



LABORATÓRNA DIAGNOSTIKA

Slovak Society of Clinical Biochemistry
Časopis pre pracovníkov diagnostických laboratórií

Číslo 1-2/2011
Ročník XVI.

LABKVALITA 2011

POPRAĎ, 13. – 15. NOVEMBERA 2011

SÚHRNY
A IN EXTENZO ČLÁNKY



Medesa

...dodavateľ laboratornej techniky a služieb...

Nový MARKER SEPSY **PATHFAST® PRESEPSIN**

 MITSUBISHI CHEMICAL

- ▶ rýchla diagnostika a prognóza sepsy na osvedčenom prístroji Mitsubishi Pathfast,
- ▶ umožňuje posúdenie miery závažnosti septického stavu

Mitsubishi Pathfast

- ▶ automatický analyzátor pre stanovenie kardiálnych markerov a ďalších testov z plnej krvi a plazmy
- ▶ paralelne je možné vyšetřovať 6 analytov alebo 6 vzoriek naraz, **s výsledkom do 17 minút**
- ▶ analyzátor nepotrebuje žiadne pomocné roztoky
- ▶ 1 test = 1 kazeta + 1 špička

Spektrum stanovovaných parametrov:

kardiálne markery:

- ▶ NT-proBNP, Myoglobin, Troponin I, CK-MB
- ▶ **ostatné testy:** D-Dimer, hsCRP, β -HCG
- ▶ **nový marker sepsy:** PRESEPSIN



MEDESA SK s.r.o., Remeselnícka 24, 831 06 Bratislava

E-mail: medesa@medesa.sk, Tel.: +420 602 263 748

www.medesa.sk

Personalizovaná zdravotná starostlivosť Roche

Vaša záruka individuálneho prístupu k pacientovi

Imunochemia

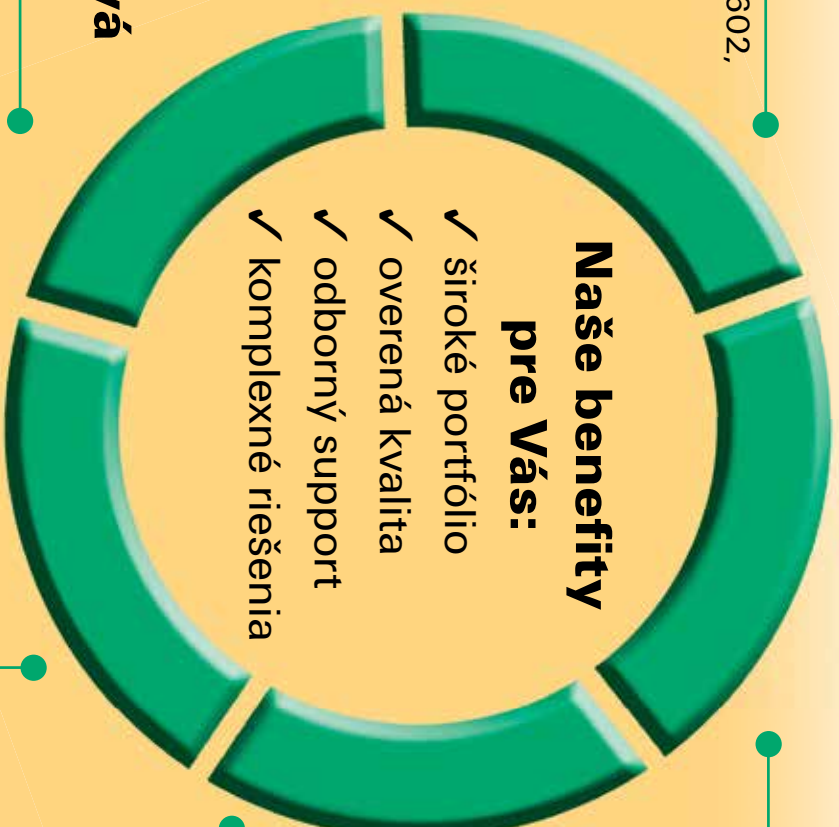
(cobas e 411 analyzer, moduly e 601 a e 602, Elecsys®, MODULAR E)

- štítna žľaza
- onkomarkery
- hormóny
- kardiálne markery
- hepatída
- kostné markery a anémia
- lieky a Downov syndróm
- TORCH
- retrovírusy, anémia, sepsa
- preeklampsia a iné

Molekulárna a tkanivová diagnostika

(COBAS® AMPLICOR analyzer, AmpliPrep a TaqMan® Instrument Systems, cobas® 4800 system)

- PCR technológia
- imunohistochemia
- in-situ hybridizácia



Klinická chémia

(cobas c 311 analyzer, moduly c 501, c 502 c 701 a c 702, COBAS INTEGRA®)

- enzýmy
- substráty
- špecifické proteíny
- TDM
- DAT

Near Patient Testing

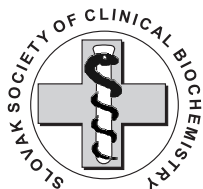
(cobas b 123 and 221 POC systems, CoaguChek®, AccuChek® Inform II, Accutrend® Plus, cobas h 232 POC system, Urisys 1100® urine analyzer)

- acidobázické analyzátory
- prenosný koagulometer (INR)
- sieťový glukometer
- prenosný analyzátor na Glu, Chol, TRIG, laktát
- reader kardiálnych markerov (CK-MB, myoglobín, troponín T, D-dimér, pro-BNP)
- močový analyzátor

Systémový prístup

(cobas u 411 urine analyzer, URISYS 2400® analyzer, cobas IT solutions)

- močová analýza
- softvérové produkty
- modelovanie prevádzky
- optimalizácia materiálového toku a pracovného procesu



LABORATÓRNA DIAGNOSTIKA

Slovak Society of Clinical Biochemistry

Časopis pre pracovníkov diagnostických laboratórií

Číslo 1–2/2011

Ročník XVI.

PRESEDA REDAKČNEJ RADY

Katarína Daňová

VÝKONNÝ REDAKTOR

Oliver Rácz

ODBORNÝ REDAKTOR

Ján Mocák

REDAKČNÁ RADA

Anna Stecová, bývalá predsedkyňa redakčnej rady

Ján Balla, bývalý výkonný redaktor

Pavol Blažíček, bývalý výkonný redaktor

Roman Alberty

Peter Božek

Ladislav Cebecauer

Jozef Čársky

Ivan Čižmár

Michal Farkaš

Drahoslav Gábor

Ján Lepej

Tomáš Lipšic

Vladimír Kohút

Peter Kubisz

Ivan Pecháň

Hedviga Pivovarníková

Viera Spustová

Dagmar Syrová

Katarína Šebeková

Helena Šeboková

Ivana Šidlíková

Božena Švecová

Rastislav Valko

Juraj Volmut

OBSAH

IN EXTENZO ČLÁNKY

METHODS FOR THE PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION OF LIPOSOMAL DELIVERY SYSTEMS.....7

Emmer, J., Lovrity, Z., Kiss-Tóth, É., Fodor, B.

PROTEOMICS AND MASS SPECTROMETRY: PROTEIN QUANTIFICATION USING STABLE ISOTOPE LABELED REAGENTS15

Lovrity, Z., Emmer, J., Juhaszne, Szalai, A., Koska, P., Fodor, B.

CHANGING PARADIGM IN THE DETERMINATION OF SERUM CREATININE AND IN THE ASSESSMENT OF GLOMERULAR FILTRATION24

Fodor, B., Szalai, A., Kiss-Tóth, É., Koska, P., Papp, M., Kiss-Tóth, E., Barkai, L.

PROJEKT ORGANIZÁCIE INTEGROVANÉHO PRENATÁLNEHO SKRÍNINGU - NAŠE PRVÉ VÝSLEDKY A SKÚSENOSTI31

Cisarík, F., Vavřík, J., Babjak, P., Podlucák, M., Sadiku, H., Kováčová, E., Masná, V., Staňová, I., Furmánková, S.

SYSTEMATICKÝ PREHEAD: POROVNANIE PRIAMYCH A NEPRIAMYCH METÓD STANOVENIA LDL-CHOLESTEROLU.....37

Rudolf Gaško

ASOCIÁCIA MEDZI POČTOM LIKVIOROVÝCH OLIGOKLONÁLNYCH PÁSOV IGG A PLAZMATICKÝMI HLADINAMI KOENZÝMU Q10, ALFA- A GAMA-TOKOFEROLU A BETA-KAROTÉNU U PACIENTOV SO SKLERÓZOU MULTIPLEX66

Ondrkalová, M., Kalnovičová, T., Kucharská, J., Kuračka, L., Turčáni, P.

PLAZMATICKÉ HLADINY KOENZÝMU Q10 V ASOCIÁCII S DEGRADAČNÝMI PRODUKTMI PURÍNOVÝCH NUKLEOTIDOV U PACIENTOV SO SKLERÓZOU MULTIPLEX.....73

Kuračka, L., Kalnovičová, T., Kucharská, J., Turčáni, P.

PROKALCITONÍN - BIOCHÉMIA, GENETIKA A FYZIOLÓGIA.....81

Lenártová, R., Birková, A., Guzy, J., Mareková, M.

DIAGNOSTICKÝ POTENCIÁL PROKALCITONÍNU90

Lenártová, R., Birková, A., Guzy, J., Mareková, M.

KATECHOLAMÍNY V KLINICKEJ BIOCHÉMII98

Đurovcová, E., Mašlanková, J., Biľecová-Rabajdová, M., Birková, A., Mareková, M.

KRYOGLOBULINÉMIE - VYUŽÍVAME SPRÁVNE SÚČASNÉ MOŽNOSTI LABORATÓRNEJ DIAGNOSTIKY?108

Đurovcová, E., Lazúr, J.

ABSTRAKTY LABKVALITA

ACTIVE ROLE OF EPMA IN HEALTHCARE PROMOTION: PATIENT IN THE FOCUS OF PREDICTIVE, PREVENTIVE AND PERSONALISED MEDICINE117

Golubnitschaja, O., Costigliola, V.

AKREDITÁCIA A KVALITA V MEDICÍNSKOM LABORATÓRIU122

Balla J., Kužmová A., Hrehorovský M., Pošefková I., Palková J., Karahutová R.

INDIKÁTORY PRE KVALITU POLITIKY V ZDRAVOTNÍCTVE126

Barlová, J., Lepej, J., Coraničová, J., Lepejová, K., Kapalla, M.

HODNOTENIE ZDRAVOTNÍCKYCH TECHNOLOGIÍ A LABORATÓRNA DIAGNOSTIKA128

Bielik, J.

IQC V REÁLNEM ČASE - FIREMNÍ MIDDLEWARE J AKO JEDEN Z NÁSTROJŮ K ZAJIŠTĚNÍ KVALITY MANAGEMENTU DAT A BEZPEČÍ PACIENTŮ.....128

Bischof, M.

KLÚČOVÁ ÚLOHA AMBULANCIE V UDRŽIAVANÍ KVALITY PREDANALYTICKEJ FÁZY - VPLYVY NA PREDANALYTIKU129

Blažiček, P.

PROTEOMIKA MOČU - BLIŽŠIE KU KLINICKEJ PRAXI?.....130

Đurovcová, E., Birková, A.

KONKURENCIA VERZUS ETIKA V LABORATÓRNEJ DIAGNOSTIKE - PRE A PROTI KVALITE131

Farkaš, M., Hvozdičová, B., Trechová, M.

MÁME JASNO V POŽIADAVKÁCH NA KVALITU V PREDANALYTICKEJ FÁZE?132

Gábor, D., Dobiasová, I., Gáborová, E.

CIRCULATING NUCLEIC ACIDS IN PREDICTIVE MEDICINE132

Gahan, P. B.

| | | | |
|--|-----|--|-----|
| PERSONALIZOVANÁ GENOMIKA V 21. STOROČÍ – POTENCIÁL A REALITA V SR | 133 | PERSONALIZOVANÁ DIAGNOSTIKA Z POHLADU PATOLÓGA | 147 |
| <i>Hikkel, I.</i> | | <i>Ondriaš, F., Mečiarová, I., Rampalová, J.</i> | |
| RACIONÁLNA A EFEKTÍVNA DIAGNOSTIKA – ZÁKLAD ADEKVÁTNEJ LIEČBY | 133 | SOUČASNOST A BUDOUCNOST KARDIOMARKERŮ | 148 |
| <i>Jurčáková, M.</i> | | <i>Pudil, R.</i> | |
| LABORATÓRNA DIAGNOSTIKA ALERGIE NA PRÍSTROJI IMMULITE SPOLOČNOSTI SIEMENS ANALYTIKA A KLINIKA | 135 | MANAŽMENT A ETIKA V RIADENÍ KVALITY MEDICÍNSKÝCH LABORATÓRIÍ | 149 |
| <i>Keleová, A.</i> | | <i>Špaček, L.</i> | |
| PERSONALIZOVANÉ METABOLICKÉ PROFILOVANIE | 135 | POŽADAVKY NORMY ISO 15189 NA PREANALYTIKU V TERÉNU A ZABEZPEČENÍ JEJICH DODRŽENÍ | 158 |
| <i>Kováč, G., Porubenová, A., Hrušovský, Š., Černá, K., Benetin, J., Blažíček, P.</i> | | <i>Šprongl, L.</i> | |
| PREDIKTÍVNA, PREVENTÍVNA A PERSONALIZOVANÁ MEDICÍNA (PPPM): INFORMÁCIE, OKOLNOSTI, AKTIVITY, PREDSTAVY | 138 | AKO SI PREDSTAVUJE KVALITNÚ SPOLUPRÁCU LABORATÓRIUM S KLINIKOU | 159 |
| <i>Kováč, G., Porubenová, A., Hrušovský, Š., Černá, K., Benetin, J.</i> | | <i>Štefanec, F., Keryová, Z.</i> | |
| VALIDATION OF THE PREDICTIVE MARKERS – STATE OF THE ART | 142 | BENEFITS OF ACCREDITATION OF PROVIDER OF INTERLABORATORYCOMPARISONS IN MEDICAL LABORATORIES ACCORDING TO NEW ISO17043 | 159 |
| <i>Krapfenbauer, K.</i> | | <i>Tiikkainen, U. H.</i> | |
| KOLKO CHORÝCH JE UŽ MÁLO, ABY BEŽAL BIZNIS V ZDRAVOTNÍCTVE? – EKONOMICKO-ETICKÉ DILEMY ZDRAVOTNEJ STAROSTLIVOSTI | 143 | NEW AND THE MOST POPULAR LABQUALITY SCHEMES | 160 |
| <i>Lepej, J., Lepejová, K.</i> | | <i>Tiikkainen, U. H.</i> | |
| LABKVALITA 2011 TRACEABILITY IN ROUTINE CLINICAL CHEMISTRY – STATING OR DEMONSTRATING? | 144 | STANOVENIE ANTIOXIDAČNÉHO STATUSU U VRCHOLOVÝCH ŠPORTOVCOV – VESLÁROV | 161 |
| <i>Linko, S.</i> | | <i>Urbánek, V., Kudláčková, M., Kajaba, I., Máleková, J., Pauková, V., Mišlanová, Cs., Valachovičová, M.</i> | |
| VPLYV BIOAKTÍVNEHO KOMPLEXU KVERCETÍNU, SELÉNU, KATECHÍNOV A KURKUMÍNU NA VYBRANÉ PARAMETRE KARDIOVASKULÁRNEHO RIZIKA | 145 | OXIDAČNÉ POŠKODENIE LIPIDOV, PROTEÍNOV A DNA U OSÔB S DOMINANTNOU KONZUMÁCIOU RASTLINNEJ POTRAVY | 163 |
| <i>Máleková, J., Maďarič, A., Kadrabová, J., Kudláčková, M., Kajaba, I., Mišlanová, Cs., Spustová, V., Blažíček, P., Valachovičová, M.</i> | | <i>Valachovičová, M., Kudláčková, M., Pauková, V.</i> | |

IN EXTENZO
ČLÁNKY

METHODS FOR THE PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF LIPOSOMAL DELIVERY SYSTEMS

János Emmer¹, Zita Lovrity²
Éva Kiss-Tóth¹, Bertalan Fodor¹

¹Department of Nanobiotechnology and Regenerative Medicine, Faculty of Healthcare, University of Miskolc

²Department of Combustion Technology and Thermal Energy, Faculty of Materials Science and Engineering, University of Miskolc

ABSTRACT

The ability of liposomes to encapsulate different materials has given rise to the relatively recent use of liposomes as vehicles to incorporate active agents into compartmentalized systems. In order to assess the quality of liposomal delivery systems and obtain quantitative measures that allow comparison between different batches of liposomal delivery systems, various parameters should be monitored. In this review we present the most commonly used methods and techniques for the physicochemical characterization of liposomal delivery systems.

Keywords: Liposome characterization; Analysis; Delivery systems; Review

1. INTRODUCTION

Controlled delivery technology represents one of the border areas of science, which involves multidisciplinary scientific approach, contributing to human health care. Delivery systems mainly use liposomes, which can easily entrap or anchor many different substances. Liposomes consisting of phospholipid bilayers are widely studied systems in the pharmaceutical and biological sciences. Liposomes are self-assembled structures that occur in nature and which are formed spontaneously when certain lipids are dispersed in aqueous media. There are various classes of liposomes. Liposomes are classified either by the method of their preparation or by the number of bilayers present in the vesicle, or by their size.

Depending upon the structure there are two main types of liposomes. Unilamellar liposomes have a single phospholipid bilayer sphere enclosing aqueous solution and multilamellar liposomes have onion structure (Sharma Shailesh *et al.*, 2009). Liposomes are classified according to their structure as multilamellar vesicles (MLVs, 0.1–15 µm), small unilamellar vesicles (SUVs, 25–50 nm), large unilamellar vesicles (LUVs, 100 nm to 1 µm), giant unilamellar vesicles (GUVs, 1.0–200 µm) and multivesicular vesicles (MVVs, 1.6–10.5 µm) (Gomez-Hens and

Fernandez-Romero, 2005). Depending on the composition liposomes can have a positive, negative or neutral surface charge. The ability of liposomes to encapsulate different materials has given rise to the relatively recent use of liposomes as vehicles to incorporate active agents into compartmentalized systems.

Four major types of liposomes have been used as delivery systems (Gomez-Hens and Fernandez-Romero, 2006):

- Conventional liposomes, currently involving neutral phospholipids, which are relatively unstable structures. Cholesterol is often added in order to stabilize these structures.
- Stealth liposomes, also named sterically stabilized liposomes, are formulated by incorporating hydrophilic long-chain polymers.
- Active liposomes, which comprise modified liposomes containing substances that provide a selective, controlled release of the liposome.
- Charged liposomes, also called lipoplexes, which comprise liposomes that incorporate charged phospholipids.

The capability of liposomes to entrap hydrophilic and hydrophobic molecules has been exploited to develop delivery systems in agriculture and the nutrition industry. Liposomes are also relevant to gene manipulation, which is an active field that has progressed rapidly in molecular and cell biology research and provides a substantial base for gene therapy in clinical trials. Liposomes have also found use as drug delivery systems. Some of the advantages associated with encapsulation of a drug substance within a liposomal drug delivery vehicle include: prolongation of the plasma half-life of the drug, decreasing the toxicity of the dosed drug, targeting to specific molecules or structures in the body, or having a triggered drug release induced by acid, light, heat, or enzymes. Though liposomes have been used as potential carriers with unique advantages their applications are limited due to inherent problems such as low encapsulation efficiency, rapid leakage of water-soluble drug in the presence of blood components and poor storage stability. In order to assess the quality of liposomes and obtain quantitative measures that allow comparison between different batches of liposomes, various parameters should be monitored.

The present review details methods for the physicochemical characterization of liposomal delivery systems.

2. CHARACTERIZATION OF LIPOSOMAL DELIVERY SYSTEMS

Gomez-Hens and Fernandez-Romero (2005) have classified the parameters involved in characterizing liposomes into three categories:

- Morphological characterization: Size, shape, stability, size distribution or polydispersity, and electrical liposome charge.

- Structure organization: Lipid composition, inner structure, transition temperatures, permeability and fluidity.
- Functionality: Encapsulation efficiency, chemical stability, drug release study, reactivity and fusion capability.

Edwards and Baeumner (2006) have reported characteristics parameters of liposomes include liposome lamellarity, diameter and size distribution, lipid composition and concentration determination, the encapsulant concentration and its encapsulation efficiency. Other commonly monitored parameters include surface charge, phase transitions, and quantification of residual solvents.

An important feature of phospholipid membrane is the existence of temperature-dependent reversible phase transition, where the hydrocarbon chains of the phospholipid undergo a transition from an ordered (gel) to a more disordered fluid (liquid crystalline) state. The physical state of the bilayer affects the permeability, leakage, and overall stability of the liposomes. The phase-transition temperature is a function of the phospholipid mixture content.

