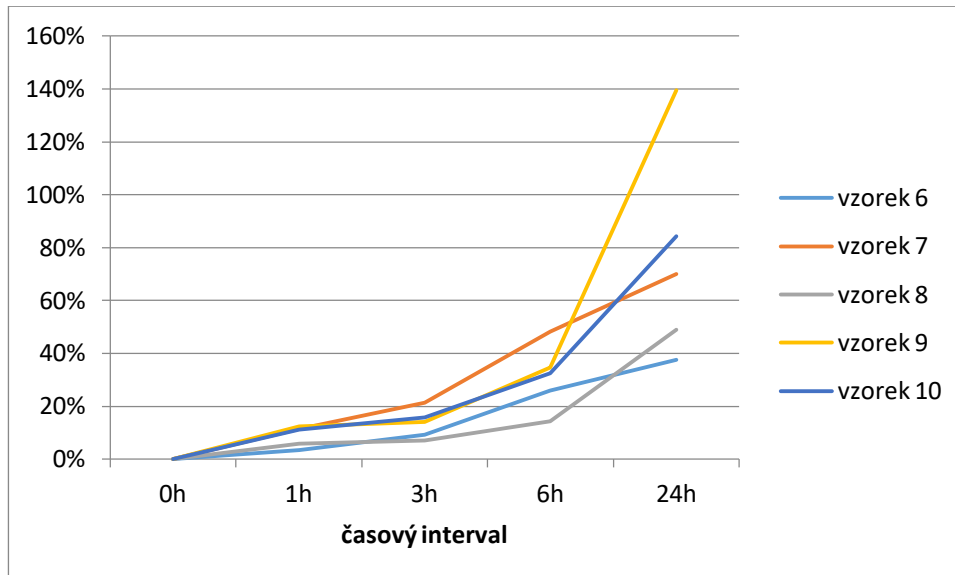
Dárce		0h	1h	3h	6h	24h
Dárce1	koncentrace Hcy ( $\mu\text{mol/l}$ )		10,22	11,56	12,68	16,6
	rozdíl (%)	9,49	7,7	21,8	33,6	74,9
Dárce 2	koncentrace Hcy ( $\mu\text{mol/l}$ )		11,86	13,07	15,2	20,44
	rozdíl (%)	11,08	7,0	18,0	37,2	84,5
Dárce3	koncentrace Hcy ( $\mu\text{mol/l}$ )		11,34	11,44	13,52	14,68
	rozdíl (%)	10,32	9,9	10,9	31,0	42,2
Dárce4	koncentrace Hcy ( $\mu\text{mol/l}$ )		12,68	13,67	16,01	17,54
	rozdíl (%)	12,11	4,7	12,9	32,2	44,8
Dárce5	koncentrace Hcy ( $\mu\text{mol/l}$ )		11,53	12,13	14,31	21,11
	rozdíl (%)	10,4	10,9	16,6	37,6	103,0
Dárce6	koncentrace Hcy ( $\mu\text{mol/l}$ )		11,37	12	13,82	15,1
	rozdíl (%)	10,98	3,6	9,3	25,9	37,5
Dárce7	koncentrace Hcy ( $\mu\text{mol/l}$ )		9,71	10,57	12,92	14,8
	rozdíl (%)	8,71	11,5	21,4	48,3	69,9
Dárce8	koncentrace Hcy ( $\mu\text{mol/l}$ )		19,07	19,3	20,58	26,84
	rozdíl (%)	18,01	5,9	7,2	14,3	49,0
Dárce9	koncentrace Hcy ( $\mu\text{mol/l}$ )		15,72	15,93	18,83	33,44
	rozdíl (%)	13,97	12,5	14,0	34,8	139,4
Dárce10	koncentrace Hcy ( $\mu\text{mol/l}$ )		13,68	14,24	16,3	22,7
	rozdíl (%)	12,31	11,1	15,7	32,4	84,4

Vypočítané rozdíly ukazují nárůst koncentrace homocysteinu průměrně po 1 h o 8,5%, po 3 h o 14,8%, po 6 h o 32,7% a po 24 h o 73%.

Na obrázcích 11 a 12 jsou přehledně znázorněné vzestupy koncentrace homocysteinu v procentech. Je patrný největší nárůst koncentrace u vzorků zpracovaných po 24 h od odběru krve.