Phospholipids are dissolved in organic solvents in the preparation of liposomes. The organic solvents used for this purpose range from chloroform, ether, freon, methylene chloride, methanol and their combinations. Although these organic solvents help achieve molecular mixtures of lipids and there by uniform distribution of lipids in the lipid bilayers, the residual amounts of solvents left in the final preparation could pose health hazard to the end user. Polar solvents such as ethanol can be used to improve the safety factor but it is not easy to remove from the product. Residual solvents such as ethanol and hydrocarbons may lead to physical destabilization of liposomes by interfering with the cooperative hydrophobic interactions among the phospholipid methylene groups that hold the structure together. Solvent residuals in the final product are an unavoidable troublesome situation to the liposome dosage form manufacturers.

The stability of liposomes is a major consideration in all steps of their production from process steps to storage to delivery. Influence of environmental factors such as temperature, light, oxygen, and heavy metal ions may initiate chemical or physical reactions. These reactions may include changes in size distribution of vesicles, and oxidation and hydrolysis of lipids.

3. PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION METHODS

Methods of characterization of liposomes immediately after preparation and upon storage are required for adequate quality control of the product. The methods have to be reproducible, precise, and rapid. Liposomes and their constituents have been investigated using several analytical techniques, mainly involving separation.

3.1 Spectroscopic characterization

3.1.1 Photon correlation spectroscopy (PCS)

Various methods are available for the determination of liposomes size and homogeneity. For in process control, photon correlation spectroscopy (PCS) is the most valuable and economical method.

Study of Kuntschea *et al.* (2010) focuses on the physicochemical characterization of different temoporfin-loaded liposome formulations. The dispersions as well as freeze-dried formulations were characterized by photon correlation spectroscopy.

3.1.2 Near-infrared (NIR), Fourier transform infrared (FTIR) and Raman spectroscopy

Non-contact experimental techniques based on collecting absorbed or scatter light, such as near-infrared (NIR), Fourier transform infrared (FTIR) and Raman spectroscopy are among the most important tools that provide information which can be applied to the identification, characterization and analysis of nano-sized biological samples such as lipids, liposomes and nanovesicles. The thermal properties of lipids and liposomes have been investigated extensively because of their importance to elucidate various mechanisms governing phenomena such as trans-membrane diffusion, vesicle formation and fusion as well as drug and protein membrane interactions. Infrared spectroscopy is an established method used to monitor the thermotropic phase behavior of lipids.

Bista *et al.* (2010) have studied newly developed novel self-forming synthetic PEGylated lipids and nanovesicles by means of Raman vibrational spectroscopic techniques.

3.1.3 UV-Vis spectroscopy

Liposomes encapsulation efficiency was determined using the dialysis technique for separating the non-entrapped drug from liposomes. Ciclopirox olamine was spectrometrically assayed at 204 nm (Girhepunje *et al.*, 2010).

Doxorubicin concentration of the liposomal samples was measured on a UV-vis spectrometer at $\lambda = 480$ nm by adding absolute ethanol to the samples (Papagianaros *et al.* 2005). Prior to determination the samples were purified by passing the samples through a Sephadex G75 column.

The percentage drug entrapped (PDE) was determined by ultra-centrifugation. Then the clear supernatant was separated and analyzed for lamivudine content after appropriate dilution by UV-spectrophotometer (Pai and Devi 2009).

3.1.4 Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy

¹H NMR spectroscopy

Proton NMR spectroscopy is an alternative technique that allows the determination of liposomal encapsulation

efficiency without the need for physical separation of entrapped and non-entrapped drug.

Colchicine- β -cyclodextrin complex was prepared by freeze-drying (Singh *et al.*, 2010). ^1H NMR was carried out to check the formation colchicines-BCD complex and *in vitro* drug release study.

^{31}P NMR spectroscopy

Liposome lamellarity determination is often accomplished by ^{31}P NMR. In this technique, the addition of Mn^{2+} quenches the ^{31}P NMR signal from phospholipids on the exterior face of the liposomes. Mn^{2+} interacts with the negatively charged phosphate groups of phospholipids and causes a broadening and reduction of the quantifiable signal. The degree of lamellarity is determined from the signal ratio before and after Mn^{2+} addition (Edwards and Baeumner, 2006).

Peleg-Shulman *et al.* (2001) were reported a multi-nuclear (^{13}C , ^{31}P , ^1H , ^{15}N , ^{195}Pt) NMR study in which several techniques have been used to assess the physical nature of cisplatin in liposomal formulations.

3.1.5 Fluorescence correlation spectroscopy (FCS)

Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) is a versatile method, which has demonstrated a great potential for numerous applications including the assessment of size distribution of the nanoparticles in suspension. This technique is based on monitoring the emission intensity fluctuations caused by single molecules passing through the laser excitation volume. These fluctuations can be quantified in their strength and duration by temporally detecting the autocorrelation signal.

Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) has been utilized to measure the size distribution of lipid nanovesicles in suspensions (Bista *et al.*, 2010).

3.2 Separation methods

3.2.1 Solid-phase extraction (SPE)

Solid-phase extraction (SPE) is of great interest in the separation of liposomal and non-liposomal drug forms. Separation is based on the property of liposomes to cross reversed-phase C18 silica gel cartridges without being retained, while a non-liposomal drug is retained on the stationary phase.

Application of SPE is the separation of liposomal and non-liposomal forms of daunorubicin and daunorubicinol (Griese *et al.*, 2002), which are subsequently determined by capillary electrophoresis (CE). A method for the determination of the entrapped mitoxantrone in liposome preparations was developed by Sai-Lung Law and Tsuei-Fen Jang (1994). The method consists of a solid-phase extraction procedure followed by HPLC analysis. A robust, specific and sensitive method has been developed to effectively separate and then quantify

the free drug and liposomal drug, present in human plasma (Deshpandea *et al.*, 2010). This method utilizes solid phase extraction Oasis HLB cartridges, which retains the free drug and the liposomal Amphotericin B was eluted from the cartridge in first step. After separation and extraction, the quantification of free and liposomal fractions of Amphotericin B was performed by HPLC-MS-MS technique. A method for the determination of betamethasone in permeation experiments was developed by Gillet *et al.* (2011). SPE was needed to clean up the samples before HPLC injection. The extraction procedure was carried out on C18 cartridge.

3.2.2 Chromatographic techniques

Chromatography has been the traditional technique of choice for the analysis of lipids. Thin-layer chromatography and liquid chromatography have been the most widely used methods in the field, especially in combination with UV detection.

High-performance liquid chromatography (HPLC)

Lipid composition of liposomes is usually quantified via high-performance liquid chromatography (HPLC) after extraction of the lipids in an organic phase. Lipids can be detected in the region of 203–205 nm. Unsaturated fatty acids exhibit high absorbance while the saturated fatty acids exhibit lower absorbance in the 200 nm wavelength region of the UV-spectrum. This phospholipid identification and assay method is simple, reliable and reproducible.

Vemuri and Rhodes (1995) have checked the separation of phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylglycerol (PG) on Lichrosorb Diol and Lichrosorb SI-60 and found Lichrosorb Diol suited for phospholipid identification.

Meyer *et al.* (2000) have proposed a direct method for lipid quantification, which does not require lipid extraction from the liposomal formulation prior to sample analysis. They have described a simple and fast reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) procedure using ultraviolet (UV) detection that provides efficient separation and quantitation of cationic and neutral lipids from liposomes. These methods can be adapted as is the case in process control and product control methods.

In addition to conventional liposomes, pegylated lipids were used for the preparation of stealth liposomes (Kuntschea *et al.*, 2010). Lipid composition measurements were done on a HPLC system equipped with a Spherisorb NH_2 pre- and separation-column and an evaporative light scattering detector (ELSD).

Normal phase HPLC is a common technique for the analytical separation of lipid components based on their relative hydrophobicity, such as alkyl-acyl chain lengths and head group polarity. The separation depends on differences in the partition coefficients of the various components between the stationary phase (polar matrix) and mobile phase (relatively non-polar solvent).

A Diol column (bonded normal phase) was evaluated in conjunction with an evaporative light scattering detector (ELSD) for the separation and detection of DMRIE and DOPE in the clinical formulation (Felgner, 1977).

HPLC has been widely applied to the determination of drugs in liposome formulation. The general procedure involves the use of organic solvents or surfactants to dissolve the phospholipid bilayer and release the encapsulated drug. The encapsulated compound is separated from the lipids. It can be quantified by HPLC. Gomez-Hens and Fernandez-Romero (2006) shows some features of these methods. UV detection is used in most of them. A limitation of these HPLC methods is that they usually involve the disruption of liposomes, measuring total drug in the sample and not drug specifically entrapped within the liposome. We can eliminate it with using SPE separation for the determination of liposomal and non-liposomal forms before the analysis of each fraction by HPLC.

In permeation experiments encapsulating and free betamethasone was determined by HPLC analysis with UV detection at 240 nm (Gillet *et al.*, 2011). SPE was needed to clean up the samples before HPLC injection.

The concentration of meloxicam in the formulation was determined by HPLC analysis after disruption of the vesicles (liposomes and transfersomes) with Triton X-100 (Duangjit *et al.*, 2011). UV detection was viewed at 364 nm.

Total and free combretastatin A4 in the liposome formulations were determined using HPLC analysis and UV detection at 295 nm were used (Nallamothu *et al.*, 2006). Total drug was determined after ethanol extraction. Free combretastatin A4 was separated from the liposome encapsulated part using a centrifugal filter device.

Qualitative and quantitative analysis of lamivudine pure drug as solution and in liposome formulations were performed by an HPLC isocratic system with UV detection at 280 nm (Pai and Devi, 2009).

RP-HPLC allows the determination of peptide content without interference by lipids or polymer in liposomal and polymeric formulations (Lutsiak *et al.*, 2002).

Attachment of RGD peptides to the liposome surface was measured indirectly by determining noncoupled peptide fraction using HPLC with detection at 214 nm (Nallamothu *et al.*, 2006)

Thin-layer chromatography (TLC), high-performance thin layer chromatography (HPTLC)

TLC methods for phospholipid analysis often rely on lipid separation using a mixture of chloroform, methanol, and water or ammonium hydroxide. Detection is frequently accomplished using molybdenum blue in sulfuric acid and ninhydrin stains for the detection of phosphate and primary amino groups, respectively (Edwards and Baumner, 2006).

Phospholipids and degradation products are determined after being extracted from liposomes. The lipid mixture can be separated in a two-dimensional

thin-layer chromatographic (TLC) system (Vemuri and Rhodes, 1995).

HePC, EPC and SA were determined by high performance thin-layer chromatography coupled with a flame ionization detector (HPTLC-FID) (Papagiannaros *et al.*, 2005).

Size-exclusion chromatography (SEC)

Exclusion chromatography is the name given to separations which occur due to differences in the molecular weight and shapes of the solutes being separated. For exclusion chromatography to take place, the pores of the support (agarose, dextran, polystyrene beads, silica or glass), should be of such a range as to allow some of the molecules to enter. Very small molecules permeate all the internal pores of the support particles. Very large molecules are unable to enter any of the pores. These are totally excluded.

Size exclusion chromatography (SEC) is an old and widely used tool to separate small solutes from liposomes or to narrow the size distribution. A liposome preparation of varied vesicle sizes flows down the column there is a separation of the liposome vesicles according to size. Then larger vesicles that are totally excluded elute first, and the smaller vesicles which are held back as a consequence of permeating the particle pores, elute in reverse order of size. The pore volume of the particles should be as large as possible to increase the separation power of the support. It is also necessary that there is no adsorption of the phospholipid vesicles onto the surface of support, otherwise the separation mechanism will not be one of exclusion and erroneous results may be obtained. Since the most retained vesicles in size exclusion chromatography are the small molecules which permeate the particle completely, this means that even in a complex sample all the components are eluted in a relatively short time, in contrast to the other modes of HPLC. Conventional SEC is frequently used for the separation of liposomes from unencapsulated materials as a final purification step, but the use of HPLC-SEC for analysis offers increased resolution of liposome populations, reduced sample size, and better reproducibility.

The use of conventional and high-performance SEC for liposome characterization has been reviewed (Lundahl *et al.*, 1999). SEC of liposomes and similar structures is affected by the size and shape of the structures, and possibly also by their flexibility. Liposomes may be deformed and thereby either pass through relatively narrow pores or be excluded from relatively large pores, dependent on shape and orientation relative to the pores. Gel matrices provide a multitude of interaction sites of a wide range of affinities for liposomes. The strength of interaction will depend on the lipid bilayer composition, and the number of possible interaction sites will be affected by the size and flexibility or rigidity of the liposomal structures. A further factor is that the relation between surface area and internal volume limits the deformability of small liposomes.

HPLC-SEC can offer a powerful technique for not only size distribution determination, but also stability in terms of aggregation and vesicle permeability.

Size-exclusion chromatography has been used for fractionation of liposomes, proteoliposomes and bio-membrane vesicles of up to approximately 500 nm in size and for separation of these entities from smaller components. Liposome sizes, encapsulation stability, and solute affinities for membrane proteins have been determined (Lundahl *et al.*, 1999).

Size-exclusion chromatography technique was successfully used to separate free drug from the encapsulated portion of the drug.

Ion-exchange chromatography (IEC)

Ion-exchange chromatography was suggested by researchers to separate liposomes from freely floating drug molecules, if the liposomes and drug molecules carry different net charges on them (Vemuri and Rhodes, 1995).

Ion-exchange chromatography has been applied for fractionation of small proteoliposomes which had been prepared to contain a single or at most a few red cell membrane proteins per proteoliposome (Lundahl *et al.*, 1999).

Gas chromatography (GC)

GC analysis of lipids typically requires a derivatization step to ensure sufficient volatility of the components, either through trimethyl silylation or methyl esterification prior to detection by flame ionization (FID) or MS. Free fatty acid content has been determined by gas chromatography with a flame ionization detector.

Residual solvents may be toxic when liposomes are used to encapsulate drugs and can cause liposome destabilization upon storage. Gas chromatography has been used method in identification and quantitation of residual solvents. Determination of residual chloroform in liposomes can be performed by gas chromatographic technique with electron capture detector (Vemuri and Rhodes, 1995). The analysis of residual chloroform and methanol in the liposomal formulation was determined by gas chromatography with a flame ionization detector (Pai and Devi, 2009). The formulations were injected after appropriate dilution with dimethyl sulfoxide.

3.2.3 Field-flow fractionation (FFF)

Field-flow fractionation (FFF) is a technique which overcomes some of the limitations of HPLC in liposome analysis, and composes a family of techniques, including electrical (EI), thermal (Th) sedimentation (Sd) and flow (FI) FFF (symmetrical and asymmetrical) (Edwards and Baeumner, 2006). These techniques rely on the application of a field which is perpendicular to the direction of flow. The mechanism of FIFFF versus SdFFF for liposome analysis differs in that FIFFF separates vesicles on a hydrodynamic size basis,

whereas SdFFF separates them on a weight basis. In normal mode FFF, small liposomes elute first due to their higher diffusion coefficient and subsequent higher elevation from the accumulation wall.

In case of asymmetrical flow field-flow fractionation (AsFIFFF) the separation channel consists of an impermeable top block and a bottom block holding a semipermeable membrane laying on a porous frit constituting the accumulation wall. The perpendicular flow field is caused by restricting the main flow at the channel outlet. This restriction will force portions of the carrier liquid to leave the channel through the bottom block and is thus causing a field perpendicular to the main flow direction, the so-called cross flow. Asymmetrical flow field-flow fractionation (AsFIFFF) has increasingly been applied in studies of size and mass distributions of particles of biopolymeric materials, drug/plasma protein complexes, phospholipid vesicles and phospholipid/protein complexes. AsFIFFF is an analytical separation method, capable of fractionating particulates according to their size, and form a retention profile, providing accurate sizes and size distributions for polydisperse particle samples. Study of polydisperse vesicle formation by AsFIFFF is one way to tell if liposomes have undergone physical or chemical instabilities.

The advantages of the FFF technique include the wide range of particle sizes that can be separated (~1 nm–100 nm) with high resolution. The disadvantages of FFF include the complexity and expense of the instrumentation, limited commercially available membrane options leading to potential loss of sample through adsorption or permeation, separation mechanism considerations above a vesicle diameter of 1 nm, liposome retention dependence on ionic strength (Edwards and Baeumner, 2006).

The stability of zwitterionic phosphatidylcholine vesicles in the presence of phosphatidyl serine (PS), phosphatidic acid (PA), phosphatidyl inositol (PI), and diacylphosphatidyl glycerol (PG) phospholipid vesicles, and cholesterol or calcium chloride was investigated by asymmetrical flow field-flow fractionation (AsFIFFF) (Yohannes *et al.*, 2006).

Asymmetrical flow field-flow fractionation (AsFIFFF)/multi-angle light scattering (MALS) was employed for studying filter-extruded liposomes in carrier solutions with different ionic strength and osmolarity (Hupfeld *et al.*, 2010).

Capillary electrophoresis (CE)

The electro migration of liposomes is a complex process in which liposomal deformation and field-induced polarization may occur during electrophoresis. The thickness of the electric double layer, the surface charge density and the liposome radius are important variables that affect liposome separation. Several liposomal delivery systems have been studied by CE.

A general overview of analysis and characterization of liposomes by capillary electrophoresis is given by Bilek

et al. (2006). In this report, techniques and methods are described that can be used to characterization and separation of liposomes as analytes by capillary electrophoresis (CE). Only a few studies have utilized CE to characterize liposomal drug delivery systems. These studies focused on determining drug encapsulation, stability of the drug formulation or binding affinity between the drug substance and the delivery system.

A capillary electrophoresis-based method to characterize a PEGylated liposomal drug formulation of the anti-cancer agent oxaliplatin was developed (Franzen *et al.*, 2011). The drug leakage of the PEGylated formulation was determined by capillary electrophoresis.

Other separation methods, which are not described in more detail here, include centrifugation, filtration, dialysis, electrokinetic chromatography (EKC), and capillary electrochromatography (CEC).

3.3 Detection methods

Numerous separation methods with photometric, fluorimetric and MS detection have studied the characterization of liposomal drug formulations. The evaporative light-scattering detector (ELSD) has been proven to be effective in detecting poor UV-absorbers, such as most lipids. Effluent from the column is nebulized to form a homogeneous mist. This aerosol then enters a heated tube where the mobile phase evaporates to leave non-volatile analytes. The light-scattering caused by the non-volatile analytes is detected by a photomultiplier and converted to a signal. The amount of scattered light is a function of the mass of the analyte.

In addition to the detection systems used in the separation methods, there were several investigations in which the control of liposomes as delivery systems was carried out directly, without using separation.

Dynamic light scattering ((DLS) is extensively used in liposome size distribution analysis. DLS measures the time-dependent fluctuations of light scattered from particles experiencing Brownian motion, which results from collisions between suspended particles and solvent molecules. While DLS relies on detection of light scatter at 90° using time-dependent light scattering fluctuations, static light scattering (SLS) measures the time-average intensity of scatter as a function of the angle. Multi-angle light scattering (MALS) utilizes the angular distribution of scattered light to determine the root mean square radius, the weight-averaged molecular weight, and the geometry of the particles. MALS provides an absolute measure of molecular weight without comparison to reference standards. (Edwards and Baeumner, 2006).

The exact size and size distribution of the sterically stabilized with PEG liposome (long circulating liposomes, LCL) preparations were determined using the standard method of dynamic light scattering (Nalamothu *et al.*, 2006).

The particle size of the liposomes and their complexes with DNA were obtained by dynamic light scattering measurements (Xu *et al.*, 1999).

3.4 Microscopic studies

3.4.1 Electron microscopy (EM)

Using electron microscopic techniques, like cryo-transmission electron microscopy and/or freeze fracture electron microscopy it is possible to show that different liposomes morphologies were formed.

The morphology of the liposomes and lipoplexes was examined by electron microscopy after freeze-fracture sample preparation (Xu *et al.*, 1999).

Transmission Electron Microscopy (TEM) was used to visualize the liposomal and transfersomal vesicles (Duangjit *et al.*, 2011).

3.4.2 Atomic force microscopy (AFM)

Atomic force microscopy can also be used for the visualization of liposomes. This method is a noninvasive technique. This technique relies on the raster scanning of a nanometer sized sharp probe over a sample which has been immobilized onto a carefully selected surface, which is mounted onto a piezoelectric scanner. The tip is attached to a flexible cantilever. Deflection resulting from passage of the tip over sample attributes is measured by a laser beam. The reflected laser beams are then detected at photodiode array detectors which through a feedback mechanism maintain the distance of the probe, amplitude of oscillation, or the cantilever deflection constant, depending on the scanning mode. The end result is a high resolution three-dimensional profile of the surface under study. (Edwards and Baeumner, 2006).

Krapf *et al.*, (2011) presented an atomic force microscopy study on solid-supported multilayered dry lipid films prepared from aqueous vesicle suspensions with and without applying a spin-coating step in the preparation.

3.5 Miscellaneous methods

3.5.1 Zeta potential measurement

Surface charge can also be analyzed through zeta potential measurements. Zeta-potential of liposomes is a parameter that indicates their physical stability.