Obrázek 11- Vzestup koncentrace v %



Obrázek 12- Vzestup koncentrace v %

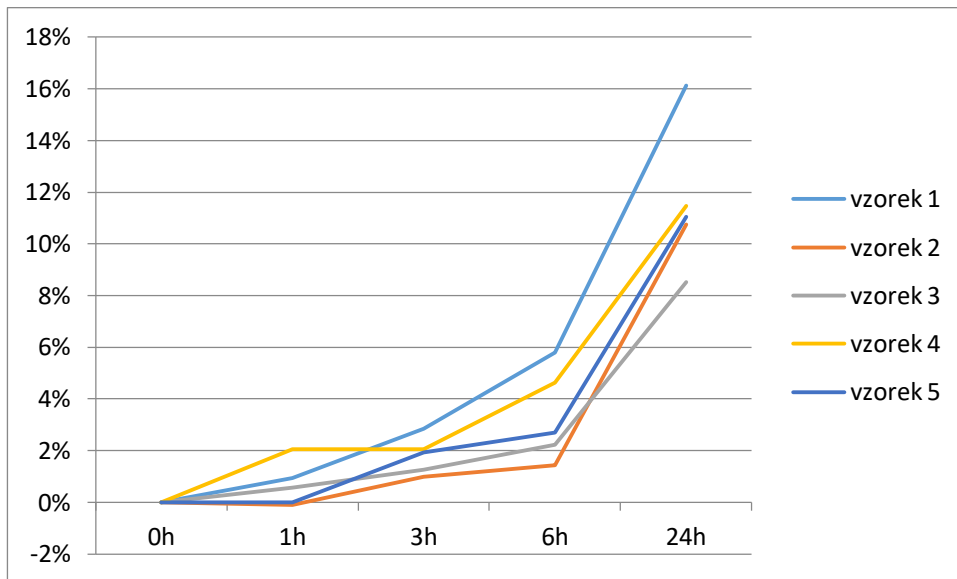
V tabulce 5 jsou zeleně zvýrazněné hodnoty vzorků zpracovaných v čase 0 a porovnávány s hodnotami vzorků naměřených po 1 h, 3 h, 6 h a 24 h. Rozdíl byl vypočítán v procentech.

Tabulka 5- Naměřené hodnoty při sledování stability Hcy ( $\mu\text{mol/l}$ ) s výpočtem rozdílu v %

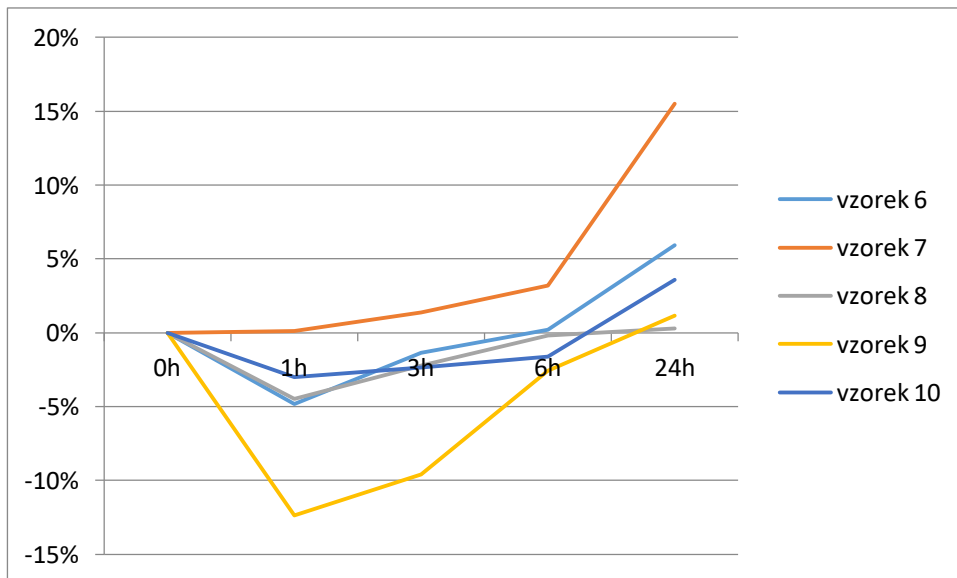
Dárce		0h	1h	3h	6h	24h
Dárce1	koncentrace Hcy ( $\mu\text{mol/l}$ )		9,58	9,76	10,54	11,02
	rozdíl (%)	9,49	0,9	2,8	5,8	16,1
Dárce 2	koncentrace Hcy ( $\mu\text{mol/l}$ )		11,07	11,19	11,24	12,27
	rozdíl (%)	11,08	-0,1	1,0	1,4	10,7
Dárce3	koncentrace Hcy ( $\mu\text{mol/l}$ )		10,38	10,45	10,55	11,2
	rozdíl (%)	10,32	0,6	1,3	2,2	8,5
Dárce4	koncentrace Hcy ( $\mu\text{mol/l}$ )		12,36	12,36	12,67	13,5
	rozdíl (%)	12,11	2,1	2,1	4,6	11,5
Dárce5	koncentrace Hcy ( $\mu\text{mol/l}$ )		10,4	10,6	10,68	11,55
	rozdíl (%)	10,4	0,0	1,9	2,7	11,1
Dárce6	koncentrace Hcy ( $\mu\text{mol/l}$ )		10,45	10,83	11	11,63
	rozdíl (%)	10,98	-4,8	-1,4	0,2	5,9
Dárce7	koncentrace Hcy ( $\mu\text{mol/l}$ )		8,72	8,83	8,99	10,06
	rozdíl (%)	8,71	0,1	1,4	3,2	15,5
Dárce8	koncentrace Hcy ( $\mu\text{mol/l}$ )		17,2	17,61	17,98	18,06
	rozdíl (%)	18,01	-4,5	-2,2	-0,2	0,3
Dárce9	koncentrace Hcy ( $\mu\text{mol/l}$ )		12,24	12,63	13,61	14,13
	rozdíl (%)	13,97	-12,4	-9,6	-2,6	1,1
Dárce10	koncentrace Hcy ( $\mu\text{mol/l}$ )		11,94	12,02	12,11	12,75
	rozdíl (%)	12,31	-3,0	-2,4	-1,6	3,6

Hodnoty zapsané v tabulce 5 ukazují, že po 1. hodině docházelo u pěti vzorků nejprve k poklesu koncentrace homocysteinu a až následně k postupnému zvyšování. Ostatní vzorky měly navýšení po první hodině průměrně o 0,7%, po třech hodinách o 1,7%, po šesti hodinách o 2,9% a po 24 h o 8,4%.

Obrázky 13 a 14 ukazují vzestup koncentrací u sledování stability analytu s rozdíly v procentech.



Obrázek 13- Stabilita analytu s rozdílem v %



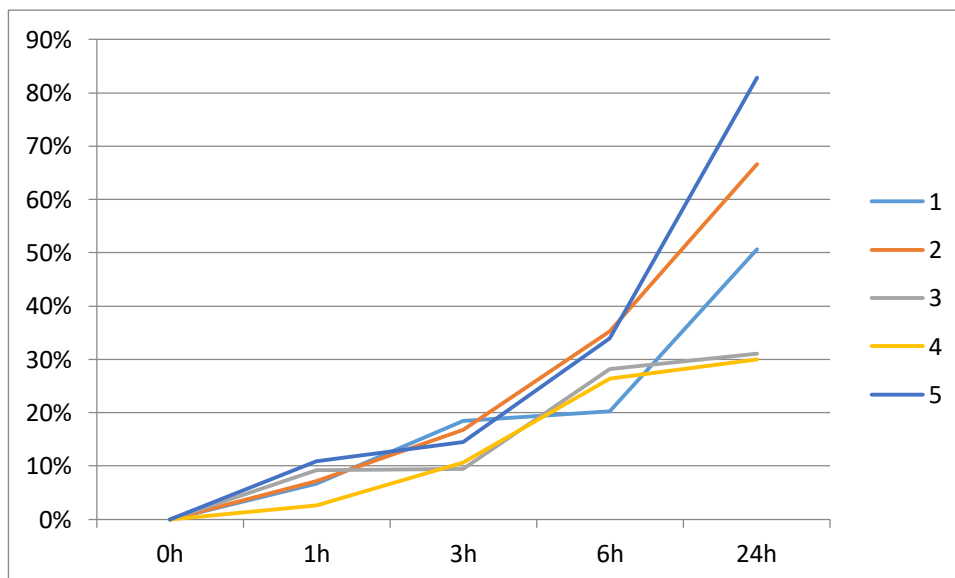
Obrázek 14- Stabilita analytu s rozdílem v %

Tabulka 6 zachycuje rozdíly koncentrací homocysteinu (v %) mezi vzorky analyzovanými v jednotlivých časových intervalech. Rozdíl byl vypočítán z koncentrací vzorku zpracovaného v čase 0 a vzorku zpracovaného až po dané době, oba tyto vzorky byly měřeny ve stejný čas. Jsou zde tedy vyloučeny i drobné odchylky koncentrací sledovaného analytu, ke kterým docházelo v průběhu pokusu.

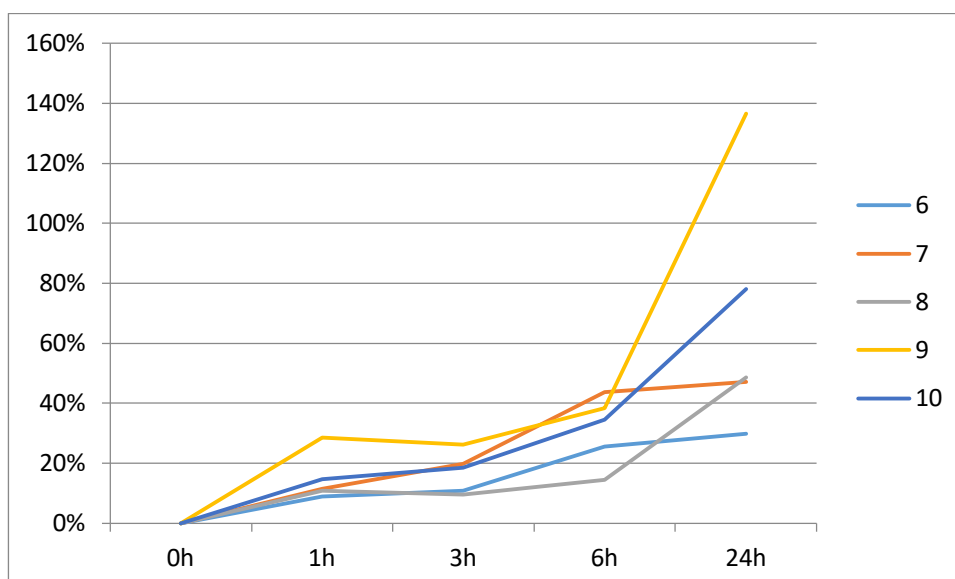
Tabulka 6- Změny hladin homocysteinu u jednotlivých vzorků