The zeta potentials of the lipoplexes were determined with a laser electrophoretic mobility instrument (Xu *et al.*, 1999). The lipoplex zeta potential changes from negative to positive when the mixing charge ratio changes from excess negative to excess positive. At the various charge ratios, the zeta potentials of the

complexes were quite similar among complexes formed from different liposome compositions.

Zeta potential of meloxicam suspensions and meloxicam-loaded liposomes and transfersomes were determined by Zeta Potential Analyzer at room temperature (Duangjit *et al.*, 2011).

3.5.2 Differential scanning calorimetry (DSC)

The phase behavior and fluidity of the lipid in liposomal delivery systems is also of interest. They can also be analyzed through differential scanning calorimetry (DSC).

Differential scanning calorimetry has been used extensively for the determination of transition temperatures as well as enthalpy changes between various lipid phases, primarily the gel-to-liquid crystalline phase transition (Garidel and Peschka-Süss, 2007). Based on DSC data, a complete phase diagram describing the composition of the lipid mixture as a function of temperature can be constructed by analyzing heat-capacity curves.

Incorporation of temoporfin resulted in a distinct concentration dependent decrease of the main phase transition of the liposomes (Kuntschea *et al.*, 2010).

3.5.3 Wet chemistry techniques

Several wet chemistry techniques are commonly used for the determination of phospholipid content. Most of these techniques include the use of molybdate-containing reagents to yield a blue-colored product. The blue product can then be measured by photometry at 830 nm for the quantitative assessment of phospholipids in the preparation. Phospholipids can also be analyzed through complex formation with ammonium ferrothiocyanate, extraction into chloroform, and absorbance measurement at 488 nm (Stewart assay).

The content of phospholipids in liposomes was estimated by Stewart assay (Pai and Devi, 2009). The liposomes were converted into an alcoholic solution. The solvent was evaporated to obtain the thin film of lipid which was then estimated by the above method.

4. CONCLUSIONS

The development of analytical methods to control the effectiveness of liposomal delivery systems runs parallel to the development of these liposomal delivery systems. The methods have to be reproducible, precise, and rapid.

If liposomal delivery systems are prepared under well-controlled conditions, and if their characteristics are optimized for their specific application, they can be truly amazing and versatile tools ameliorating the specific application significantly.

ACKNOWLEDGEMENT

This research was carried out as part of the TAMOP-4.2.1.B-10/2/KONV-2010-0001 project with support by the European Union, co-financed by the European Social Fund.

REFERENCES

1. **Andrieux, K., Lesieur, S., Ollivon, M., Grabielle-Madelmont, C. (1998):** *Methodology for vesicle permeability study by high-performance gel exclusion chromatography.* Journal of Chromatography B, 706, 141–147.
2. **Bilek, G., Kremser, L., Blaas, D., Kenndler, E. (2006):** *Analysis of liposomes by capillary electrophoresis and their use as carrier in electrokinetic chromatography.* Journal of Chromatography B, 841, 38–51.
3. **Bista, R. K., Bruch, R. F., Covington A. M. (2010):** *Spectroscopic characterization of nanovesicles originating from self-forming synthetic PEGylated lipids.* Vibrational Spectroscopy 53, 26–131.
4. **Deshpandea, N. M., Gangradeb, M. G., Kekarea, M. B., Vaidyac, V. V. (2010):** *Determination of free and liposomal Amphotericin B in human plasma by liquid chromatography-mass spectroscopy with solid phase extraction and protein precipitation techniques.* Journal of Chromatography B, 878, 315–326
5. **Duangjit, S., Opanasopit, P., Rojanarata, T., Ngawhirunpat T. (2011):** *Characterization and In Vitro Skin Permeation of Meloxicam-Loaded Liposomes versus Transfersomes.* Hindawi Publishing Corporation, Journal of Drug Delivery, Volume 2011, Article ID 418316, 9 pages, doi:10.1155/2011/418316
6. **Edwards, K. A., Baeumner A. J. (2006):** *Analysis of liposomes.* Talanta, 68, 1432–1441.
7. **Felgner, J. H. (1977):** *Separation and quantitation of cationic liposome components by high performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection.* Pharmaceutical Research, Vol. 14, No. 9, 1269–1271.
8. **Franzena, U., Nguyen, T. T. T. N., Vermehren, C., Gammelgaard, B., Østergaard, J. (2011):** *Characterization of a liposome-based formulation of oxaliplatin using capillary electrophoresis: Encapsulation and leakage.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 55, 16–22.
9. **Garidel, P., Peschka-Süss, R. (2007):** *Lipoplexes in Gene Therapy under the Considerations of Scaling Up, Stability Issues, and Pharmaceutical Requirements.* In: **G. Gregoriadis** (Ed.): *Liposome Technology, Liposome Preparation and Related Techniques.* Vol. I, Third Edition, Informa Healthcare, New York London, Ch. 7, p. 97.
10. **Gillet, A., Lecomte, F., Hubert, P., Ducat, E., Evrard, B., Piel, G. (2011):** *Skin penetration behaviour of liposomes as a function of their composition.* European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 79, 43–53.
11. **Girhepunje, K., Pal, R., Behera, A., Husen, M., Thirumoorthy, N. (2010):** *Transdermal Delivery of Ciclopirox*

- Olamine Via Liposomal Carrier*. Journal of Pharmacy Research, 3(12), 2898–2900.
12. **Gomez-Hens, A., Fernandez-Romero, J. M. (2005):** *The role of liposomes in analytical processes*. Trends in Analytical Chemistry, Vol. 24, No. 1, 9–19.
 13. **Gomez-Hens, A., Fernandez-Romero, J. M. (2006):** *Analytical methods for the control of liposomal delivery systems*. Trends in Analytical Chemistry, Vol. 25, No. 2, 167–178.
 14. **Griese, N., Blaschke, G., Boos, J., Hempel, G. (2002):** *Determination of free and liposome-associated daunorubicin and daunorubicinol in plasma by capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A, 979, 379–388.
 15. **Hupfeld, S., Moen, H.H., Ausbacher, D., Haas, H., Brandl, M. (2010):** *Liposome fractionation and size analysis by asymmetrical flow field-flow fractionation/multi-angle light scattering: influence of ionic strength and osmotic pressure of the carrier liquid*. Chemistry and Physics of Lipids 163, 141–147.
 16. **Kuntschea, J., Freislebena, I., Steinigerb, F., Fahra, A. (2010):** *Temoporfin-loaded liposomes: Physicochemical characterization*. European Journal of Pharmaceutical Sciences 40, 305–315.
 17. **Krapf, L., Dezi, M., Reichstein, W., Köhler, J., Oelrich, S. (2011):** *AFM characterization of spin-coated multilayered dry lipid films prepared from aqueous vesicle suspensions*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 82, 25–32.
 18. **Lundahl, P., Zeng, C.M., Hägglund, C.L., Gottschalk, I., Greijer, E. (1999):** *Chromatographic approaches to liposomes, proteoliposomes and biomembrane vesicles*. Journal of Chromatography B, 720, 103–120.
 19. **Lutsiak, M.E.C., Kwon, G.S., Samuel, J. (2002):** *Analysis of peptide and lipopeptide content in liposomes*. J. Pharm. Pharmaceut. Sci. 5(3), 279–284.
 20. **Meyer, O., Roch, O., Elmlinger, D., Kolbe, H. V. J. (2000):** *Direct lipid quantitation of cationic liposomes by reversed-phase HPLC in lipoplex preparation process*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 50, 353–356.
 21. **Nallamothu, R., Wood, G.C., Pattillo, C.B., Scott, R.C., Kiani, M.F., Moore, B.M., Thoma, L.A. (2006):** *A Tumor Vasculature Targeted Liposome Delivery System for Combretastatin A4: Design, Characterization, and In Vitro Evaluation*. AAPS PharmSciTech 7 (2) Article 32 (<http://www.aapspharmscitech.org>)
 22. **Pai, R. S. and Devi K. V. (2009):** *Lamivudine Liposomes for Transdermal Delivery – Formulation, Characterization, Stability and In vitro Evaluation*. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology Volume 1, Issue 4, 317–326.
 23. **Papagiannaros, A., Hatziantoniou, S., Dimas, K., Papaioannou, G. Th., Demetzos, C. (2005):** *A liposomal formulation of doxorubicin, composed of hexadecylphosphocholine (HePC): physicochemical characterization and cytotoxic activity against human cancer cell lines*. Biomedicine & Pharmacotherapy 60, 36–42.
 24. **Peleg-Shulman, T., Gibson, D., Cohen, R., Abra, R., Barenholz, Y. (2001):** *Characterization of sterically stabilized cisplatin liposomes by nuclear magnetic resonance*. Biochimica et Biophysica Acta, 1510, 278–291.
 25. **Sai-Lung Law and Tsuei-Fen Jang (1994):** *High-performance liquid chromatographic determination of mitoxantrone in liposome preparations using solid-phase extraction and its application in stability studies*. Journal of Chromatography A, Volume 670, Issues 1–2, Pages 234–238
 26. **Shailesh, S., Neelam, S., Sandeep, K., Gupta GD. (2009):** *Liposomes: A review*. Journal of Pharmacy Research 2(7), 1163–1167.
 27. **Singh, H. P., Tiwari H. K., Jain, S. (2010):** *Preparation and in Vitro, in Vivo Characterization of Elastic Liposomes Encapsulating Cyclodextrin-Colchicine Complexes for Topical Delivery of Colchicine*. YAKUGAKU ZASSHI 130(3), 397–407.
 28. **Vemuri, S., Rhodes, C. T. (1995):** *Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review*. Pharmaceutics Acta Helvetiae 70, 95–111.
 29. **Xu, Y., Hui, S. W., Frederik, P., Szoka Jr., F. C. (1999):** *Physicochemical Characterization and Purification of Cationic Lipoplexes*. Biophysical Journal, Volume 77, 341–353.
 30. **Yohannes, G., Pystynen, K. H., Riekkola, M. L., Wiedmer, S. K. (2006):** *Stability of phospholipid vesicles studied by asymmetrical flow field-flow fractionation and capillary electrophoresis*. Analytica Chimica Acta 560, 50–56.

PROTEOMICS AND MASS SPECTROMETRY: PROTEIN QUANTIFICATION USING STABLE ISOTOPE LABELED REAGENTS

Lovrity¹, Z., Emmer², J., Juhaszne Szalai², A., Koska², P., Fodor², B.

¹Department of Combustion Technology and Thermal Energy, Faculty of Materials Science and Engineering, University of Miskolc

²Department of Nanobiotechnology and Regenerative Medicine, Faculty of Healthcare, University of Miskolc

ABBREVIATIONS

CAD Collisionally Activated Dissociation
CID Collision Induced Dissociation
DC Direct Current
ECD Electron capture Dissociation
ESI Electrospray ionization
ETD Electron transfer Dissociation
FTICR Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance
HPLC High Performance Liquid Chromatography
ICAT Isotope Coded Affinity Tag
IT Ion Trap
iTRAQ Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification
LTQ Linear Trap Quadrupole
MALDI Matrix-Assisted Laser Ionization
MS Mass Spectrometry
PIS Pseudo Internal Standard
PMMS peptide Match Score Summation
PTMs Post-translational Modifications
Q Quadrupole
QIT Quadrupole Ion Trap
RF Radio Frequency
SILAC Stable Isotope Labeling by Amino Acid
TOF Time of Flight
XIC Extracted Ion Current

ABSTRACT

Proteomics is an emerging science to study proteins in complexes, organelles and cells to identify and quantify proteins. Mass spectrometry has great importance in proteome analysis. Mass spectrometry for proteomics cataloguizes protein expressions, defines protein interactions and identifies sites of protein modifications. MS is an indispensable and powerful tool for protein analysis. In this review we discuss the applied mass spectrometric instrumentations and new dissociation methods for proteomics. We give special attention to protein quantification and stable isotope labeling strategies.

Keywords: Proteomics; Mass spectrometric; Quantitative analysis; Stable isotope labeling

INTRODUCTION

Proteomics is a field of science for studying proteins that consider the interaction between protein and its environment. The primary aim of proteomics is the complete characterization of proteins (localization, modification, domain structure, activity etc.) In modern biotechnology the development and the production of peptides and proteins require reliable and efficient analytical methods. Rigorous quality control is an indispensable condition for the production of these substances (1).

Mass spectrometry (MS) is effective analytical method for analyzing biological samples. The advantage of MS analysis is its eligibility for qualitative and quantitative determination of biological samples. On the other hand, the evaluation of mass spectrum may be complicated, sample and chromatographic separations are needed for the differentiation of isomers.

MASS SPECTROMETRY OF BIOMOLECULES

Mass spectrometry measures the mass-to-charge ratio (m/z) of gas-phase ions. Mass spectrometers consist of an ion source, a mass analyzer and a detector. The ion source converts analyte molecules into gas-phase ions, the mass analyzer separates ions on the basis of m/z ratio and the detector records the number of ions.

Ionization techniques

The analysis of protein and peptide relies on exclusively soft ionization techniques. Intact gas-phase ions can be produced, thus their molecular weights can be determined. Biomolecules are often polar and charged; therefore the conversion of solution and solid phase ions is energetically unfavorable. Nowadays, ESI (electrospray ionization) and MALDI (matrix-assisted laser ionization) are the primary methods to ionize peptides and proteins. Both of them are connected to different sample preparation techniques.

ESI is an ionization method based on nebulization. Electrospray ionization operates at atmospheric pressure and produces tiny, charged solvent droplets. In this method, a high electric potential is set between the capillary and the inlet (2). The charged droplets shrink and the ions are desolved from the droplets by using drying gas and heat in the interface. ESI can produce negative and positive ions. Peptides and proteins are analyzed as positive ions by setting the capillary as anode. ESI is capable of quantification and can be coupled to high performance liquid chromatography (HPLC). However, ESI does not tolerate inorganic

and in minor quantities of a and x products (a_1-x_1 , a_2-x_2 , etc. pairs). ECD provides far more extensive sequence information for peptides (12).

Hunt *et al.* (14) developed an ECD-like technique, electron transfer dissociation (ETD), which is accessible in quadrupole ion trap instruments. In ETD, anions (e.g., anthracene anions) are used for delivering electrons. The electron transfer from the anions to multiply charged polypeptides results EDC-like fragmentation patterns.

PROTEIN IDENTIFICATION BY MASS ANALYSIS

Mass spectrometers generate data quickly and thus have capability for high throughput analysis. Important step of protein identification is data analysis. There is a direct relationship between amino acid sequence and mass spectrometric data. Amino acid sequence is determinable from the peptide molecular weight measurement and the peptide fragmentation.

There are two different approaches for MS based protein identification: top-down and bottom-up methods.

Most of protein analysis by mass spectrometry uses bottom-up method. According to the bottom up strategy, proteins can be separated before the enzymatic (chemical) digestion or the protein mixture can be directly digested into peptide mixtures. The unknown

peptides are identified by tandem MS fragmentation and the fragmentation pattern indicates the amino acid sequence of the peptide. The advantages of the method are that the small single charged species are eligible for determination of fragmentation and identification of the parent protein. (15) Disadvantages of this approach that some peptides are not recovered during the sample clean-up and there are small, poorly ionized peptides which cannot be seen in the mass spectrum.

Top-down strategy is a newer approach involving gas-phase ionization of intact proteins. The intact protein is fragmented to yield a series overlapping peptide fragments. In this approach, proteins in complex mixture are separated into single protein or less complex mixtures. The fractionated protein is fragmented inside the high-resolution mass spectrometer (mainly FTICR) without prior digestion. (16) This approach enables to examine the entire sequence of protein and gives more complete characterization of protein isoforms and post-translational modifications (PTMs). Top-down strategy has less dependence on chromatographic separation prior to MS analysis. Several instruments are used for top-down analysis. FTICR with ECD has a great efficiency for dissociation of proteins (17). Recently an on-line chromatographic top-down strategy was demonstrated using LTQ-FTICR. (18). The disadvantages of the top-down method are that the protein primary

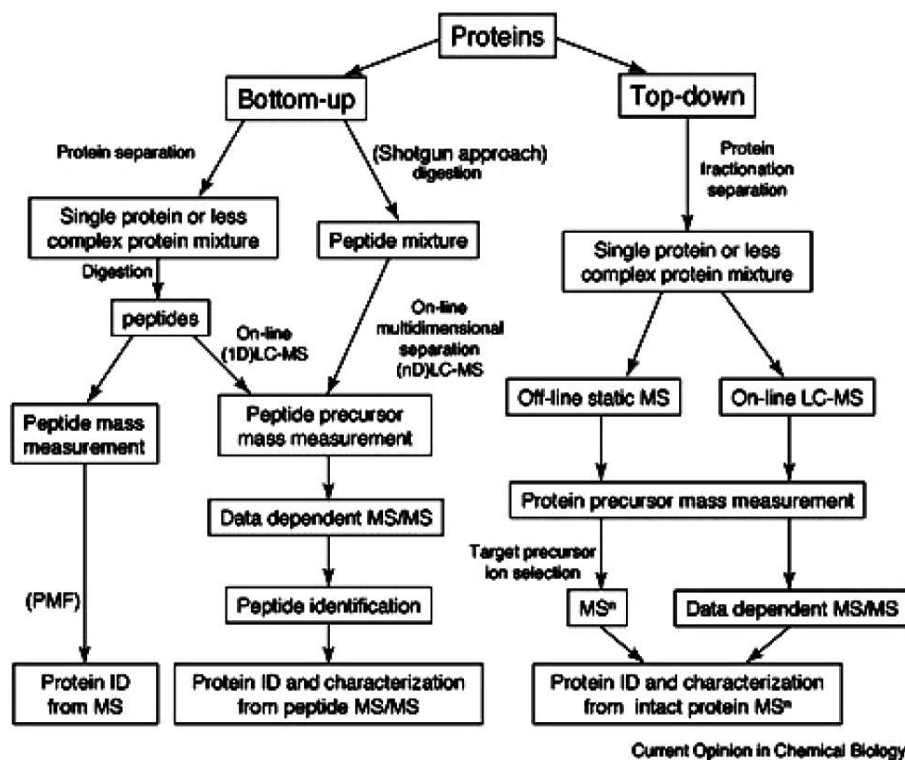


Fig. 3. Strategies for MS-based protein identification and characterization.

Adapted from (5)

sequence must be known to reassemble a fragment ion map and the method has limited sensitivity and increased sampling time because of multiple charged states of intact protein.

Tandem mass spectra are collected and the results are search from the database. Predicted fragmentation pattern are compared to the mass spectrum. There is a good fit when majority of the fragment ions match. (Fig. 4) Several algorithms have been developed to automate this process for protein identification (MASCOT (19), SEQUEST (20)).

QUANTITATIVE PROTEOMICS

Mass spectrometry can be used to measure dynamic changes protein and PTM abundances. The dynamic

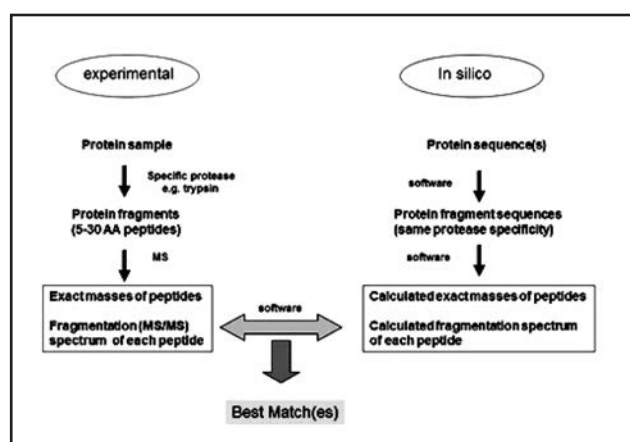


Fig. 4. Steps of protein identification method

changes in cellular proteome have an important role in biological processes. Quantifying protein levels is not easy because it does not utilize internal standards in consequence of protein recovery differences during sample preparation.

There are two alternative approaches in MS-based quantitative proteomics: label-free and stable isotope labeling quantitation. Label-free method focuses on the development of reliable comparative analysis of protein abundance in non-labeled samples. (21) This method is greatly dependent on repeatability of LC/MS/MS experiment. Peptide match score summation (PMSS) is based on the number of sequence fragments matching a potential target rather than on peak intensity (22). In LC-MS experiments, the extracted ion current (XIC) monitors the intensity in the survey scans of a particular mass over time. The area under this peak represents the quantity of the peptide in the sample. The XIC for a given peptide is linearly related to peptide amount in same elution condition. (23) The label-free quantitative analysis using pseudo internal standard (PIS) does not require additional standards or labeling reagents. (24)

According to this approach, proteins whose expression levels are constant under different conditions can be used as a pseudo internal standard.

Quantitation by stable isotopes

Presently the main method of quantitative proteomics is the use of stable isotope labeling combined with MS analysis. These methods are based on comparison of protein expression levels between two isotopically distinct samples. One of the two samples is enriched in stable isotope (carbon-13, nitrogen-15, oxygen-18 etc.). Mass spectrometric methods for quantitative analysis of proteins and peptides are based on distinguishing two samples by comparison on isotopically light (un-labeled) and heavy (labeled) forms. A relative ratio of abundance of the two species can be counted by the ratio of the intensities of the peptide peak in the given mass spectrum. Absolute quantification is more difficult. The absolute method relies on the use of the synthetic internal standard peptide (25, 26).

Most stable isotopes are not separable through analytical methods (e.g. chromatography, electrophoresis) but easily distinguished and quantified in mass spectra. Deuterium is an exception. The addition of several deuterium atoms to a peptide causes XIC peak shift in elution time due to the interaction of that peptide with reversed phased materials. (27)

Stable isotope methods for quantitative proteomics can be divided into two groups: *in vivo* and *in vitro* labeling.

In vivo labeling

In vivo labeling methods involve a metabolic incorporation of stable isotope in forms of labeled element or labeled amino acid. The protein synthesis is completed in the process of cell growth in special media, supplemented with isotopes. The first experiment was performed in yeast and bacteria in media containing ¹⁴N (light) or ¹⁵N (heavy) isotopes (28). Disadvantage of this approach is the number of labeled nitrogen atoms varying from peptide to peptide thereby generating unpredictable mass shift.

Stable isotope labeling by amino acid in cell culture (SILAC) overcomes the above mentioned problem. Mann and coworkers developed a form of incorporation of the stable isotope in amino acid metabolism (29). According to this method, cells are cultivated in media containing either normal amino acid or amino acid labeled by heavy stable isotope. The most commonly used amino acids are lysines and arginines which are labeled with ¹³C, ¹⁵N, ²H. Heavy isotopes are completely built in the newly synthesized protein in cells after numerous cells doubling cycles (at least five cell doublings). Different marked proteins are mixed, digested and analyzed with MS. Quantitative relationship can be obtained from the signal intensities of light and heavy samples.

There are some important criteria for SILAC amino acids. These amino acids should provide 4Da mass

differential to the normal isotope abundance at least. Deuterium (^2H) affects the retention characteristic of peptides in reversed-phased chromatography due to the increased polarizability of the $^2\text{H-C}$ bond versus the $^1\text{H-C}$ bond. The heavier deuterated peptide elutes from the column earlier than the heavy peptide. SILAC amino acids should be essential for survival of the cultured cells to ensure the only source of amino acid for the growing cells.

SILAC method has a wide variety of application (30, 31, 32) Advantages of SILAC method are the high labeling efficiency and the low marking error. The important restraint of SILAC is the high costs and its limitation to living cultured cells.

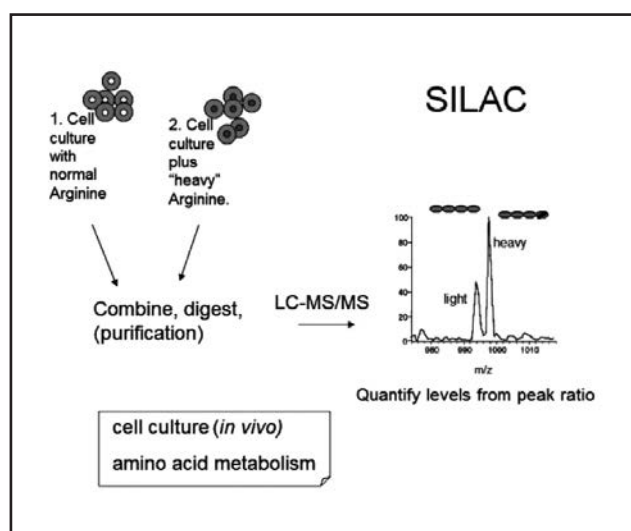


Fig. 5. SILAC labeling strategy (29)

In vitro labeling

In vitro labeling approaches are based on the introduction of isotopic tag via either chemical or enzymatic reactions. There are several methods in this group: N-terminal peptide labeling, C-terminal peptide labeling, and amino acid based labeling. According to the *in vitro* labeling, the isotope reacts with functional group with amino acid to form new chemical bonds.

Isotope coded affinity tags (ICAT)

ICAT is one of the most popular chemical derivatives. In this approach, the quantification is based on a limited number of peptides. It is popular because cysteine residues are specifically tagged with a reagent. Cysteine is a rare amino acid; its derivatization reduces the complexity of protein mixtures, whereas only peptides that contain cysteine can be analyzed.

ICAT reagents consist of three parts: an affinity tag, which is used to isolate ICAT-labeled peptide by avidin affinity chromatography; a linker incorporating stable

isotope, which can be analyzed by MS; and a reactive group, which is specific to thiol group (reacts with cysteine-containing residues of protein). There are two forms of reagents: heavy and light substances. (Fig. 6)

The first step of ICAT labeling is to make cells in different states. These proteins are harvested, denatured, reduced and labeled at cysteines with heavy and light ICAT reagents. Then the two groups of cells is mixed with a certain portion and digested with trypsin. The labeled peptides are isolated by biotin-affinity chromatography and then the peptides are submitted to HPLC/MS/MS analysis. Quantitative information can be achieved by the ratio of the ion intensities for the ICAT-label pair. The relative abundance is quantified by this ratio of intensities in different cell states.

ICAT has been used in the determination of microsomal protein levels in human myeloid leukemia cells (36), for analyzing specific protein changes in subcellular fractions such as chromatin (37) and mitochondria (38).

The original deuterium containing ICAT tags led to variable retention time in RP-HPLC for the same peptide. Therefore the second generation of ICAT reagents has been developed, which incorporates ^{12}C , ^{13}C isotopes. The third generation of ICAT reagents (cICAT) contains an acid cleavable group between the biotin and a labeled linker. These tags reduce the amount of fragment ions thus sequencing analysis can be simplified (39). cICAT reagents are useful for the study of salinity stress on yeast cell proteins (40)

The ICAT strategy has several advantages. The method is compatible with any amount of protein harvested from body fluid, cell and tissue. The alkylation reaction is highly specific and non-sensitive the presence of salt, detergents and stabilizers. The disadvantages of this method are that the ICAT labeling is a relatively large modification, thus the database searching can be complicate, and it can be used for only cysteine containing proteins.

Enzyme-catalyzed ^{18}O isotope labeling

^{18}O -labeling method was originally used to determine the C-terminal peptide after the protein digestion (41). During the labeling process, two ^{16}O on the carboxyl group are replaced by ^{18}O of H_2^{18}O increasing the mass of the labeled peptide by 4 Da. Heller *et al.* showed that the 4 Da mass difference between the labeled and unlabeled substances is sufficient for the relative quantification of peptides/proteins using either ESI-QTOF, ESI-IT or MALDI-TOF (42).

The labeling process consists of two different chemical reactions. The first one is the amide bond cleavage; the second type is the carboxyl oxygen changes. (Fig. 8)

If enzymatic cleavage is done in 95 % H_2^{18}O water, then almost 100 % of the peptides will be labeled with ^{18}O . The efficiency of labeling depends on protocol followed, pH, type of enzyme used, peptide characteristics, labeling time (44). The labeling reaction is usually independent from the amino acid sequence of the peptides so the PTM can be detected by this method.

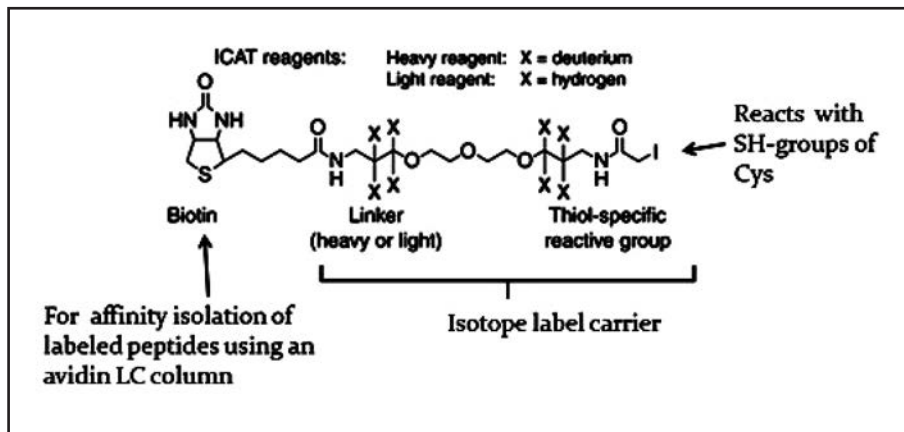


Fig. 6. Structure of the ICAT reagent (33)

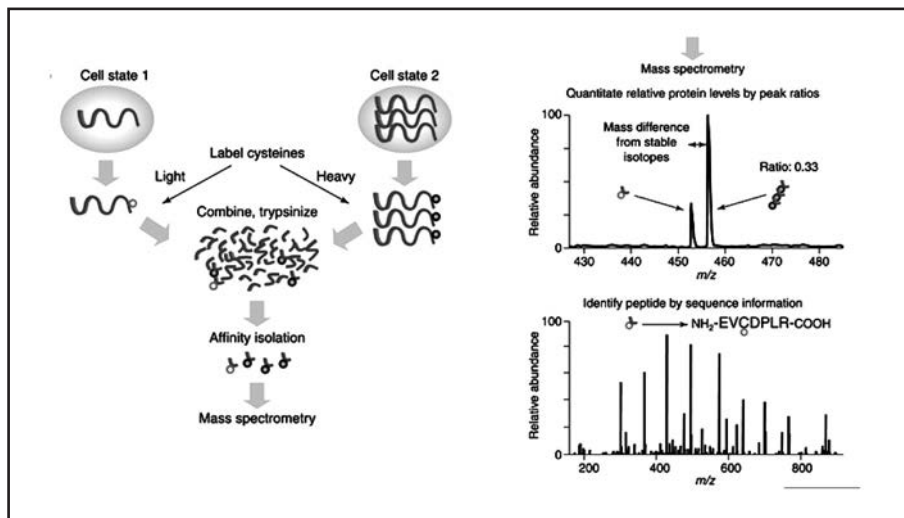


Fig. 7. ICATs labeling strategy (34, 35)

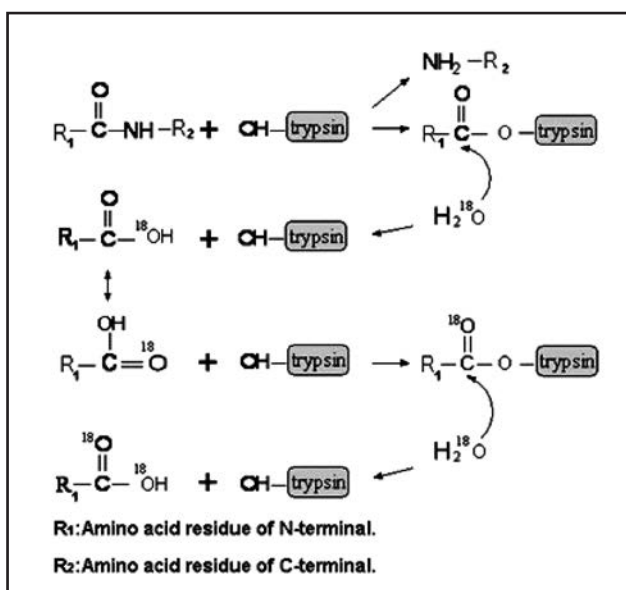


Fig. 8. ¹⁸O-labeling reactions (43)

There are two different ways of labeling. In the direct labeling process the digestion and the labeling reaction are in the same reaction system. The advantages of this procedure are the simplicity, the speed and the possibility of the on-line coupling. The disadvantage of this process is the incomplete labeling. According to the decoupling procedure, the digestion and the labeling systems are separated. The advantage of this method is the higher degree of labeling efficiency. Nevertheless, this procedure takes longer than the direct method.

Enzymatic labeling with H_2^{18}O water is easy to carry out, all peptides are labeled. There are no need extra reagents and synthetic steps. Recently, a fast and reproducible method was developed for enzymatic proteolysis using ^{18}O labeling process (43).

Isobaric tags for relative and absolute quantification (iTRAQ)

iTRAQ is a technology to label the N-terminal and the lysine residues of amino acids after digestion. Prob-

ably, this approach is the most successful and widely used technique. (46) iTRAQ reagent consists of three parts (figure.): a reporter group; a balanced group and a peptide reactive group. The reactive group specifically reacts with the N-terminus and the side chain amine groups of peptides. The reporter group is a tag with at least 4 different masses. Different masses are based on various combinations of isotopic elements. Different reporting groups match with the corresponding balance group to ensure same total weight. The reporter group is quantitatively cleaved during MS/MS analysis; the four reporter groups appear in MS spectrum as distinct ions. The relative concentrations of the four peptides can be calculated from the corresponding peak intensities of the reporter ions.

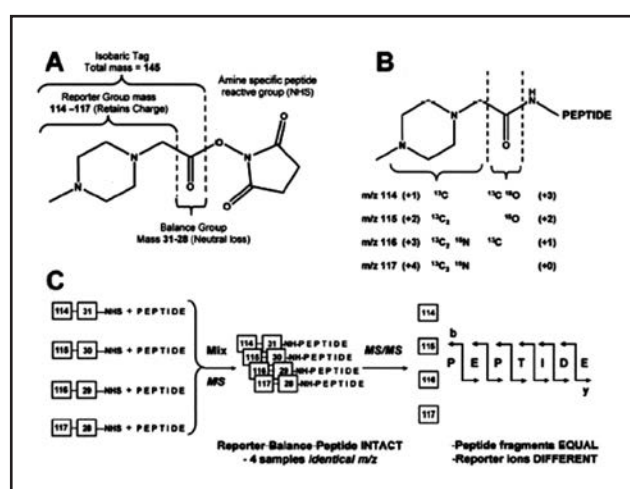


Fig. 9. (A) Structure of iTRAQ reagent; (B) reporter and balanced group; (C) iTRAQ labeling strategy (46)

iTRAQ can be coupled with chromatographic and electrophoretic systems before MS analysis to reduce the number of isobaric tagged peptides in the first MS. This method requires tandem MS. However, any untagged isobaric substances may confuse with the MS/MS sequencing of the labeled peptides.

Generally, iTRAQ quantification is coupled to TOF MS. Pierce *et al.* used iTRAQ labeling combined with Q-TOF for the analysis of leukemogenic tyrosine kinases (47), Anderson *et al.* applied Q-Trap instrument for plasma protein analysis (48). Shirran *et al.* performed a comparison of nanoLC ESI MS/MS and nanoLC MALDI MS/MS analysis. Enyenihi *et al.* used alternative activation techniques for the analysis of Glu¹ fibronopeptides (49). iTRAQ labeling has several applications, these reagents can label almost all the peptides. Recently, Armenta *et al.* developed a fast protocol for biomarker fingerprinting in cancerous cells using iTRAQ reagents (50).

CONCLUSION

MS instrumentation is rapidly improving in speed, data reduction and specific capabilities. Thanks to the innovation in the instrumentation and the fragmentation methods, MS has become an indispensable proteomics tool to study protein-protein interaction and protein complexes, experiments. The incorporation of MS into modern day biology assists to understand complex biological processes such as embryonic stem cell biology (51) and disease (52). Nevertheless, the complete qualitative and quantitative characterization of the proteome is a challenging task. Thus the improvements of MS technology and methodology will be essential.

The existing quantitative methods for proteomics have strengths and limitations. At present, the main method of quantitative proteomics is the use of isotope labeling combined with MS.

ACKNOWLEDGEMENT

This research was carried out as part of the TAMOP-4.2.1.B-10/2/KONV-2010-0001 project with support by the European Union, co-financed by the European Social Fund.

REFERENCES

1. Fuchs, F., (2002): *Quality control of biotechnology-derived vaccines: technical and regulatory considerations.* Biochimie, 84: 1173–1179.
2. Fenn, J.B., Mann, M., Mang, C.K., Wong, S.F., Whitehouse, C.M., (1989): *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules.*
3. Karas, M., Hillenkamp, F., (1988): *Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10 000 daltons.* Anal. Chem., 60: 2299–2301.
4. Lin, D., Tabb, D.L.Y., Yates, III. J.R., (2002): *Large-scale protein identification using mass spectrometry.* Biochimica et Biophysica Acta, 1646: 1–10.
5. Han, X., Aslanian, A., Yates, III. J.R., (2008): *Mass spectrometry for proteomics.* Current Opinion of Chemical Biology, 12: 483–490.
6. Aebersold, R., Mann, M., (2003): *Mass spectrometry-based proteomics.* Nature, 422: 198–207.
7. Gauthier, J.W., Trautman, T.R., Jacobson, D.B., (1991): *Sustained off-resonance irradiation for collision-activated dissociation Fourier transform mass spectrometry. Collision-activated dissociation technique that emulates infrared multiphoton dissociation.* Analytica Chimica Acta, 246: 211–225.
8. Williams, E.R., Furlong, J.J.P., McLafferty, F.W., (1990): *Efficiency of collisionally activated dissociation and 193 nm photodissociation of peptide ion in Fourier transform mass spectrometry.* J. Am. Soc. Mass Spectrom., 1: 288–294.

9. Schnier, P. D., Price, W. D., Strittmatter, E. F., Williams, E. R., (1997): Dissociations energetics and mechanisms of leucine enkephalin ($M+H^+$) and ($2M+X^+$) ions ($X = H, Li, Na, K$ and Rb) measured by blockbody infrared radiative dissociation. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 8: 771–780.
10. Williams, E. R., Henry, J. K. D., McLafferty, F. W., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., (1990): Surface-induced dissociation of peptide ion *in situ* Fourier-transform mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 1: 413–416.
11. Zubarev, R. A., Kelleher, N. L., McLafferty, F. W., (1998): Electron capture dissociation of multiply charged protein cations: a nonergodic process. *J. Am. Chem. Soc.*, 120: 3265–3266.
12. Kruger, N. A., Zubarev, R. A., Horn, D. M., McLafferty F. W., (1998): Electron capture dissociation of multiply charged peptide cations. *International Journal of Mass Spectrometry*, 187: 787–793.
13. Bakhtiar, R., Guan, Z., (2006): Electron capture dissociation mass spectrometry in characterization of peptides and proteins. *Biotechnol. Lett.*, 28: 1047–1059.
14. Syka, J. E. P., Coon, J. J., Schroeder, M. J., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., (2004): Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 101: 1774–1779.
15. Yates, III. J. R., Eng, J. K., (1996): Use of mass spectrometry fragmentation patterns of peptides to identify amino acid sequences in databases. US5538897.
16. McLafferty, F. W., Breuker, K., Jin, M., Han, X., Infusini, G., Jiang, H., Kong, X., Begley, T. P., (2007): Top-down MS, a powerful complement to the high capabilities of proteolysis proteomics. *FEBS J.*, 274: 6256–6268.
17. Zubarev, R., (2006): Protein primary structure using orthogonal fragmentation techniques in Fourier transform mass spectrometry. *Expert Rev. Proteom.*, 3: 251–261.
18. Parks, B. A., Jiang, L., Thomas, P. M., Wenger, C. D., Roth, M. J., Boyne, M. T., Burke, P. V., Kwast, K. E., Kelleher, N. L., (2007): Top-down proteomics on a chromatographic time scale using linear ion trap Fourier transform hybrid mass spectrometers. *Anal. Chem.*, 79: 7984–7991.
19. Perkins, D. N., Pappin, D. J. C., Creasy, D. M., Cottrell, J. S., (1999): Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, 20: 3551–3567.
20. Eng, J. K., McCormack, A. L., Yates, III. J. R., (1994): An approach to correlate tandem mass spectral data of peptide with amino acid sequences in a protein database. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 5: 976–
21. Haqqani, A. S., Kelly, J. F., Stanimirovics, D. B., (2008): Quantitative protein profiling by mass spectrometry using label-free proteomics. *Methods Mol. Biol.*, 439: 241–256
22. Allet, N., Barrillat, N., Baussant, T., Boiteau, C., Botti, P., Bougueleret, L. *et al.*, (2004): *In vitro* and *in silico* processes differentially expressed proteins. *Proteomics*, 4: 2333–2351.
23. Andersen, J. S., Wilkinson, C. J., Mayor, T., Mortensen, P., Nigg, E. A., Mann, M., (2003): Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature*, 246: 570–574.
24. Tabata, T., Sato, T., Kuromitsu, J., Oda J., (2007): Pseudo internal standard approach for label-free quantitative proteomics. *Anal. Chem.*, 79: 8440–8445.
25. Kirkpatrick, D. S., Gerber, S. A., Gygi, S. P., (2005): The absolute quantification strategy: a general procedure for the quantification of proteins and post-translational modification. *Methods*, 35: 265–273.
26. Brun, V., Masselon, C., Garin, J., Dupuis, A., (2009): Isotope dilution for absolute quantitative proteomics. *Proteomics*, 72: 740–749.
27. Ong, S. E., Foster, L. J., Mann, M., (2002): Mass spectrometric-based approaches in quantitative proteomics. *Methods*, 29: 124–130.
28. Oda, Y., Huang, K., Cross, F. R., Cowburn, D., Chait, B. T., (1999): Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 6591–6596.
29. Ong, S. E., Mann, M., (2006): A practical recipe for stable isotope labeling by amino acid in cell culture (SILAC). *Protocol*, 1(6): 2650–2660.
30. Schulze, W. X., Mann, M., (2004): A novel proteomic screen for peptide protein interaction. *J. Biol. Chem.*, 279: 10756–10764.
31. Gruhler, A., Olsen, J. V., Mohammed, S., Mortensen, P., Faergeman, N. J., Mann, M. *et al.*, (2005): Quantitative phosphoproteomics applied to the yeast pheromone signaling pathway. *Mol. Cell. Proteomics*, 4: 310–327.
32. Ishihama, Y., Sato, T., Tabata, T., Miyamoto, N., Sagané, K., Nagasu, T., *et al.*, (2005): Quantitative mouse brain proteomics using culture-derived isotope tags as internal standard. *Nat. Biotechnol.*, 23: 617–621.
33. Gygi, S. P., Rist, B. *et al.*, (1999): Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat. Biotechnol.*, 17(10): 994–9.
34. Gygi, S. P., Aebersold, R., (2000): Using mass spectrometry for quantitative proteomics. *Proteomics: A Trends Guide* 31: 36.
35. Gygi, S. P., Rist, B., Aebersold, R., (2000): Measuring gene expression by quantitative proteome analysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 11: 396–401.
36. Han, D. K. *et al.*, (2001): Quantitative profiling of differentiation-induced microsomal proteins using isotope-coded affinity tag and mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.*, 19: 946–951.
37. Shiio, Y., Eisenman, R. N., Yi, E. C., Donohoe, S., Goodlett, D. R., Aebersold, R., (2003): Quantitative proteomic analysis of chromatin-associated factors. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 14: 696–703.
38. Jin, J., Meredith, G. E., Chen, L., Zhou, Y., Xu, J., Shie, F. S., Lockhart, P., Zhang, J., (2005): Quantitative proteomic analysis of mitochondrial proteins: relevance to Lewy body formation and Parkinson's disease. *Molecular Brain Research*, 134: 119–138.
39. Zhang, H. *et al.*, (2004): Chemical probes and tandem mass spectrometry: a strategy for the quantitative analysis of proteomes and subproteomes. *Current Opinion Chem. Biol.*, 28: 66–75.