Dárce	0h	1h	3h	6h	24h
1	0%	6,7%	18,4%	20,3%	50,6%
2	0%	7,1%	16,8%	35,2%	66,6%
3	0%	9,2%	9,5%	28,2%	31,1%
4	0%	2,6%	10,6%	26,4%	29,9%
5	0%	10,9%	14,4%	34,0%	82,8%
6	0%	8,8%	10,8%	25,6%	29,8%
7	0%	11,4%	19,7%	43,7%	47,1%
8	0%	10,9%	9,6%	14,5%	48,6%
9	0%	28,4%	26,1%	38,4%	136,7%
10	0%	14,6%	18,5%	34,6%	78,0%

Na obrázcích 15 a 16 jsou znázorněné výsledky z tabulky 6. Rozdíl mezi naměřenými koncentracemi v časových intervalech se pohyboval průměrně po 1 h o 1,3  $\mu\text{mol/l}$  (11%), po 3 h o 1,8  $\mu\text{mol/l}$  (15%), po 6 h o 3,5  $\mu\text{mol/l}$  (30%) a po 24 h o 7,7  $\mu\text{mol/l}$  (60%).



Obrázek 15- Procentuální rozdíl mezi koncentracemi vzorků



Obrázek 16- Procentuální rozdíl mezi koncentracemi vzorků

## 6. Diskuze

Stanovení hladiny homocysteinu je rutinním biochemickým vyšetřením. Správnost výsledku je důležitá při diagnostice nebo monitoringu již zjištěného onemocnění. Falešně zvýšené koncentrace homocysteinu mohou ovlivnit rozhodování lékaře při nastavování vhodné léčby. Nejčastější příčinou hyperhomocysteinémie je deficit některého z vitamínů, které jsou součástí kofaktorů enzymů účastnících se metabolismu homocysteinu.

Tato práce by měla poukázat na důležitost preanalytické fáze laboratorního vyšetření a ukázat, jak velkou roli může hrát časová prodleva mezi odběrem a vlastním zpracováním vzorku. Z praxe je známé, že přes všechna nařízení a doporučení není vždy možné dodat vzorek do příslušné laboratoře v určený čas. Pro odběry byl použitý uzavřený systém BD Vacutainer, který se běžně využívá v nemocnicích i v ordinacích praktických lékařů. Časová prodleva mezi odběrem, zpracováním vzorků a měřením byla vybrána tak, aby se co nejvíce shodovala s realitou. Naměřené koncentrace byly použity k výpočtům a k porovnávání hodnot.

Koncentrace plazmatického homocysteinu měřená v různých časových intervalech po odběru krve se podle očekávání zvyšovala. Výsledky zapsané v tabulce 3 ukazují na postupný, avšak výrazný vzestup. Výpočty procentuálního nárůstu koncentrace homocysteinu se vztahují k naměřeným hladinám v čase 0h. U většiny vzorků již po první hodině prodlení mezi odběrem a zpracováním došlo ke zvýšení koncentrace průměrně o 8,5%. Po dalších třech hodinách byl nárůst koncentrace v průměru o 14,8%. U měření po 6 h se nárůst koncentrace pohybuje v průměru o 32,7%. Značný rozdíl byl u vzorků zpracovaných a měřených po 24 h od odběru krve. Zde došlo k největšímu zvýšení koncentrace, které bylo u dvou vzorků přes 100%, u čtyř vzorků byl rozdíl mezi 70-80%, a u zbylých čtyř vzorků kolem 40%. Tato pozorování potvrzují údaje zpracované Dubskou a Hyánkem (2009). Ti uvádí, že po první hodině dochází k nárůstu hladiny homocysteinu o 10%, po čtyřech hodinách o 20-35% a po 24 h o 60-75%. Sledování koncentrací homocysteinu po 4 hodinách nebyla prováděna, přesto výsledky o několik procent nižší získané po tříhodinovém intervalu by odpovídaly těm uvedeným po 4 hodinách (Dubská L. a Hyánek J. 2009).

Sledování stability analytu při průměrné laboratorní teplotě 21°C nepřineslo tak výrazné změny koncentrací, jako při měření hladiny homocysteinu vzorků zpracovaných v různých časech od odběru. Nicméně i u těchto měření došlo



k neočekávaným výsledkům, jak je patrné z obrázku 14. U čtyř vzorků došlo nejprve k poklesu koncentrace, a teprve následně se pomalu zvyšovala. U pěti vzorků došlo ke zvýšení koncentrace po 24 h o více než 10%.

Z deseti dárců byla pouze u jednoho zjištěna patologická hodnota hladiny homocysteinu. Tato skutečnost se významně neprojevila v dalším chování vzorku. Zvyšování koncentrace analytu u tohoto vzorku probíhalo v průměru stejně jako u vzorků s naměřenými hodnotami spadajícími do referenčního rozmezí.

Naměřené hodnoty v této práci byly porovnány se studií, která se zabývá srovnáním různých typů odběrových systémů podle stability analytů (Gawria et al. 2020). Studie dokazuje, že vzorky zpracované ihned a skladované při 4°C, nevykazují příliš velké změny koncentrací, pohybovaly se do 1%. Hodnoty získané u vzorků ponechaných při laboratorní teplotě během první hodiny vzrostly v průměru o 2,85%. Je patrný rozdíl a teplota skladování tedy hraje významnou roli.