40. Li, J., Steen, H., Gygi, S. P., (2003): *Protein profiling with cleavable isotope coded affinity tag (cICAT) reagents: the yeast salinity stress response*. Mol. Cell. Proteomics, 2: 1198–1204.
41. Prolytica™ (2004): [¹⁸O] Labeling Kit: Instruction Manual, Catalog # 271010 Rev. # 054001 (Stratagene, La Jolla, CA).
42. Heller, M., Mattou, H., Menzel, C., Yao, X., (2003): *Trypsin catalyzed ¹⁶O-to-¹⁸O exchange for comparative proteomics: tandem mass spectrometry comparison using MALDI-TOF, ESI-QTOF, and ESI-IT mass spectrometers*. J. Am. Soc. Mass Spectrom., 14: 704–718.
43. Lin-Yi, Q., Wan-Tao, Y., Xin, L., Zhuang, L., Yun, C., Jian-Yong, H., Xiao-Hong, Q., (2007): *Establishment and optimization of stable isotope ¹⁸O-labeling strategy for quantitative proteomics research*. Chin. J. Anal. Chem. 35(2): 161–165.
44. Capelo, J. L., Carreira, R. J., Frenandes, L., Lodeiro, C., Santos, H. M., Simal-Gandara, J., (2009): *Latest developments in sample treatment for ¹⁸O-isotopic labeling for proteomics mass spectrometry-based approaches: A critical review*. Talanta, 80: 1476–1486.
45. Antoine, M. D., Hagan, N. A., Demirev, P. A., (2011): *Thermally enhanced enzymatic proteolysis for rapid ¹⁸O labeling in proteomics*. International Journal of Mass Spectrometry Available on-line, article in press.
46. Ross, P. L., Huang, Y. L. N., Marchese, J. N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., Khainovski, N., Pillai, S., (2004): *Multiplex protein quantitation in Saccharomyces cerevisiae using amine-reactive isobaric tagging reagents*. Mol. Cell. Proteomics, 3: 1154–1169.
47. Pierce, A., Unwin, R. D., Evans, C. A., Griffith, S., Carney, L., Zhang, L. et al., (2008): *Eight-channel iTRAQ enables comparison of the activity of six leukemogenic tyrosine kinases*. Mol. Cell. Proteomics 7: 853–63.
48. Anderson, L., Hunter, C. L., (2006): *Quantitative mass spectrometric multiple reaction monitoring assays for major plasma proteins*. Mol. Cell Proteomics, 5: 573–88.
49. Enyenihi, A. A., Griffiths, J. R., Glish, G. L., (2011): *Tandem mass spectrometric methods for the analysis of iTRAQ labeled peptides in a quadrupole ion trap*. International Journal of Mass Spectrometry Article in press, online available.
50. Armenta, J. M., Perez, M., Yang, X., Shapiro, D., Reed, D., Tuli, L., Finkielstein, C. V., Lazar, I. M., (2010): *Fast proteomic protocol for biomarker fingerprinting in cancerous cells*. Journal of Chromatography A 1217: 2862–2870.
51. Wang, J., Rao, S., Chu, J., Shen, X., Levasseur, D. N., Theunissen, T. W., Orkin, S. H. (2006): *A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells*. Nature, 444: 364–368.
52. Licker, V., Kövari, E., Hochstrasser, D. F., Burkhard, P. R., (2009): *Proteomics in human Parkinson's disease research*. Proteomics, 73: 10–29.

CHANGING PARADIGM IN THE DETERMINATION OF SERUM CREATININE AND IN THE ASSESSMENT OF GLOMERULAR FILTRATION

Bertalan Fodor, Adrienn Szalai, Éva Kiss-Tóth, Péter Koska, Miklós Papp, Emőke Kiss-Tóth, László Barkai

University of Miskolc, Faculty of Health Care

SUMMARY

A wide range of creatinine measurement method spread in the world. The national laboratories have different analytical procedures to perform all these tests. The diagnostic kits from different manufacturers using different methods cause significantly different creatinine values even in the same patient as well. Particularly in many cases is difficult the comparison of results and transferability of data between laboratories. The uncertainty of creatinine measurement is a very important practical question in the routine eGFR (MDRD calculation method mainly) reporting. The authors summarize their work in the harmonization of creatinine determination system and its impact on the calculation of eGFR.

CREATININE DETERMINATION METHODS

The investigation of kidney function is still based on the serum (and urine) creatinine determination. This parameter represents the basis of the calculation of glomerular filtration ratio (GFR), a cornerstone in the classification, staging, monitoring, etc. of renal diseases. (1) When we talk about the measurement of creatinine we thinking mainly about classic reaction described by Jaffe in 1886 (2)

This method spread throughout the world. However – for over a century, in parallel with the improvement of the technical, metrological and analytical possibilities – a significant “evolution” of the “classic Jaffe,” method occurred. It is essential to be aware, therefore, that the name “Jaffe creatinine determination” comprises a heterogeneous group of analytical techniques. The individual laboratories work in different ways so the performance of analytical methods, the reproducibility and variability of the results may differ significantly from each other. (3–6) On the other hand, the evaluation of reaction is affected by several interfering factors (hyperbilirubinemia, icterus, lipaemia, drugs, etc), which should be taken into account during the interpretation of results. (7–9). Despite these facts the great advantage of the Jaffe reaction is undoubtedly its low cost which is an important factor in the current economical situation.

Beside the classical end-point or kinetic Jaffe method variants over the last decade the worldwide spread of the enzymatic creatinine determination is possible to observe. (10). The initial analytical uncertainties were eliminated and presently the commercially available enzymatic creatinine tests provide highly reliable results. The main advantage of the enzymatic methods is the low number of interfering and limiting factors. (11, 12) To date, however, there is no clear evidence to establish that their sensitivity is much better than a well-performed Jaffe reaction. According to Hungarian data the enzymatic methods show a bit lower results compared to “Jaffe” thorough the whole range of measurements. (13)

From metrological point of view the best solution for creatinine assay is the highly specific direct determination by high-pressure liquid chromatography (HPLC) and isotope diluted mass spectrometry (ID-MS), the current “gold standard”. (14–17) Of course in routine practice, these methods (due to the high cost of measurement and instrumentation) are not employable.

LIMITING FACTORS OF CLINICAL APPLICABILITY

The clinical application of serum creatinine levels is affected and limited by several factors. Beyond the known pathophysiological problems, one should take into account that the creatinine has a not too large, but constant (approximately 5%) *in vivo* intra-individual biological variability (18) and an approximately 8%, analytical (intraassay) variability. These two factors alone can cause significant variations in the results of repeated test of the same patient. In addition the above-mentioned performance and reproducibility questions of the different analytical methods can also increase the “measurement uncertainty”. (19–21)

Good illustration of the standard deviation of results is the survey of Lawson *et al.* (22) They pointed out that the same manufacturers tests – using different methods – can provide different creatinine results, and this difference can be as high as 100 µmol/l in the individual patient (Fig. 1.) This issue is especially important, given the high number of methods used for creatinine determination in national and international laboratories. So the differences between laboratories (interlaboratory assay) make significant difficulties in clinical decision-making based on creatinine and the transferability of the results from one clinic to others. (Fig. 2, 3.)

MEASUREMENT UNCERTAINTY

The IRMM (Institute for Reference Metrology of EU) carried out a comprehensive international study in 2003. The main purpose of this study was to assess the uncertainty of creatinine measurement. 1037

Figure 1.
Standard deviation of creatinine results of different manufacturer's analyzers
Lawson et al, Ann. Clin. Biochem. (2002)

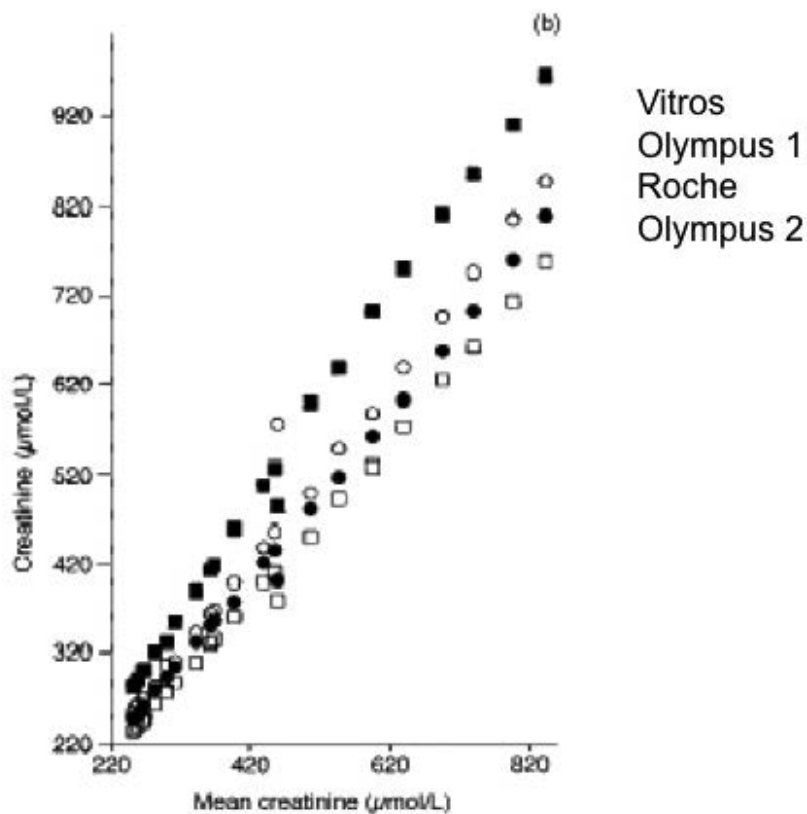


Figure 2.

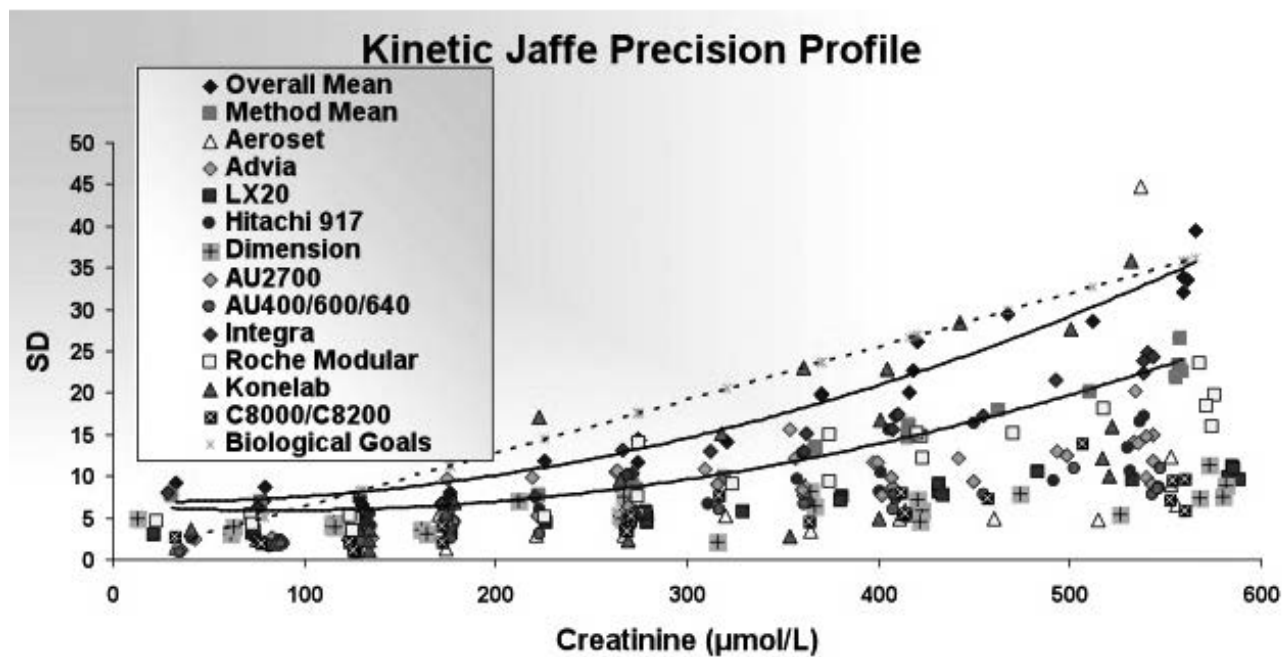


Figure 3.

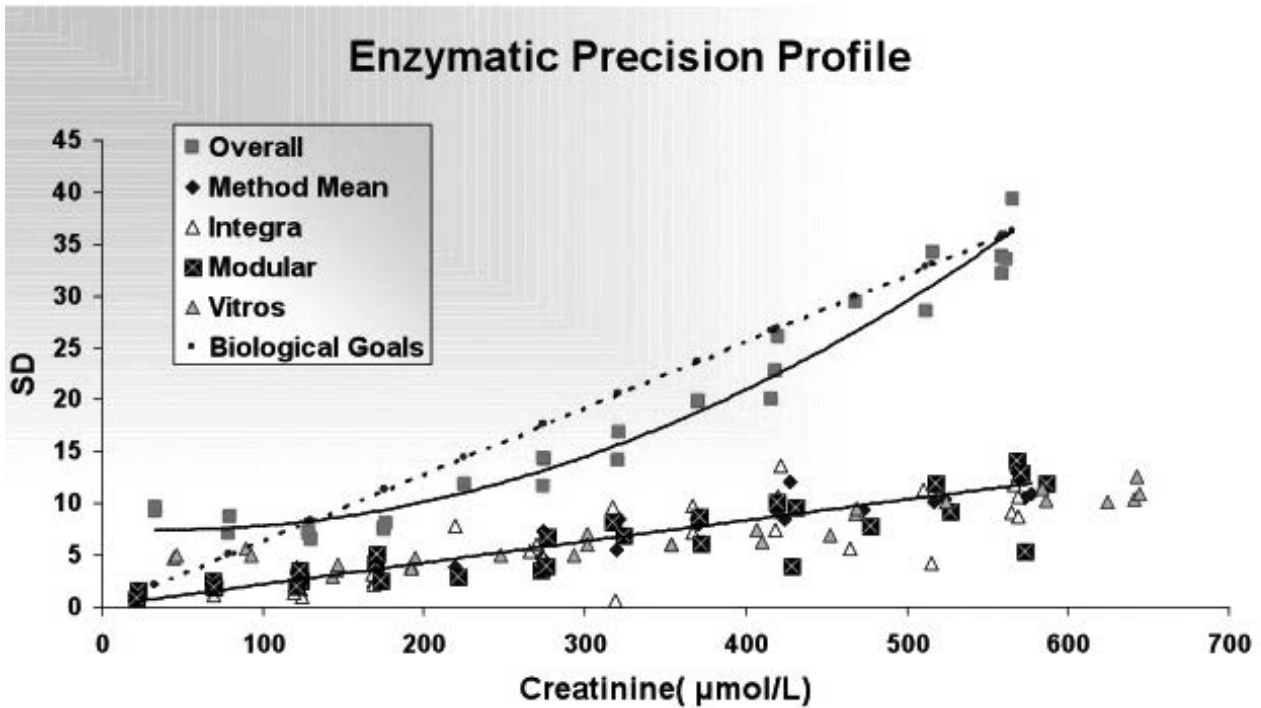


Figure 4.

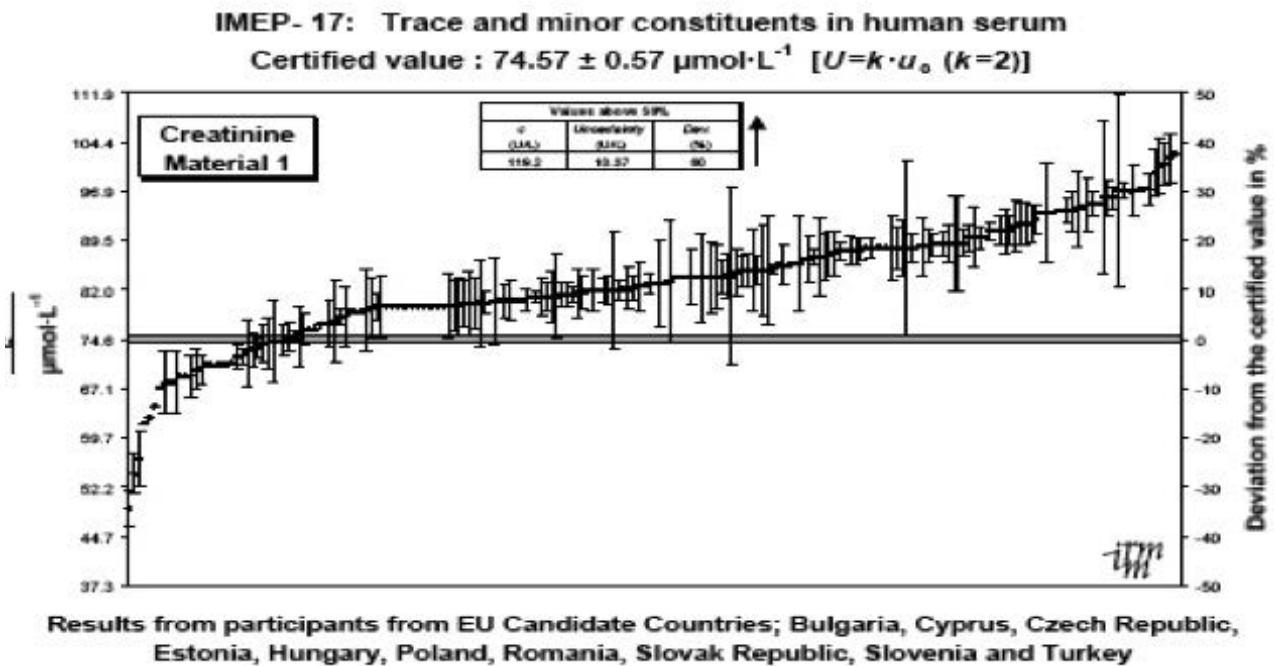
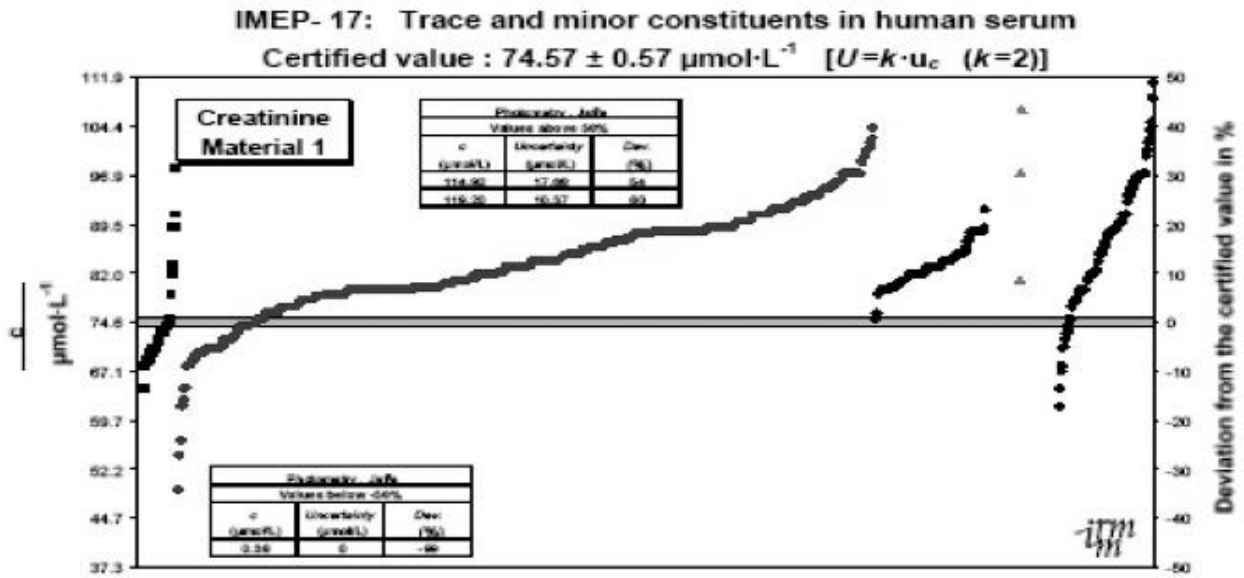


Figure 5.