Uvádí se, že vzestup koncentrace nastává již po 30 minutách od odběru (Bartoš et al. 2005). Tomu odpovídají i výsledky získané v této práci. Rozdíl mezi vzorky zpracovanými ihned po odběru krve a vzorky zpracovanými za 1 h od odběru je průměrně o 11%. Pokud tedy nelze provést analýzu ihned po odběru krve, je vhodné vzorky alespoň zpracovat a před samotnou analýzou uchovávat v chladu, aby nedošlo ke zvyšování hladiny homocysteinu.

## 7. Závěr

Cílem této práce bylo ověřit stabilitu homocysteinu v krvi zpracované po uplynutí určených časových úseků od odběru a zjistit, jak teplota a čas ovlivní koncentraci homocysteinu v plazmě. Byl použit uzavřený odběrový systém BD Vacutainer s heparinátém lithným jako antikoagulačním činidlem a měření byla provedena na analyzátoru Cobas 6000.

Podle očekávání došlo u vzorků odebraných a zpracovaných s časovou prodlevou v intervalech po 1 h, 3 h, 6 h a 24 h od odběru krve k výraznému navýšení koncentrace homocysteinu. Největší nárůst koncentrace u vzorků nastal také podle předpokladu 24 h od odběru. Stabilita analytu je výrazně ovlivněna teplotou, kdy už v první hodině dochází k nezanedbatelnému zvýšení koncentrace homocysteinu v plazmě.

Sledování stability analytu u vzorků zpracovaných v čase 0 a měřených ve stejných časových intervalech jako u prvního typu měření přinesl neočekávané výsledky. U některých vzorků nejprve koncentrace klesla a až později došlo k postupnému zvyšování. Ostatní vzorky podle očekávání vykazovaly nárůst koncentrace homocysteinu jen mírně ve srovnání se vzorky z prvního měření. Přesto byl celkový nárůst hladiny homocysteinu minimální.

Výsledky měření a výpočtů, které jsou součástí této práce, se shodují s vnitřním doporučením laboratoře, uvedeným v laboratorní příručce. Každé laboratoři se doporučuje zvláštní úprava, aby se předešlo falešně pozitivním výsledkům z důvodů nedodržení správné preanalytické fáze laboratorního vyšetření. Například odběr krve provádět v bezprostřední blízkosti laboratoře, alespoň separaci provádět co nejdříve po něm a nepoužívat svozovou službu, a pokud není jiná možnost, umožnit transport na tajícím ledu.

## 8. Seznam literatury

1. AL-SADEQ, D.W. a NASRALLAH G.K., 2020. The Spectrum of Mutations of Homocystinuria in the Mena Region. *Genes* [online]. **11**(3), E330. ISSN 2073-4425. Dostupné z: doi:10.3390/genes11030330
2. ANDRÈS, E., LOUKILI, N.H., NOEL, E., KALTENBACH, G., ABDELGHENI, M.B., PERRIN A.E., NOBLET-DICK, M., MALOISEL, F., SCHLIENGER, J.L., a BLICKLÉ, J.F., 2004. Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients. *CMAJ* [online]. **171**(3), 251–259. ISSN 0820-3946, 1488-2329. Dostupné z: doi:10.1503/cmaj.1031155
3. ASHAVID, T.F., EGHLM, F.F., SHALIA, K.K., a NAIR, K.G., 2003. Standardization of homocysteine on HPLC using DTT as reductant. *Indian journal of clinical biochemistry: IJCB* [online]. **18**(2), 106–110. ISSN 0970-1915. Dostupné z: doi:10.1007/BF02867375
4. BAREK, J., JÁNOŠ, P., a KORUNA I., 2000. Metrologická terminologie v chemii. *Chemické listy*. **94**, 439–444.
5. BARTOŠ, V., JABOR, A., ZÁMEČNÍK, 2005. *Preanalytická fáze 2005*. Praha: Česká společnost klinické biochemie ČLS JEP : SEKK. ISBN 978-80-239-5198-1.
6. BLAND, J.M., a ALTMAN, D.G., 1986. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet (London, England)*. **1**(8476), 307–310. ISSN 0140-6736.
7. BOLANDER-GOUAILLE, Ch., a BOTTIGLIERI, T., 2003. *Homocysteine: Related Vitamins and Neuropsychiatric Disorders* [online]. Paris: Springer Paris [vid. 2021-06-23]. ISBN 978-2-8178-0759-1. Dostupné z: <http://public.ebookcentral.proquest.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=3086218>
8. BROSANAN, J.T., a BROSANAN, M.E., 2006. The Sulfur-Containing Amino Acids: An Overview. *The Journal of Nutrition* [online]. **136**(6), 1636S-1640S. ISSN 0022-3166. Dostupné z: doi:10.1093/jn/136.6.1636S
9. CARMEL, R., 2011. *Homocysteine in health and disease*. Cambridge: Cambridge University Press. ISBN 978-0-521-65319-0.
10. ČERMÁKOVÁ, M., a ŠTĚPÁNOVÁ, I., 2010. *Klinická biochemie*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně. ISBN 978-80-7013-515-0.
11. DUBSKÁ, L., a HYÁNEK, J., 2009. Stanovení homocysteinu v biologickém materiálu. *Klinická biochemie a metabolismus*. **17**(38), 2, 93–95.
12. DUCROS, V., DEMUTH, K., SAUVANT, M.P., QUILLARD, M., CAUSSÉ, E., CANDITO, M., READ, M.H., DRAI, J., GARCIA, I., GERHARDT, M.F., a SFBC WORKING GROUP ON HOMOCYSTEINE. FRENCH SOCIETY FOR CLINICAL BIOLOGY, 2002. Methods for homocysteine analysis and