All reported results (1022) arranged in method groups: Photometry, enzymatic; Photometry, Jaffe; Vitros 250-950; Vitros DT60 and Other/No info

Figure 6.

Kidney International (2005) Vol 68, 1884-87.

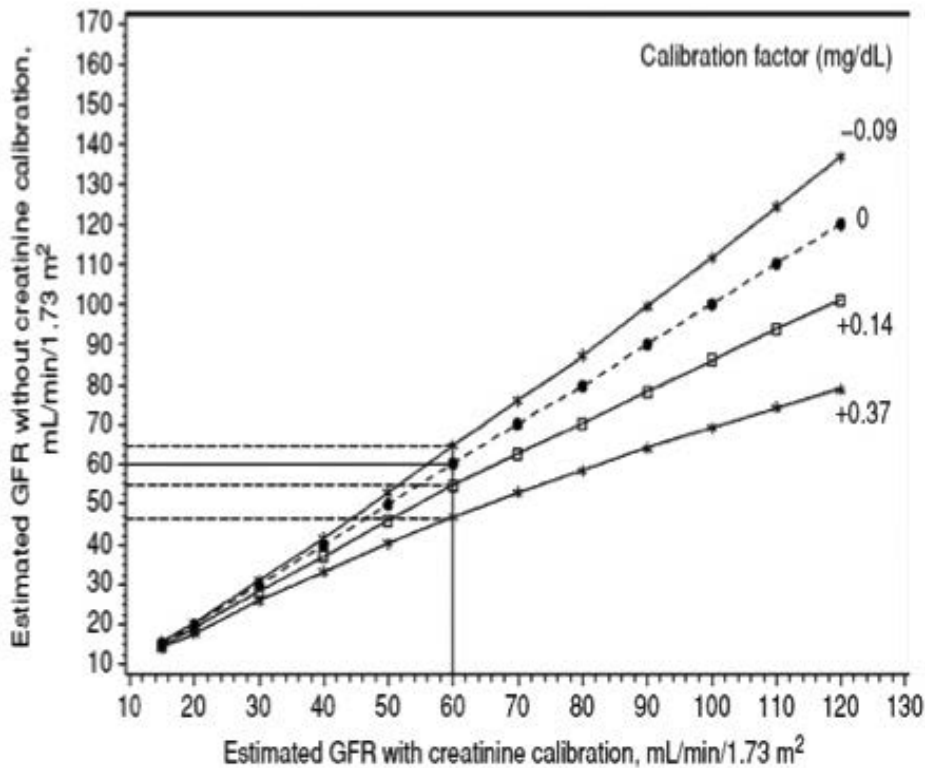
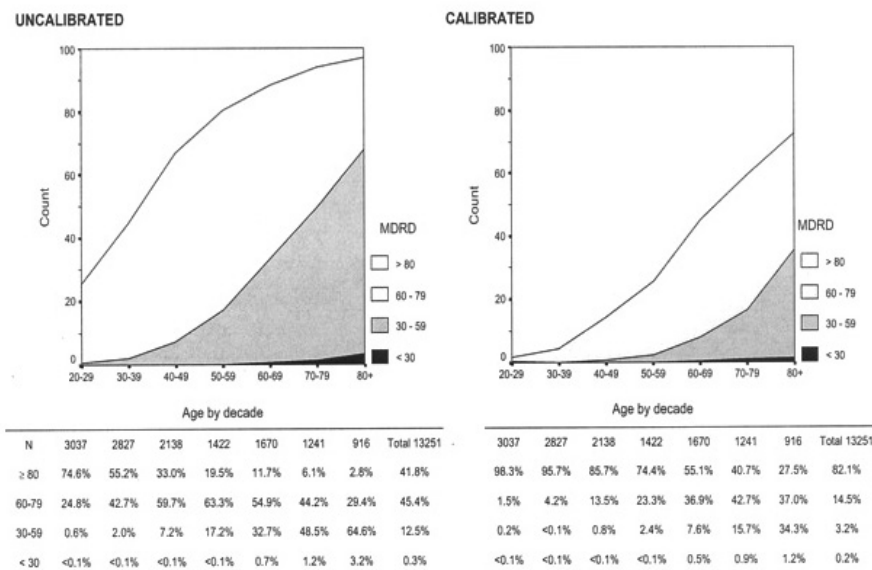


Figure 7.
Clase CM et al: NHANES III study. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2002;13:1338-1349



laboratories worldwide participated in this work. (23). 20 liters of fresh frozen serum samples were aliquoted and were sent out, and the laboratories analyzed many parameters from this sample by their routinely used methods. 1022 participants sent back creatinine results. The actual creatinine concentration of the sample was $74.57 \pm 0.57 \mu\text{mol/l}$ according to high precision HPLC-IDMS determination. (24) In the Figure 4 it can be seen that the values obtained by different laboratories showed very high deviation (from 52.2 to 104.4 $\mu\text{mol/l}$). It can also disclose that the standard deviation of the results (Fig. 5) is approximately the same in all groups of analytical methods (enzymatic, kinetic Jaffe, Jaffe endpoint, etc). This observation was confirmed also by other studies.

In the calculation of “total analytical error” (TE) (what is a key determinant of the laboratory result precision) beside the biological variability and standard deviation has great emphasis the routine (or systemic) error (BIAS) of the analytical process. The creatinine determination procedure is strongly influenced by this factor (25). According to a survey conducted by The College of American Pathologist in 2003 (26) the systemic error of creatinine assay depends less on the method of determination and more on the reagent quality from different manufacturers. (Fig. 5).

INTERNATIONAL STANDARDIZATION

These examples underline the necessity of international harmonization of creatinine measurement and

the development of a new, high precision calibrator material to be used uniformly throughout the world. This reference material should reduce uncertainties arising from the above-mentioned problems (27). Many manufacturers are already realizing it because today there are commercially available control materials with traceability value to the ID-MS method. We strongly recommend the use this type of reference materials only because these calibrators ensure proper calibration of creatinine determination (25). On the other side some laboratories yet use the non-traceable old calibrators. The difference in calibration further increases the possibility of any differences of creatinine values between laboratories. These differently calibrated creatinine values provide significantly different eGFR (estimated glomerular filtration ratio) results (Fig. 6). The ultimate solution of this question is the spread of uniform, HPLC/ID-MS traceable reference materials.

Due to the different creatinine laboratory results in same patients, the automatic calculation of eGFR – particularly until the uniform standardization – is not appropriate without knowledge of laboratory methods. (28, 36)

The calculation of eGFR according to the 4-variable MDRD formula is basically depends on the determination method of serum creatinine. In case of classical endpoint Jaffe reaction with non traceable calibration (29, 30):

$$\text{GFR (mL/min/1.73 m}^2\text{)} = 186 \times (S_{\text{cr}})^{-1.154} \times (\text{Age})^{-0.203} \times (0.742 \text{ if female}) \times (1.212 \text{ if African American})$$

BUT

in case of rate-blank compensated Jaffe or enzymatic test with ID-MS traceable calibration:

$$\text{GFR (mL/min/1.73 m}^2\text{)} = 175 \times (\text{S}_{\text{cr}})^{-1.154} \times (\text{Age})^{-0.203} \times (0.742 \text{ if female}) \times (1.212 \text{ if African American})$$

The ignoring of the importance of calibration is well demonstrated in the survey of Clase *et al.*, which is based on the classic Jaffe method using non-traceable calibrator. The kidney status of the North American population seemed much worse than previously thought, according to the calculated MDRD data from this creatinine results (31). The proportion of patients suffering from 3rd stage end-stage renal disease was approximately 12,5%. However, after the repeating of the measurements with right method and ID-MS traceable calibrators, this rate was only 3,2%. (Fig. 12) (32, 33)

The close consultation is recommended between clinicians and laboratory for the interpretation of eGFR until the correct standardized creatinine measurements are not available and there is no harmonization between the laboratory methods. (34, 35, 37)

ACKNOWLEDGEMENT

This research was carried out as part of the TAMOP-4.2.1.B-10/2/KONV-2010-0001 project with support by the European Union, co-financed by the European Social Fund.

CITATIONS

1. Woodhouse, S., Battan, W. H., Hendrick, Malek, P. S.: *The glomerular filtration rate: an important test for diagnosis, staging, and treatment of chronic kidney disease.* Lab. Med., 2006; 37: 244–247.
2. Jaffe, M.: *Über den Niederschlag, welchen Pikrinsäure in normalen Harn erzeugt, und über eine neue Reaction des Kreatinins.* Zeit. Physiol. Chem., 1886.
3. Spencer K.: *Analytical reviews in clinical biochemistry: the estimation of creatinine.* Ann. Clin. Biochem., 1986; 23: 1–25.
4. Moss, G. A., Bondar, R. J., Buzzelli, D. M.: *Kinetic enzymatic method for determining serum creatinine.* Ann. Clin. Biochem., 1975; 21: 1422–1426.
5. Tanganelli, E., Prencipe, L., Bassi, D. *et al.*: *Enzymatic assay of creatinine in serum and urine with creatinineiminohydrolase and glutamate dehydrogenase.* Clin. Chem. 1982; 28: 1461–1464.
6. Perrone, R. D., Madias, E., Levey, A. S.: *Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts.* Clin. Chem., 1992; 38: 1933–1953.
7. Kenny, D.: *Study of interferences in routine methods for creatinine measurement.* Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1993; 53: 43–47.
8. Blijenberg, B. G., Liesting, E. C., Zwang, L.: *Creatinine*

and automatic analysers in relation to icteric specimen. Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 1992; 30: 779–784.

9. Lo, S. G., Tsai, K. S.: *Glucose interference in Jaffe creatinine method: Effect of calcium from peritoneal dialysate.* Clin. Chem., 1994; 40: 2326–2327.
10. Linback, B., Bergman, A.: *A new commercial method for the enzymatic determination of creatinine in serum and urine evaluated: comparison with a kinetic Jaffe method and isotope dilution-mass spectrometry.* Clin. Chem., 1989; 35: 835–837.
11. Weber, J. A., vaZanten, A. P.: *Interferences in current methods for measurement of creatinine.* Clin. Chem., 1991; 37: 696–700.
12. Schoenmakers, C. H., Kuller, T., Lindemans, J. *et al.*: *Automated enzymatic methods for creatinine measurement with special attention to bilirubin interference.* Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 1993; 31: 861–868.
13. QualiContFórum 2005, Budapest (personal communication)
14. Welch, M. J., Cohen, A., Hertz, H. S. *et al.*: *Determination of serum creatinine by isotope dilution mass spectrometry as a candidate definitive method.* Ann. Chem. 1986; 58: 1681–1685.
15. Stockl, D., Reinauer, H.: *Candidate reference methods for the determination of target values for cholesterol, creatinine, uric acid and glucose in external quality assessment and internal accuracy control. I. Method setup.* Clin. Chem., 1993; 39: 993–1000.
16. Siekmann, L.: *Measurement of creatinine in human serum by isotope dilution mass spectrometry.* J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 1985; 23: 137–144.
17. Stokes, P., O'Connor, G.: *Development of a liquid chromatography-mass spectrometry method for the high-accuracy determination of creatinine in serum.* J. Chromatogr. B., 2003; 794: 125–136.
18. Fraser, C. G., Stevenson, H. P.: *Production and use of data on biological variation in laboratory medicine.* CPD Bulletin: Clinical Biochemistry. 1998; 1: 5–8.
19. Fraser, C. G., Petersen, P. H., Lieber, J. C. *et al.*: *Proposals for setting generally applicable quality goals solely based on biology.* Ann. Clin. Biochem. 1997; 34: 8–12.
20. Miller, W. G.: *Specimen materials, target values and commutability for external quality assessment (proficiency testing) schemes.* Clin. Chim. Acta, 2003; 327: 25–37.
21. Miller, W. G., Myers, G. L., Ashwood, E. R. *et al.*: *Creatinine measurement: state of the art in accuracy and inter-laboratory harmonization.* Arch. Pathol. Lab. Med., 2005; 129: 297–304.
22. Lawson, N., Lang, T., Broughton, A. *et al.*: *Creatinine assays: time for action?* Ann. Clin. Biochem., 2002; 39: 599–602.
23. European Commission-Joint Research Centre. Institute for Reference Materials and Measurement (IRMM). Retieseweg, B-2440. Geel, Belgium: IRMM, 2003.
24. Örnemark, U., Uldall, A., van Nevel, L. *et al.*: *IMEP-17. Trace and minor constituents in human serum.* Certification Report. European Commission-Joint Research Centre. Institute for Reference Materials and Measurement

- (IRMM). Retieseweg, B-2440. Geel, Belgium: IRMM, 2003.
25. **Mayers, G.L., Miller, W.G., Coresh, J. et al.:** *Recommendations for improving serum creatinine measurement: a report from the laboratory working group of the National Kidney Disease Education Program.* Clin. Chem. 2006; 52: 5–18.
26. **Klee, G.G., Killeen, A.A.:** *College of American Pathologist 2003 Fresh Frozen Serum Proficiency Testing Studies.* Arch. Pathol. Lab. Med. 2004; 129: 292–293.
27. **International Organization for Standardization.** ISO Guide 15194. *In vitro* medical devices-measurement of quantities in biological samples-metrological traceability of values assigned to calibrators and control materials. Geneva, Switzerland: ISO, 2003.
28. **Agarwai, R.:** *Estimating GFR: from serum creatinine concentration: Pitfalls of GFR estimating equations.* Am. J. Kidney. Dis. 2005; 45: 610–613.
29. **Delanaye, P., Cavalier, E., Chapelle, J.P. et al.:** *Importance of the creatinine calibration in the estimation of GFR by MDRD equation.* Nephrol. Dial. Transplant., 2006; 4: 1130.
30. **Froissart, M., Rossert, J., Jacquot, C. et al.:** *Predictive performance of the Modification of Diet in Renal Disease and Cockcroft-Gault equations for estimating renal function.* J. Am. Soc. Nephrol., 2005; 16: 763–773.
31. **Clase, C.M., Garg, A.X., Kiberd, B.A.:** *Prevalence of low glomerular filtration rate in non diabetic americans: Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III).* J. Am. Soc. Nephrol. 2002; 13: 1338–1349.
32. **Coladonato, J., Klassen, P., Owen, W.F.:** *Perception versus reality of the burden of chronic kidney disease in the United States.* J. Am. Soc. Nephrol., 2002; 13: 1686–1688.
33. **Couser, W.G.:** *Chronic kidney disease – how many have it?* J. Am. Soc. Nephrol., 2002; 13: 2810.
34. **Coresh, J., Eknoyan, G., Levey, A.S.:** *Estimating the prevalence of low glomerular filtration rate requires attention to the creatinine assay calibration.* J. Am. Soc. Nephrol., 2002; 13: 2811–2816.
35. **Coresh, A., Astor, B., McQuillan, G. et al.:** *Calibration and random variation of the serum creatinine assay as critical elements of using equations to estimate glomerular filtration rate.* Am. J. Kidney. Dis., 2002; 39: 920–922.
36. **Ráčz, O., Lepej, J., Lepejová, K., Mocnejová, I., Fedorová, R.:** *Je stanovenie glomerulárnej filtrácie naozaj také jednoduché?* Labor aktuell, 2010; 4, 8–14.
37. **Lepej, J., Lepejová, K., Mocnejová, I., Fedorová, E., Ráčz, O., Popík, V.:** *Od kreatinínu k cystatínu C brána otvorená.* Labor aktuell, 2010; 4, 15–19.

PROJEKT ORGANIZÁCIE INTEGROVANÉHO PRENATÁLNEHO SKRÍNINGU - NAŠE PRVÉ VÝSLEDKY A SKÚSENOSTI

Cisarík, F.¹, Vavřík, J.², Babjak, P.³,
Podlucká, M.², Sadíku, H.¹, Kováčová, E.¹,
Masná, V.¹, Staňová, I.¹, Furmánková, S.²

¹Oddelenie lekárskej genetiky FNŠP Žilina,

²KLINICKÁ BIOCHÉMIA s.r.o. Žilina,

³Gynekologicko-pôrodnické oddelenie FNŠP Žilina

SÚHRN

Autori porovnávajú dve rovnako dlhé obdobia prenatálneho skríningu. V prvom období bola prevaha vyšetrení v skríningu II. trimestra, v druhom období sledovali dôsledky zavedenia integrovaného prenatálneho skríningu. V druhom období konštatujú pokles počtu indikovaných odberov plodovej vody približne o 50%. Je to dôsledok poklesu pozitívnych výsledkov skríningu. Výpočty rizík sa vykonávali pomocou programu ALPHA a autori analyzujú štatistiky poskytované programom. Na podklade vlastného súboru zisťujú podstatné zvýšenie efektivity výberu geneticky rizikových tehotenstiev. Vyšetrenie markerov AFP a hCG v sére matky v II. trimestri umožňuje záchytnosť Downovho syndrómu (DS) okolo 70%, na odber plodovej vody indikuje 7,1% tehotných s rizikom DS nad 1:250 a pravdepodobnosť zistenia DS je iba 1:61. Stratégia kompletného integrovaného skríningu (markery PAPP-A + AFP + hCG + uE3 + NT) pri rovnakom *cut-off* pre pozitivitu 1:250 má záchytnosť 87,4%, indikuje 2,5% tehotných na invazívny odber plodovej vody a pravdepodobnosť zistenia chromozómovej chyby DS je 1:17. Správnosť výpočtu rizika závisí od kvality biochemických analýz, skúseností sonografistu a dokonalého ovládania práce s programom ALPHA. Je potrebná aj dlhodobá klinická skúsenosť s prácou v prenatálnom skríningu a aktívna tímová spolupráca.

Kľúčové slová: prenatálny skrínig, integrovaný prenatálny skrínig, prenatálna cytogenetická diagnostika, nuchálna translucencia, program ALPHA

SUMMARY

Two prenatal screening periods of the same duration were compared. In the first period prevailed the screening of the second trimester. With the introduction of the integrated prenatal screening in the second period, the indications to invasive examinations of amniotic fluids were about 50% lower. The decrease of invasive examinations was caused by the lower number of

positive results of the screening in the second period. Calculations of risks were performed by ALPHA software and authors analysed the statistics produced by this software. The efficiency of the integrated prenatal screening strategy was substantially higher than the screening strategy of the second trimester. Doubletest with AFP and hCG examinations in the second trimester has DS detection rate of 70%, false positive rate of 7,1% with positivity *cut-off* set to 1:250. The probability of DS diagnosis at amniotic fluid examination is 1:61. The complete integrated prenatal screening (PAPP-A + AFP + hCG + uE3 + NT) with the positivity *cut-off* set to 1:250 has detection rate of 87,4%, false positive rate of 2,5% and the probability of DS diagnosis at amniotic fluid examination is 1:17. The correct calculation of the individual risk of DS in pregnancy depends on the quality of biochemical analysis, sonographer's skill and the quality of the software operation. The prenatal screening effectivity also depends on long time experience of all prenatal diagnostics team members.

Key words: prenatal screening, integrated prenatal screening, prenatal cytogenetic diagnostics, nuchal translucency, ALPHA software

ÚVOD

Prenatálny skrínig vývojových chýb plodu, od prvých skúseností s vyšetrením alfa-1-fetoproteínu (AFP) v krvi matky na odhalenie vysokého rizika rúžštepú nervovej trubice v období rokov 1970–1980, prekonal obrovský rozvoj (1, 12).