- biological relevance of the results. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* [online]. **781**(1–2), 207–226. ISSN 1570-0232. Dostupné z: doi:10.1016/s1570-0232(02)00497-x
13. ERBEN, K., 2015. *Homocystein, civilizační choroby a biochemické zdraví*. Praha: Bondy. ISBN 978-80-905866-7-3.
  14. FRIEDMAN, A.N., BOSTOM, A.G., SELHUB, J., LEVEY, A.S. a ROSENBERG, I.H., 2001. The kidney and homocysteine metabolism. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* [online]. **12**(10), 2181–2189. ISSN 1046-6673. Dostupné z: doi:10.1681/ASN.V12102181
  15. GANGULY, P., a ALAM, S.F., 2015. Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. *Nutrition Journal* [online]. **14**(1), 6. ISSN 1475-2891. Dostupné z: doi:10.1186/1475-2891-14-6
  16. GAWRIA, G., TILLMAR, L., a LANDBERG, E., 2020. A comparison of stability of chemical analytes in plasma from the BD Vacutainer® Barricor™ tube with mechanical separator versus tubes containing gel separator. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* [online]. **34**(2), e23060. ISSN 1098-2825. Dostupné z: doi:10.1002/jcla.23060
  17. GUDER, W.G. a NARAYANAN, S., ed., 2015. *Pre-examination procedures in laboratory diagnostics: preanalytical aspects and their impact on the quality of medical laboratory results*. Berlin ; Boston: De Gruyter. ISBN 978-3-11-033165-3.
  18. HELLMANN, H., a MOONEY, S., 2010. Vitamin B6: A Molecule for Human Health? *Molecules* [online]. **15**(1), 442–459. Dostupné z: doi:10.3390/molecules15010442
  19. Homocystein enzymatic assay, 2019. [online] Roche Diagnostics GmbH. [cit. 2021-08-05]. Dostupné z: <https://pim-eservices.roche.com/eLD/api/downloads/8c5bf60e-f412-ea11-fa90-005056a772fd?countryIsoCode=cz>
  20. HUMPLÍKOVÁ, S., MINÁŘ, J., KUČEROVÁ, M., RADINA, M., a VALÍK, D., 2007. Stanovení hladiny celkového homocysteinu v plazmě kapalinovou chromatografií s tandemovou hmotnostní spektrometrií. *Klinická biochemie a metabolismus*. **15**(36), 2, 31–34.
  21. HYÁNEK, J., DUBSKÁ, L., PEJZNOCHOVÁ, H., PEHAL, F., VAINGÁTOVÁ, S., a MARTINÍKOVÁ, V., 2009. Hyperhomocysteinémie – nepoznané, nepoznatelné a zanedbané (homocystein – užitečný marker methylačních poruch z defí citu holotranskobalaminu a folátu). *Klinická biochemie a metabolismus*. **17** (38), 2, 83–92.
  22. HYÁNEK, J., MAŤOŠKA, V., DUBSKÁ, L., MÍKOVÁ, B., PEJZNOCHOVÁ, H., DVOŘÁKOVÁ, J., TÁBORSKÝ, L., KOŠAN, L., MARTINIKOVÁ, V.,

- PRIVAROVÁ, J., a BRTNOVÁ, J., 2017. Mírné hyperhomocysteinémie z deficitu MTHFR (C677T a C1298A) u dospělých a adolescentů v metabolické ambulanci. Je třeba je diferencovat a léčit? *Klinická biochemie a metabolismus*. **25(46)**(1), 18–26.
23. JAKUBOWSKI, H., 2002. Homocysteine is a protein amino acid in humans. Implications for homocysteine-linked disease. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. **277**(34), 30425–30428. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.C200267200
24. KRÁLÍKOVÁ, M., 2011. *Role homocysteinu a příbuzných thiolů u poruch reprodukce* [online]. B.m. [vid. 2021-06-23]. Masaryk University, Faculty of Medicine. Dostupné z: <https://theses.cz/id/uwhfdn/?lang=en>
25. KRATOCHVÍL, J., PLZÁK, Z. a PEKOVÁ, A., 2013. ČSN EN ISO 15189 - Zdravotnické laboratoře - Požadavky na kvalitu a způsobilost [online] [vid. 2021-08-03]. Dostupné z: [https://library.upol.cz/arl-upol/cs/detail-upol\\_us\\_cat-0180194-cSN-EN-ISO-15189-Zdravotnicke-laboratore-Pozadavky-na-kvalitu-a-zpusobilost/](https://library.upol.cz/arl-upol/cs/detail-upol_us_cat-0180194-cSN-EN-ISO-15189-Zdravotnicke-laboratore-Pozadavky-na-kvalitu-a-zpusobilost/)
26. KRATOCHVÍLA, J., KUBÍČEK, Z., MINÁŘ, J., POLLAK, M., RADINA, M., STANČÍK, L., ŠPRONGL, L., VERNER, M., a VŠIANSKÝ, F., 2008. Doporučení České společnosti klinické biochemie o vnitřní kontrole kvality. *Klinická biochemie a metabolismus*. 69–70.
27. KROLL, M.H. a ELIN, R.J., 1994. Interference with clinical laboratory analyses. *Clinical Chemistry* [online]. **40**(11), 1996–2005. ISSN 0009-9147. Dostupné z: doi:10.1093/clinchem/40.11.1996
28. LAI, W.K.Ch., a KAN, M.Y., 2015. Homocysteine-Induced Endothelial Dysfunction. *Annals of Nutrition and Metabolism* [online]. **67**(1), 1–12. ISSN 0250-6807, 1421-9697. Dostupné z: doi:10.1159/000437098
29. LU, Ch., ZU, Y., a YAM, V.W.W., 2007. Specific postcolumn detection method for HPLC assay of homocysteine based on aggregation of fluorosurfactant-capped gold nanoparticles. *Analytical Chemistry* [online]. **79**(2), 666–672. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac061513c
30. MATOUŠ, B., 2010. *Základy lékařské chemie a biochemie*. 1. vyd. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-702-8.
31. MATTHEWS, D.E., a FAREWELL, V.T., 2015. *Using and understanding medical statistics*. 5th, revised and extended edition vyd. Basel ; New York: Karger. ISBN 978-3-318-05458-3.
32. MCCULLY, K.S., 1999. *The homocysteine revolution: medicine for the new millennium*. Los Angeles: Keats Pub. ISBN 978-0-87983-975-8.
33. MOAT, S.J., ASHFIELD-WATT, P.A.L., POWERS, H.J., NEWCOMBE, R.G., a MCDOWELL, I.F.V., 2003. Effect of riboflavin status on the homocysteine-lowering effect of folate in relation to the MTHFR (C677T) genotype. *Clinical*

*Chemistry* [online]. **49**(2), 295–302. ISSN 0009-9147. Dostupné z: doi:10.1373/49.2.295

34. MYLES, P.S., CHAN, M.T.V., LESLIE, K., PEYTON, K., PAECH, M., a FORBES, A., 2008. Effect of nitrous oxide on plasma homocysteine and folate in patients undergoing major surgery. *British Journal of Anaesthesia* [online]. **100**(6), 780–786. ISSN 00070912. Dostupné z: doi:10.1093/bja/aen085
35. POKORNÝ, M., 2015. Role betainu v metabolismu homocysteinu. Význam pro plodnost a reprodukci. *New EU Magazine of Medicine*. 46–49.
36. PŘISTOUIPOVÁ, K., PŘISTOUIPIL, T.I., a HEYROVSKÝ, M., 1999. Homocystein - molekula těšící se rostoucí pozornosti. *Chemické listy*. **93**, 365–374.
37. RACEK, J., 2006. *Klinická biochemie*. 2. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-324-2.
38. REFSUM, H., SMITH, A.D., UELAND, P.M., NEXO, E., CLARKE, R., MCPARTLIN, J., JOHNSTON, C., ENGBAEK, F., SCHNEEDE, J., MCPARTLIN, C., a SCOTT, J.M., 2004. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clinical Chemistry* [online]. **50**(1), 3–32. ISSN 0009-9147. Dostupné z: doi:10.1373/clinchem.2003.021634
39. STRÁNSKÝ, M., 2011. Preventivní účinky kyseliny listové. *Interní medicína pro praxi*. **13**(4), Přehledné články, 159–162.
40. ŠÁLEK, T., FRANEKOVÁ, J., JABOR, A., a FRIEDECKÝ, B., 2016. Postanalytická fáze a interpretace laboratorního testu (post-postanalytická fáze). *Klinická biochemie a metabolismus*. (24(45)), 82–87.
41. ŠKOVIEROVÁ, H., VIDOMANOVÁ, E., MAHMOOD, S., SOPKOVÁ, J., DRGOVÁ, A., ČERVEŇOVÁ, T., HALAŠOVÁ, E., a LEHOTSKÝ, J., 2016. The Molecular and Cellular Effect of Homocysteine Metabolism Imbalance on Human Health. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **17**(10) [vid. 2021-06-16]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms17101733
42. ŠPIČKA, J., 2004. *Biochemie*. 1. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta. ISBN 978-80-7040-683-0.
43. ŠVÁBIKOVÁ, L., 2016. *Možnosti využití infračervené spektroskopie při analýze homocysteinu* [online]. B.m. [vid. 2021-06-23]. Univerzita Palackého v Olomouci, Faculty of Science. Dostupné z: <https://theses.cz/id/xcewsw/?lang=sk>
44. UELAND, P.M., a SCHNEEDE, J., 2008. [Measurement of methylmalonic acid, homocysteine and methionine in cobalamin and folate deficiencies and homocysteinuria]. *Tidsskrift for Den Norske Laegeforening: Tidsskrift for Praktisk Medicin, Ny Raekke*. **128**(6), 690–693. ISSN 0807-7096.
45. VODOVÁ, M., 2010. *Stanovení homocysteinu v tělních tekutinách metodou HPLC a jeho vliv na lidskou reprodukci* [online]. B.m. [vid. 2021-06-25].