V súčasnosti používané skrínigové stratégie štandardne vyhľadávajú gravidity s vysokým rizikom chromozómových anomálií – trizómie 21 (Downov syndróm, DS) a trizómie 18 (Edwardsov syndróm). Spomedzi skrínigových stratégií je tzv. integrovaný skrínig považovaný za najefektívnejší a najbezpečnejší (9, 10). Integrovaný skrínig používa na výpočet rizika chromozómových anomálií vyšetrenia biochemických markerov v I. a II. trimestri gravidity, ako aj vyšetrenie ultrasonografických (UZV) markerov z I. trimestra gravidity. Integrovaný skrínig však prináša aj ďalšie informácie o priebehu gravidity a získané hodnoty vyšetrení môžu upozorňovať na riziká v priebehu gravidity a pôrodu (7, 8, 13). Zložitosť a význam prenatálneho skrínigu vedie ku vytváraniu organizačných a diagnostických centier s vyššou kvalitou napojenia na pôrodnictvo (5, 6, 11). Podrobné štatistiky z pracovísk lekárskej genetiky na Slovensku odrážajú vývoj prenatálnej genetickej diagnostiky a spektrum indikácií na tieto vyšetrenia (2).

MATERIÁL A METODIKA

Gynekologicko-pôrodnické oddelenie a Oddelenie lekárskej genetiky FNŠP v Žiline spolu s laboratóriom KLI-

NICKÁ BIOCHÉMIA s.r.o. realizujú projekt „Zvýšenie bezpečnosti prenatálnej genetickej diagnostiky a zvýšenie záchytnosti vývojových chýb“, ktorý je spolufinancovaný z Finančného mechanizmu EHP, Nórskeho finančného mechanizmu a zo štátneho rozpočtu SR.

Cieľom projektu je zavedenie tzv. **integrovaného prenatálneho skríningu** do štandardnej zdravotnej starostlivosti v regióne Žiliny u tých tehotných, ktorým sa biochemické skrínigové markery vyšetrujú v laboratóriu KLINICKÁ BIOCHÉMIA s.r.o. v Žiline. Prechod na systém integrovaného skríningu si vyžiadala vypracovanie nových žiadaniek o vyšetrenie v prvom ako aj v druhom trimestri s informáciou o preanalytickej fáze vyšetrení (14, 15).

Sú potrebné 2 odbery krvi. Prvý odber na vyšetrenie PAPP-A (pregnancy associated plasma protein A) sa vykonáva v období 10+0 až 11+3 týždňa gravidity a druhý odber na AFP, hCG (human chorion gonadotropine) a uE3 (unconjugated estriol 3) sa robí v období 14+0 až 15+6 týždňa gravidity. Medzitým sa v čase 11+3 až 13+6, najlepšie okolo 12+0 týždňa gravidity odmeria hodnota NT (nuchal translucency).

PAPP-A sme vyšetřovali súpravou PAPP-A B.R.A.H. M.S Kryptor (výrobca B.R.A.H.M.S., Nemecko) na analyzátore Kryptor Compact (výrobca B.R.A.H.M.S., Nemecko). AFP sme vyšetřovali súpravou AFP IRMA, hCG súpravou hCG-screening RIA a uE3 súpravou Unconjugated estriol RIA (výrobca IMMUNOTECH a.s., Česká republika) na analyzátore SR 300 STRATEC (výrobca STRATEC BIOMEDICAL SYSTEMS AG, Nemecko).

Na kontrolu kvality sme okrem kontrolného materiálu v súpravách používali kontrolné sérum BIO-RAD Maternal serum 220 Trilevel a sme zapojení v externom systéme hodnotenia kvality SEKK, Pardubice, Česká republika.

Výpočet rizika Downovho syndrómu sme vykonávali pomocou programu ALPHA (Logical Medical Systems Ltd, United Kingdom) verzia W7 ad.

Na výpočet rizika sa okrem nameraných hodnôt markerov používajú aj viaceré údaje zo strany matky, ktoré významne modifikujú výsledok (vek a hmotnosť matky, počet plodov, gravidita po IVFET-*in vitro* fertilisation embryo transfer, diabetes mellitus, atď.). Štatistický modul programu ALPHA je zdrojom informácií, ktoré sme vyhodnotili a prezentujeme vo výsledkoch. Zaujímá nás najmä odpoveď na otázku, či integrovaný skrínig v našich podmienkach zvyšuje záchytnosť DS a či jeho používaním dochádza ku zníženiu počtu invazívnych odberov vzoriek plodovej vody na prenatálne vyšetrenie chromozómov plodu. Odpoveď sme hľadali v štatistikách z Oddelenia lekárskej genetiky FNŠP Žilina o indikáciách vyšetrenia plodovej vody a o výsledkoch vyšetrení. Z týchto údajov sa dozvedáme aj o indikáciách a výsledkoch rýchlej a špeciálnej diagnostiky chromozómových chýb metódou FISH. K vyšetreniu FISH (fluorescenčná *in situ* hybridizácia) používame mikroskop Olympus BX51 (Japonsko), automatickú obrazovú analýzu systému LUCIA (FISH a KARYO

EG1MLM030, Lucia, Česká republika) a diagnostické sondy od firmy VYSIS/ABBOTT (Nemecko).

Zásadným prínosom pre skvalitnenie prenatálneho skrínigu a ultrazvukovej diagnostiky vývojových chýb je ponuka plošnej dostupnosti vyšetrenia nuchálnej translucencie kvalifikovaným sonografistom, ktorý získal a pravidelne si audituje certifikát z organizácie FMF (The Fetal Medicine Foundation).

Meranie NT sme vykonávali na sonografickom prístroji Voluson 730 Expert (GE Medical Systems, Kretztechnik GmbH&Co OHG, Austria). Program ALPHA umožňuje získať štatistický pohľad na kvalitu práce lekárov, ktorí NT vyšetřujú.

VÝSLEDKY

Tabuľka 1. Prenatálny skrínig - podiel integrovaného prenatálneho skrínigu v období 1.11.2009-15.08.2010

| Skrínigová stratégia | Počet | % |
|--|-------|------|
| AFP+hCG+uE3 (II. trimester) | 1035 | 52,3 |
| PAPP-A+AFP+hCG+uE3 (Integrovaný biochemický) | 204 | 10,3 |
| PAPP-A+AFP+hCG+uE3+NT (Integrovaný štandardný) | 730 | 36,9 |
| Iné kombinácie | 9 | 0,45 |
| Spolu | 1978 | |

AFP: Alfa-1-fetoproteín, hCG: celkový ľudský choriogonadotropín, uE3: nekonjugovaný estriol, PAPP-A: plazmatický tehotenský proteín A, NT: nuchálna translucencia

V období pred začatím realizácie projektu sme v našom regióne integrovaný prenatálny skrínig systematicky nevykonávali. V období od jeho začiatku dňa 1.11.2009 do 15.08.2010 stúpol podiel integrovaného skrínigu na 46,9% zo všetkých vykonaných skrínigov tehotných žien, pričom u 36,9% aj za použitia vyšetrenia NT. V tomto období sme začali rutínne vyšetřovať v II. + trimestri aj biochemický marker uE3. Na analyzátore Kryptor Compact B.R.A.H.M.S. sme zabezpečili stanovenie PAPP-A pre obdobie I. trimestra, čo umožnilo zaviesť skrínigovú stratégiu integrovaného biochemického skrínigu. Dostupnosť štandardného integrovaného skrínigu sme získali ponukou vyšetrenia NT u všetkých tehotných žien. Vyšetrenie NT je odborne veľmi náročné a aj nám sa potvrdzuje správnosť požiadavky, že ho má vykonávať sonografista, ktorý získa príslušný medzinárodný certifikát od FMF a pravidelne si zabezpečuje audit svojich vyšetrení. V súčasnosti disponujú certifikátom FMF na vyšetrenie NT v našom regióne dvaja sonografisti, pričom jeden získal navyše aj certifikát FMF na ultrazvukové vyšetrenie v 20.-22. týždni gravidity.

Tabuľka 2. Dve základné prenatalné skriningové stratégie: prenatalný skrining v II. trimestri a prenatalný integrovaný skrining - porovnanie výskytu pozitívnych skriningov v našom súbore

| | % | % | % | % | % | % | % | % |
|-----------------------------|-----|--------|-----|-------|--------|-------|------|--------|
| Prenatálny skrining | DS | DS+NTD | NTD | Tri18 | An. DS | Predč | Nesk | Multig |
| II. trimester | 9,7 | 0,1 | 1,5 | 2,61 | 0,1 | 1,1 | 0,1 | 0,1 |
| Integrovaný (štand./bioch.) | 4,8 | 0,1 | 0,3 | 1,18 | | | | |
| Všetky typy skriningov | 7,3 | 0,1 | 1 | 1,92 | 0,1 | 1,1 | 0,1 | 0,1 |

DS: Downov syndróm, NTD: neural tube defects - rážštep nervovej trubice, Tri 18 - trizómia 18 - Edwardsov syndróm, An. DS: anamnéza DS - indikuje rodiny s výskytom Downovho syndrómu v niektovej z predchádzajúcich gravidít matky, predč.: odber bol odobratý predčasne a preto je nepoužiteľný, nes: odber bol odobratý neskoro a preto je nepoužiteľný, multig: - viacplodová gravidita.

Výskyt pozitívnych skriningov pre vyššie riziko DS v II. trimestri oproti výskytu v stratégii interovaného skriningu je evidentne rozdielny. Pri rovnakom nastavení *cut-off* 1:250 pre pozitivitu je výskyt pozitívnych skriningov v skriningovej stratégii II. trimestra skoro dvojnásobný. V skriningu II. trimestra je aj vyšší výskyt pozitívnych skriningov pre riziko trizómie 18 a pre riziko NTD (neural tube defects). Stratégia integrovaného skriningu je podstatne bezpečnejšia.

Tabuľka 3. Indikácie na invazívny odber vzorky plodovej vody na prenatalnú genetickú diagnostiku

| Indikácia | 14.1.2009 - 31.10.2009 | 1.11.2009 - 15.8.2010 |
|-------------------------|------------------------|-----------------------|
| Len vek na 35 rokov | 44 | 16 |
| Double test | 7 | |
| Triple test | 89 | 36 |
| Integrovaný biochemický | 3 | 3 |
| Integrovaný štandardný | 5 | 16 |
| NT nad 3mm | 3 | 4 |
| Vývojová chyba plodu | 3 | 2 |
| Genetická | 3 | 1 |
| Spolu | 157 | 78 |

Double test: AFP+hCG, triple test: AFP+hCG+uE3, integrovaný biochemický skrining: AFP+hCG+uE3+PAPP-A, integrovaný štandardný prenatalný skrining: AFP+hCG+uE3+PAPP-A+NT, NT: nuchálna translucencia.

V období od 1.11.2009 do 15.8.2010 v porovnaní s rovnako dlhým obdobím pred začatím projektu (14.1.2009-31.10.2009) klesol počet invazívnych odberov plodovej vody na prenatalné vyšetrenie chromozómov o 49,7%. V období pred projektom tvorila indikácia samotného veku 28% z celku, v období projektu tvorila indikácia samotného veku 20,5%. V tejto indikácii sme zaznamenali relatívny, ale aj absolútny pokles indikácií PD (prenatálna genetická diagnostika). Integrované stratégie zaberali v období pred projektom 5% indikácií, v období projektu to je 24,3% indikácií. Skriningové stratégie II. trimestra (double test: vyšetrenie AFP a hCG, triple test: vyšetrenie AFP + hCG + uE3) zaberali spolu v období pred projektom 61%, v období projektu 46% indikácií. Zväčšenie NT nad 3 mm alebo nález vývojovej chyby plodu sú samostatné indikácie na vyšetrenie chromozómov plodu, ako je aj vysoké genetické riziko vyhodnoteného na základe genetického vyšetrenia.

Tabuľka 4. Patologické UZV nálezy a cytogenetické anomálie zistené v období od 1.11.2009 do 15.8.2010

| Názov | UZV patológia | Chromozómové anomálie |
|---------------------------------------|---------------|-----------------------|
| Hygroma colli cysticum, Hydrops plodu | 6 | XO,XO |
| Dandy-Walkerova malformácia | 1 | |
| Agenesis corporis callosi | 1 | |
| Robertsonovská translokácia 14/15 fam | | 1 |
| Intersticiálna delécia 16q,mos | | 1 |
| Trizómia 21 | | 2 |
| Trizómia 18 | | 1 |
| Body - limb stalk anomaly | 1 | |
| Hypoplázia ľavého srdca | 1 | |
| Potter sekvencia | 1 | |
| Arthrogryposis multiplex congenita | 1 | |
| Simplexná cysta mediastína | 1 | |
| Rážštep brušnej steny (AWD) | 1 | |
| Akranius/ Meningokéla | 2 | |
| IUGR/oligohydramnion/NF 9mm/ | 1 | |

Za obdobie 9,5 mesiaca sme zistili 7 chromozómových anomálií u plodov (z toho 1 nepoškodí vývoj plodu a 1 má neistú prognózu). Zo 17 pozitívnych UZV nálezov je 13 vývojových chýb s nepriaznivou prognózou, 1 nález s prognózou neistou a 3 nálezy majú po dodatočných vyšetreniach prognózu dobrú. Meranie NT v I. trimestri umožňuje zistiť väčší počet vývojových chýb u plodov vo včasnejšom období vývoja. Meranie NT je náročné na techniku a skúsenosti lekára. Program ALPHA umožňuje sledovať aj parametre súvisiace s hodnotením kvality merania NT.

Z porovnania dvoch obrázkov auditu merania NT jednoznačne vyplýva potreba správneho zaškolenia lekára tak, aby bola dôvera v správne meranie a následne využitie hodnoty NT na správny výpočet rizika DS. Merania lekára, ktorý nemá certifikát FMF sú pre výpočet nepoužiteľné.

Ukážka zároveň dokazuje potrebu centralizácie tehotných do pracovísk, kde sa získa dostatočný počet meraní NT, čo je veľmi dôležité pre správne nastavenie programu.

Najčastejšie je prvá vzorka krvi v integrovanom skriningu odobratá správne a to v priebehu 11.-12. týždňa gravidity. Odber druhej vzorky je spravidla vykonaný v období 15.-16. týždňa gravidity. Do 90 % integrovaných je vyhodnotených v priebehu 16. týždňa gravidity. Klinický genetik priebežne vyhodnocuje výsledky parciálnych skriningov I. trimestra v čase, keď je dostupné vyšetrenie PAPP-A a namerané NT. V prípadoch vypočítaného extrémneho rizika DS, zistenej vývojovej chyby plodu alebo vysokej nameranej hodnoty NT nečaká na kompletný integrovaný skrining, ale postupuje individuálne.

Tabuľka 5. Porovnanie záchytnosti Downovho syndrómu (DR v %), falošnej pozitivity (FPR v %) a OAPR (odds of being affected given a positive result - pravdepodobnosti zistenia chyby pri pozitívnom skriningu), pri cut-off 1 : 250, v jednotlivých skriningových stratégiách podľa vyšetrení v našom súbore

| Skriningová kombinácia | DR (%) | FPR (%) | OAPR |
|------------------------|--------|---------|--------|
| AFP+hCG | 70,3 | 7,1 | 1 : 61 |
| AFP+hCG+uE3 | 75,9 | 5,9 | 1 : 47 |
| AFP+hCG+uE3+PAPP-A | 78,9 | 4,8 | 1 : 37 |
| AFP+hCG+uE3+PAPP-A+NT | 87,4 | 2,5 | 1 : 17 |

Program ALPHA audituje jednotlivé skriningové stratégie na jednotnom porovnávacom základe. Kombinácia AFP + hCG (double test) dosiahne záchytu DS na úrovni 70 %, za podmienky že 7,1 % tehotných žien podstúpi invazívny odber vzorky na prenatálne genetické vyšetrenie a potom je pravdepodobnosť 1 : 61, že spomedzi týchto vzoriek zistíme plod s DS. Pri integrovanom skriningu je záchytnosť DS 87,4 %, na tento záchyt stačí len 2,5 % invazívnych odberov vzoriek plodovej vody

a pravdepodobnosť zistenia DS spomedzi odobratých vzoriek je 1 : 17.

Cieľom projektu je poskytovanie rýchlej, spoľahlivej a kvalitnej prenatálnej cytogenetickej diagnostiky. Zo strany tehotných žien a lekárov je výrazný tlak na to, aby sme jednoznačné výsledky poskytli čo najrýchlejšie. Vyšetrenie kompletného karyotypu plodu trvá spravidla 14-21 dní. To je dlhý čas trvania neistoty a psychickej tenzie u tehotnej ženy. FISH metóda umožňuje poskytnúť prvý a spravidla najdôležitejší výsledok do 48-72 hodín.

Tabuľka 6. Rozloženie indikácií FISH vyšetrení v období od 1. 11. 2009 do 15. 8. 2010

| | |
|----------------------|-----|
| Aneutest kompletný | 13 |
| Aneutest parciálny | 36 |
| LSI 21 (trizómia 21) | 157 |
| DiGeorge syndróm | 2 |
| Prader Willi syndróm | 1 |
| Tel20p/g, 16p/g | 2 |
| WCP 16 | 1 |
| Spolu | 212 |

Vykonalí sme 212 FISH vyšetrení rôznych kombinácií podľa klinickej indikácie FISH vyšetrenia. Aneutest kompletný znamená rýchle FISH vyšetrenie autozómových trizómii chromozómov 13, 18, 21 a gonozómov X a Y. Aneutest parciálny je zameraný len na autozómové trizómie 13, 18 a 21. Každú odobratú plodovú vodu vyšetříme na trizómiu 21 sondou LSI 21 (locus specific identifier). Ostatné FISH vyšetrenia sú selektívne zamerané a odpovedajú na diagnostickú otázku pri genetickom vyšetrení matky.

Obrázky č. 1 - 3: viď farebná Príloha č. 1, str. 169 - 170.

DISKUSIA

V období prvých 9,5 mesiacov od začatia projektu, v období od 1. 11. 2009 do 15. 8. 2010, sme pomocou programu ALPHA vyhodnotili riziko u 1978 tehotných žien. Z tohto počtu bolo u 47,2 % tehotných žien (934) vykonané vyhodnotenie na základe integrovaného skriningu. Starším a menej efektívnym postupom prenatálneho skriningu v II. trimestri (double test a triple test) bolo vyhodnotených 52,3 % (1035) odobratých vzoriek. V projekte plánujeme dosiahnuť vyhodnocovanie rizika pomocou integrovaného skriningu u viac ako 50 % tehotných žien vyšetovaných v laboratóriu KLINICKÁ BIOCHÉMIA s.r.o.

Integrovaný skrining označil výsledok ako pozitívny u 4,7% tehotných žien a to pri nastavení hranice pozitIVITY, *cut-off* 1:250. Je to skoro o polovicu menej ako pri skriningu v II. trimestri. Oproti priemeru v SR, ktorý je 7% (2,3) je to významne nižší počet.

V období od 1.11.2009 do 15.8.2010 pri porovnaní s rovnako dlhým obdobím pred začatím projektu (14.1.2009–31.10.2009) klesol počet invazívnych odberov plodovej vody na prenatalne vyšetrenie chromozómov (PD) o 49,7%.

V období pred projektom tvorila indikácia PD len pre vek tehotnej 28% z celku, v období projektu to bolo 20,5%, nastal aj absolútny aj relatívny pokles vekovej indikácie na vyšetrenie chromozómov plodu. Integrované stratégie v období pred projektom tvorili 5% zo všetkých indikácií PD, v období projektu to je 24,3% indikácií na vyšetrenie chromozómov plodu. Double test a triple test spolu v období pred projektom zaberali 61%, v období projektu 46% z počtu indikácií PD.

Kvalita stratégie integrovaného skriningu je závislá od kvality jednotlivých častí a je komplexná. Dôležitým faktorom pre kvalitu biochemických vyšetrení je striktné dodržiavanie pravidiel v preanalytickej fáze ako aj účasť laboratória v externom systéme kontroly kvality (16). Kvalitu vyšetrenia nekonjugovaného estriolu považujeme stále za nedostatočnú. Diagnostická súprava na stanovenie uE3 bude v krátkom čase upravená a použitie monoklonálnych protilátok by malo zlepšiť jej parametre. U ostatných biochemických markerov (AFP, hCG a PAPP-A) problémy s kvalitou vyšetrenia nie sú.

Vyšetrenie NT vykazuje príslušnú stabilitu. Pre vyšetrenie NT sa jednoznačne požaduje certifikát FMF.

Celý proces integrovaného skriningu má požadovanú rýchlosť, až do 90% skriningov je vyhodnotených v priebehu 16. týždňa gravidity.

Naše skúsenosti s používaním integrovaného skriningu potvrdzujú jeho vyššiu efektívnosť a bezpečnosť. Efektívnosť sa odvodzuje od záchytnosti DS, táto je u integrovaných stratégií najvyššia. Bezpečnosť sa odvodzuje od čo najnižšieho počtu invazívnych odberov vzoriek na vyšetrenie chromozómov plodu pri čo najvyššej záchytnosti. Ako naša štúdia dokazuje, používanie stratégie integrovaného skriningu znižuje počet invazívnych odberov skoro na polovicu.