Masarykova univerzita, Faculty of Science. Dostupné z: [https://theses.cz/id/uzn9t6/?lang=sk;zoomy\\_is=1](https://theses.cz/id/uzn9t6/?lang=sk;zoomy_is=1)

46. YOUNG, D.S., PESTANER, L.C. a GIBBERMAN, V., 1975. Effects of drugs on clinical laboratory tests. *Clinical Chemistry*. **21**(5), 1D-432D. ISSN 0009-9147.
47. ZHANG, Z., GU, X., FANG, X., TANG, Z., GUAN, S., LIU, H., WU, X., WANG, Ch., a ZHAO, Y., 2020. Homocysteine and the Risk of Cardiovascular Events and All-Cause Death in Elderly Population: A Community-Based Prospective Cohort Study. *Therapeutics and Clinical Risk Management* [online]. **16**, 471–481. ISSN 1176-6336. Dostupné z: [doi:10.2147/TCRM.S239496](https://doi.org/10.2147/TCRM.S239496)
48. ZIMA, T., 2008. Zásady přípravy pacienta k odběru krve a preanalytická část laboratorního vyšetření. *Medicina pro praxi* [online] [vid. 2021-06-16]. Dostupné z: [https://www.medicinapropraxi.cz/artkey/med-200809-0014\\_Zasady\\_pripravy\\_pacienta\\_k\\_odberu\\_krve\\_a\\_preanalyticka\\_cast\\_laboratorního\\_vysetreni.php](https://www.medicinapropraxi.cz/artkey/med-200809-0014_Zasady_pripravy_pacienta_k_odberu_krve_a_preanalyticka_cast_laboratorního_vysetreni.php)

## 9. Seznam příloh

### 9.1 Tabulky

Tabulka 1- Referenční rozmezí homocysteinu .....	12
Tabulka 2- Kalibrační monitor.....	29
Tabulka 3- Naměřené koncentrace Hcy v časových intervalech .....	30
Tabulka 4- Naměřené koncentrace ( $\mu\text{mol/l}$ ) s výpočtem rozdílu v % .....	34
Tabulka 5- Naměřené hodnoty při sledování stability Hcy ( $\mu\text{mol/l}$ ) s výpočtem rozdílu v %.....	36
Tabulka 6- Změny hladin homocysteinu u jednotlivých vzorků .....	38

### 9.2 Obrázky

Obrázek 1 - Vzorec homocysteinu .....	9
Obrázek 2- Schéma metabolismu homocysteinu (Králíková 2011) .....	10
Obrázek 3- Zobrazení přesnosti a pravdivosti a) přesnost a pravdivost, b) přesnost a nepravdivost, c) nepřesnost a pravdivost, d) nepřesnost a nepravdivost (Racek 2006)....	23
Obrázek 4- Analyzátor Cobas 6000 .....	27
Obrázek 5- Kalibrační křivka .....	29
Obrázek 6- Křivka koncentrací Hcy v různých časových intervalech mezi odběrem a vlastním zpracováním vzorku (1) .....	31
Obrázek 7- Křivka koncentrací Hcy v různých časových intervalech mezi odběrem a vlastním zpracováním vzorku (2) .....	32
Obrázek 8- Největší rozdíl koncentrací Hcy zpracovaných v časech 0 a 24h od odběru .....	32
Obrázek 9- Křivka koncentrací Hcy při sledování stability analytu (1).....	33
Obrázek 10- Křivka koncentrací při sledování stability analytu (2) .....	33
Obrázek 11- Vzestup koncentrace v % .....	35
Obrázek 12- Vzestup koncentrace v % .....	35
Obrázek 13- Stabilita analytu s rozdílem v % .....	37
Obrázek 14- Stabilita analytu s rozdílem v % .....	37
Obrázek 15- Procentuální rozdíl mezi koncentracemi vzorků.....	39
Obrázek 16- Procentuální rozdíl mezi koncentracemi vzorků.....	39



### 9.3 *Seznam zkratek*

- ALP – alkalická fosfatáza
- ALT - alaninaminotransferáza
- AST - asparátaminotransferáza
- ATP – adenosintriofosfát
- BHMT - betain-homocystein-metyltransferáza
- CBS – cystationin- $\beta$ -syntáza
- CoASH – koenzym A
- FAD – flavinadenindinukleotid
- GGT – gama-glutamyltransferáza
- GSH - glutathion peroxidáza
- HBsAg – antigen viru hepatitidy B
- Hcy – homocystein
- HCV – virus hepatitidy C
- HDL – high density lipoprotein
- HIV – human imunodeficiency virus
- hCG – human chorionic gonadotropin
- HHC – hyperhomocysteinémie
- HPLC - high-performance liquid chromatography (vysokoučinná kapalinová chromatografie)
- KO – krevní obraz
- NAD<sup>+</sup> – nikotinamidadenindinukleotid
- NADH - nikotinamidadenindinukleotid-hydrid
- MTHFR – methyltetrahydrofolátreduktáza
- MTHFHMT - metyltetrahydrofolát–homocystein–metyltransferáza
- SAM - S-adenosylmethionin
- SAH - S-adenosylhomocystein