Rýchla diagnostika aneuploidii metódou FISH výrazne skraca čas čakania na kompletný výsledok chromozómovej analýzy plodu. Pri kompletnom vyšetrení chromozómov plodu čakáme na výsledok 14–21 dní, pri metóde FISH sa dozvieme o počte chromozómov č. 21 do 48–72. hodín. Vyšetrenie FISH na trizómii 21 je nateraz v SR hodnotené ako nadštandardné. Pri invazívnom odbere vzorky sa požaduje kompletné vyšetrenie chromozómov plodu. Viaceré štúdie hľadajú model, ktorý by bol ekonomicky efektívnejší a umožnil by pri splnení podmienok u časti tehotných vyšetrovať len autozómové trizómie 13, 18 a 21 metódami FISH alebo molekulárno-genetickým vyšetrením (aneutest) (5). Postup uvedený v práci Hills *et al.* (2010) dokazuje, že pri skriningových stratégiách s vysokou záchytnosťou DS a kvalitnej sonografii v I.

trimestri je potrebné vyšetrenie kompletného karyotypu len u 25% indikovaných odberov na PD. Aj na Slovensku, tam kde máme tieto podmienky naplnené, môžeme ku takémuto postupu pristúpiť.

V nerozhodných prípadoch skriningu alebo iných indikovaných situáciách častejšie používame aj podrobné sonografické vyšetrenie plodu v 20.–22. týždni gravidity, tzv. „genetický ultrazvuk“.

Uvedomujeme si rýchlosť vývoja poznatkov v oblasti prenatalnej diagnostiky a potrebu relevantných vedeckých informácií pre lekárov ako aj pre tehotné ženy. Naše poznatky a základné informácie postupne uverejňujeme na webovej stránke: <http://www.prenatalnecentrum.sk>.

Na stránke je podrobne rozpísaný aj postup na kvalitné zabezpečenie vyšetrení pre integrovaný prenatalný skrining, sú uvedené užitočné informácie pre tehotné ženy, informácie pre lekárov a žiadanky na vyšetrenia. Publikujeme tam aj najčastejšie kladené otázky tehotných v súvislosti s prenatalnou diagnostikou a prenatalnou genetickou diagnostikou.

ZÁVER

Doterajšie výsledky projektu sú v súlade s najnovšou literatúrou a dokazujú, ako aj v našich podmienkach môžeme zlepšiť prenatalný skrining a prenatalnú genetickú diagnostiku. Integrovaný prenatalný skrining zvyšuje záchytnosť Downovho syndrómu a iných chromozómových anomálií a zároveň znižuje počet potrebných invazívnych odberov vzoriek plodovej vody (4, 6, 11). Zavedenie štandardizovaného a kvalitného UZV vyšetrenia do I. trimestra gravidity umožňuje zistiť mnohé vývojové chyby plodu omnoho skôr a spresňuje výpočty rizík. Integrovaný prenatalný skrining umožňuje znížiť aj počet indikovaných vyšetrení karyotypov plodov, ktoré nemajú žiadne UZV znaky pre možnú chromozómovú anomáliu alebo vývojovú chybu a tieto možno nahradiť rýchlym vyšetrením FISH aneutestom, prípadne DNA testom na aneuploidie. Tento prístup by významne šetril náklady na prenatalnú genetickú diagnostiku. Odhaduje sa, že kompletná chromozómová analýza by bola potom potrebná len u 25% skriningovo pozitívnych gravidít (5).

LITERATÚRA

1. Benacerraf, B. R.: *The history of the second-trimester sonographic markers for detecting fetal Down syndrome, and their current role in obstetric practice.* Prenat Diagn., 2010, 30: 644–652.
2. Bilardo, C. M., Timmerman, E., Pajkrt, E., van Maarle, M.: *Increased NT in euploid fetuses-what should we be telling the parents.* Prenat Diagn., 2010, 30: 93–102.
3. Cisarik, F. *et al.*: *Prenatálna genetická diagnostika na Slovensku za obdobie 1991-1999.* Prakt. Gynek., 2001, 8 (2): 73–80.
4. Dhaifalah, I. *et al.*: *Vyšší věk matky jako indikace k inva-*

- živní prenatalní diagnostice? Čes. Gynek., 2007, 72 (3): 181–184.
5. Hills, A., Donaghue, C., Waters, J., Waters, K., Sullivan, C., Kulkarni, A. *et al.*: *QF-PCR as a stand-alone test for prenatal samples: the first 2 years' experience in the London region.* Prenat. Diagn., 2010, 30: 509–517.
 6. Chitty, 2010: *The evolution of prenatal diagnosis.* Prenat. Diagn., 2010, 30: 599–600.
 7. Malone, F. *et al.*: *First-trimester or second-trimester screening, or both, for Down's syndrome. First- and Second-Trimester Evaluation of Risk (FASTER) Research Consortium.* N. Engl. J. Med., 2003, 353: 2001–2011.
 8. Nikolaides, K. H.: *Screening for chromosomal defects.* Ultrasound Obstet Gynecol., 2003, 21: 313–321.
 9. Nikolaides, K. H.: *UZ screening v 11.-13+6. gestačním týdnu.* 1. české vydání. Olomouc: Fetal Medicine Foundation 2004: 117s.
 10. *Screening for Fetal Chromosomal Abnormalities.* ACOG Practice Bulletin. Obstet Gynecol., 2007, 109 (1): 217–227.
 11. *Prenatal Screening for Fetal Aneuploidy.* SOGC Clinical Practice Guideline. J. Obstet Gynaecol. Can., 2007, 29 (2): 146–161.
 12. Wald, N. J. *et al.*: *First and second trimester antenatal screening for Down's syndrome: the results of the Serum, Urine and Ultrasound Screening Study (SURUSS).* J. Med. Screen, 2003; 10: 56–104.
 13. Wald, N. J.: *Prenatal screening for open neural tube defects and Down syndrome: three decades of progress.* Prenat Diagn 2010, 30: 619–621.
 14. Springer, D., Zima, T., Arnošťová, L.: *Stability of Free β -hCG in the Routine Screening of Down Syndrome in the First Trimester of Pregnancy.* Prague Medical Report 2008, 109, č. 2–3, str. 134–141.
 15. *Autorský kolektiv: Preanalytická fáze 2005,* Česká společnost klinické biochemie ČLS JEP 2005, SEKK, spol. s r.o. 2005.
 16. Benn, A. *et al.*: *Reproducibility of Risk Figures in 2nd - Trimester Maternal Serum Screening for Down Syndrome: Comparison of 2 Laboratories.* Clinical Chemistry, 2006, 52, č. 11, str. 2087–2094.

SYSTEMATICKÝ PREHĽAD: POROVNANIE PRIAMYCH A NEPRIAMYCH METÓD STANOVENIA LDL-CHOLESTEROLU

Rudolf Gaško

Bioštatistická jednotka, Oddelenie klinickej biochémie,
Železničná nemocnica s poliklinikou Košice

SÚHRN

Pozadie: Stanovenie lipoproteínov nízkej denzity v cholesterole (LDL-C) je nezávislým rizikovým faktorom kardiovaskulárnych chorôb. Validita, teda presnosť a správnosť rôznych metód stanovenia LDL-C je problematická.

Účel: Zostavenie prehľadu publikovaných štúdií ktoré popisujú vzťahy medzi rôznymi metódami stanovenia LDL-C.

Zdroj dát: Databázy SCOPUS, WoS, Scholar Google (od 2000 do 30.6.2010) + ručné vyhľadávanie. Bez obmedzenia na anglicky písané štúdie.

Syntéza dát: Všetkých 68 štúdií, alebo častí štúdií, bolo heterogénnych v štatistickej metodológii ktorá bola použitá k hodnoteniu ekvivalencie medzi metódami. V prehľade popisujeme vzťahy medzi ultracentrifugáciou a Friedewaldovou formulou alebo inými nepriamymi metódami; priamymi metódami 3. generácie a Friedewaldovou formulou alebo inými nepriamymi metódami; nepriamymi metódami navzájom; raritnými metódami.

Záver: Výsledky LDL-C získané rôznymi metódami stanovenia nie sú vzájomne harmonizované.

Kľúčové slová: LDL-cholesterol, ultracentrifugácia, priame metódy, nepriame metódy, validita, systematický prehľad

SUMMARY

Background: Measures of low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) have been stated as an independent risk factor for cardiovascular disease. Validity of different methods for measuring LDL is problematic.

Purpose: To review published studies that reported relationships between different methods for LDL-C measuring.

Data Source: SCOPUS, WoS, Scholar Google (2000 to 30 June 2010) + manual searching. Not limited to English-language studies.

Data Synthesis: All 68 studies, or substudies, were heterogeneous in statistical methodologies that were used to assess the equivalence between methods. In review we describe relationships between ultracentrifugation vs Friedewald formula or other indirect methods; direct methods of third generation vs Friedewald formula or other indirect methods; indirect methods to each other; rare methods.

Conclusion: LDL-C results obtained by different methods of assessment are not mutually harmonized.

Key words: LDL-cholesterol, ultracentrifugation, direct methods, indirect methods, validity, systematic review

LDL-cholesterol (LDL-C) je významným rizikovým faktorom aterosklerózy ciev a jej dôsledkov. V súlade s tým je LDL-C považovaný za hlavný cieľ hypolipidemickej liečby vo všetkých aktuálne platných medzinárodných aj národných kardiovaskulárnych guidelineoch.

Stanovenie koncentrácie LDL-C vždy bolo a naďalej zostáva problematickým vyšetrením čo sa týka štandardizácie a spoľahlivosti. Dôvodov je viacej, medzi hlavné patrí:

1. heterogenita častíc LDL (low density lipoproteins)
2. neexistencia ostrej hranice medzi VLDL (very low density lipoproteins), IDL (intermedial density lipoproteins) a LDL, ktoré pri svojom katabolizme v krvi prechádzajú plynule jedna do druhej.

Vzájomnému porovnaniu rôznych metód stanovenia LDL-C z analytického pohľadu aj z pohľadu klinických konzekvencií sa venuje veľa vedeckých publikácií. Najznámejším porovnaním, ktoré je zároveň najviac citovaným a má najväčší vplyv na reálnu diagnostiku, je práca Friedewalda a spol (1).

Po spracovaní a publikovaní meta-analýzy porovnania stanovenia LDL-C referenčnou metódou ultracentrifugácie a Friedewaldovým výpočtom (2), podľa našich vedomostí prvej takejto meta-analýzy vo svetovom písomníctve, v tejto práci popisujeme porovnania stanovenia LDL-C všetkými používanými metódami. Podstatným rozdielom oproti predošlej práci je, že tentoraz nebolo možné použiť metódu kvantitatívneho spracovania výsledkov primárnych štúdií, teda meta-analýzu. Príliš veľká rozdielnosť metodických postupov použitých v jednotlivých primárnych štúdiách umožňuje iba kvalitatívny popisný prehľad realizovaných štúdií, teda systematický prehľad (3). Problém diverzity metodických postupov pri sekundárnom spracovaní primárnych štúdií sa však nevzťahuje iba na nami sledovanú oblasť LDL-C. Je popisovaný ako zásadný nedostatok primárnych klinických štúdií aj diagnostických štúdií publikovaných aj v tých najrenomovanejších časopisoch (4, 5).

Cieľom tejto práce je predložiť komplexný prehľad publikovaných výsledkov porovnaní stanovenia LDL-C, a to včítane neanglicky písanej literatúry a šedej literatúry.

METODIKA

Primárne štúdie boli vybrané nasledovným postupom.

1. Prvotné vyhľadávanie literatúry. Prvotné vyhľadávanie bolo vykonané v databázach SCOPUS, WoS, Scholar Google. Šedá literatúra, predovšetkým česká a slovenská, bola získaná nesystémovo z rôznych iných zdrojov. Použité kľúčové slová: LDL cholesterol,

method comparison study, Friedewald, ultracentrifugation, beta quantification, indirect. Všetky kombinácie kľúčových slov v syntaxe „and“, „or“. Obdobie: 2000 – jún 2010. (Zdôvodnenie vybraného obdobia: Porovnania boli publikované od sedemdesiatych rokov, vid' citácia 1. Zatiaľ čo gold standard metódou je od tohto obdobia doteraz metóda ultracentrifugácie, rutinnými v praxi používanými a teda porovnávanými metódami bolo niekoľko generácií priamych metód stanovenia LDL-C. Približne od roku 2000 sa doteraz v rutine používajú a v porovnávacích štúdiách spracovávajú priame metódy 3. generácie, ktorými sú enzymatické neprecipitačné metódy. Tento prehľad nemá ambíciu popisovať porovnávaná z dnešného pohľadu archaických, teda už nereprodukovaných, metód.)

2. Získanie plných textov prác a ich preštudovanie.
3. Selekcija vhodných primárnych štúdií. Boli použité tieto inklúzne a exklúzne kritériá: Typ publikácie: Originálna práca. Vylúčené boli prehľadové práce (reviews), abstrakty z konferencií, kazuistiky, veterinárne publikácie. Vylúčené boli duplicitné publikácie, teda rovnaké výsledky tej istej štúdie publikované v 2 alebo viacerých prácach, pričom sa nemuselo

Tabuľka 1. Práce vylúčené z ďalšieho spracovania s dôvodom vylúčenia

| |
|--|
| Abstrakty z medzinárodných alebo národných konferencií - 6 -15 |
| Kazuistiky - 16-18 |
| Veterinárne publikácie - 19 |
| Duplicitné publikácie - 20 (duplicita s 21) |
| Non-fasting vzorky - 23-25 |
| Súbor s n < 50 vzorkami - 11, 26-35 |
| TAG nad 4,5 mmol/l pri hodnotení Friedewaldovho výpočtu - 25, 36-38 |
| Precipitačné priame metódy 2. generácie - 39-43 |
| Inter-assays variability - 35, 44-47, 52 (práce 46, 47 a 52 sú pre ukážku uvedené v tab. 2) |
| Iné dôvody: 22, 53 (napriek úsiliu sa nepodarilo získať plný text práce), 48 (nedostatočný popis výsledkov), 49 (hodnotená obsolentná metóda), 50 (metodická práca, nedostatočný popis originálnych výsledkov), 51 (tézy ku habilitácii, nejedná sa o plnohodnotnú publikáciu), 54 (publikované v nepreložiteľnom jazyku a zo súhrnu a tabuliek sa nedajú urobiť plnohodnotné závery, na rozdiel od iných prác v tomto alebo iných takýchto jazykoch) |

jednať o nekalé publikovanie ale o celkom bežné publikovanie najprv formou prednášky alebo posteru na vedeckej konferencii a následne v časopise. Jazyk: akýkoľvek. Hodnotené vzorky museli byť nalačno (fasting). Vylúčené boli práce, alebo časti prác, hodnotiace non-fasting vzorky, alebo zmiešané fasting + non-fasting vzorky. Ak bol hodnotený Friedewaldov výpočet (2), boli vylúčené práce, alebo časti prác, hodnotiace vzorky s triacylglycerolmi (TAG) nad 4,5 mmol/l. Hodnotený súbor vzoriek musel mať viac než 50 členov. Vylúčené boli všetky práce, alebo časti prác, so súbormi n < 50. Vylúčené boli aj práce, ktoré síce splnili časové kritérium publikácie po roku 2000, avšak popisovali porovnanie niektorej z priamych precipitačných enzymatických metód, teda metód 2. generácie, ktoré boli popisované ako rutinne používané na teritóriu autorov prác, avšak vo vyspelom svete už nie sú na trhu, teda nemôžu byť reprodukovateľné. V tabuľke 1 sú uvedené príklady vylúčených prác. Niektoré z nich splnili aj viac exklúzných kritérií zároveň, alebo v niektorej časti naplnili exklúzne kritériá ale v inej časti nie. Uvedené práce predstavujú zhruba polovicu všetkých vylúčených prác, druhá polovica nie je uvedená z priestorových dôvodov. Štúdie hodnotiace interassay variabilitu, teda priame metódy rôznych výrobcov, majú špecifický dizajn. Väčšia časť z nich tiež bola vylúčená.

4. Publikácie spĺňajúce inklúzne kritériá boli rozdelené do nasledovných 4 skupín: Porovnanie beta-quantifikácie s ostatnými metódami - tabuľka 2. Porovnanie priamych metód 3. generácie s nepriamymi metódami - tabuľka 3. Porovnanie nepriamych metód navzájom - tabuľka 4. Porovnanie niektorej z doteraz uvedených metód s raritnými metódami - tabuľka 5. Raritnými metódami sú metódy použité iba v jednej publikácii, ako experimentálna, nie rutinne používaná metóda.

VÝSLEDKY

V tabuľkách 2-5 sú uvedené základné údaje z prác ktoré splnili inklúzne kritériá. Pre podrobnosti odkazujeme na primárne práce. V stĺpci Analýza - metóda je popísaných dovedna 15 matematických spôsobov porovnávania zhody dvoch metód. V mnohých prácach bolo použitých aj viac spôsobov, ako jeden, resp. boli použité aj grafické metódy (grafy Bland-Altman, Passing-Bablok, krabicové grafy). Korelačný koeficient je tu uvedený iba vtedy, ak žiadna iná metóda komparácie nebola použitá (má veľmi slabú výpovednú hodnotu). V stĺpci Výsledky je popísaných dovedna 12 numerických spôsobov vyjadrenia výsledkov. Ak je výsledkom rozdiel medzi dvoma metódami, potom sa vždy myslí Test 2 voči Testu 1 - porovnávaná metóda voči referenčnej metóde. Pre túto rozmanitosť nebola urobená matematická kompilácia výsledkov, či už ako vážený priemer výsledných rozdielov, alebo inou metódou.

Tabuľka 2. Porovnanie beta-kvantifikácie (BQ) alebo ultracentrifugácie (UC) s ostatnými metódami

| Author, year, country | Language | SCOPUS citations | N | Mean (range), mmol/l | | | | | Population | Tests | | Analysis | Results |
|---------------------------------|----------|------------------|-------|----------------------------|------------------|------------------|--|---|------------|----------------------------|------------------------------------|--------------------|----------|
| | | | | TC | TG | HDL-C | LDL-C measured with Test 1 method/merany referenčnou metódou | Test 1 or „Ref Std“ (metric) | | Test 2 (metric) | | | |
| Author, rok publikácie, štát | Jazyk | ohlasy | n | Priemer (rozpätie), mmol/l | | | | | Populácia | Test 1 (referenčná metóda) | Test 2 (porovnávaná metóda) | Analýza - metóda | Výsledky |
| Sibal 2010, (55), UK | english | 0 | 80 | 4,54 | 0,90 | 1,43 | 2,86 | Healthy volunteers | BQ | F* | difference | -0,27 mmol/l | |
| | | | 74 | 4,77 | 1,00 | 1,46 | 3,02 | People with Type 1 diabetes without macrovascular disease or microalbuminuria | BQ | F | difference | -0,29 mmol/l | |
| Niemi 2009, (56), Finland | english | 0 | 1 775 | 5,83 (2,14-11,37) | 1,65 (0,12-4,52) | 1,58 (0,34-4,50) | | Mixed normolipidemic + dyslipidemic subjects, incl. chronic renal failure | UC | F | regression lines*; r | 0,92 | |
| | | | | | | | | | UC | ANN regression models | regression lines*; r | 0,93 | |
| Esteban-Salan 2008, (57), Spain | english | 1 | 1779 | | (0,24-13,56) | | 3,2 | Randomly selected clinical samples | BQ | Direct (Kyowa) | Bias | -0,07 mmol/l | |
| | | | 128 | | < 1,12 | | 3,25 | | BQ | Direct (Kyowa) | Bias | -0,12 mmol/l | |
| | | | 128 | | < 1,12 | | 3,25 | | BQ | F | Bias | -0,21 mmol/l | |
| | | | 614 | | 1,12-2,25 | | 3,46 | | BQ | Direct (Kyowa) | Bias | -0,22 mmol/l | |
| | | | 614 | | 1,12-2,25 | | 3,46 | | BQ | F | Bias | -0,35 mmol/l | |
| | | | 629 | | 2,26-3,39 | | 3,51 | | BQ | Direct (Kyowa) | Bias | -0,01 mmol/l | |
| | | | 629 | | 2,26-3,39 | | 3,51 | | BQ | F | Bias | -0,30 mmol/l | |
| | | | 230 | | 3,40-4,52 | | 3,29 | | BQ | Direct (Kyowa) | Bias | -0,05 mmol/l | |
| | | | 230 | | 3,40-4,52 | | 3,29 | | BQ | F | Bias | -0,35 mmol/l | |
| | | | 774 | | (0,26-19,50) | | (0,59-10,72) | Randomly selected clinical samples | BQ | Direct (Kyowa) | mean of difference, mmol/l (95%CI) | 0,02 (-0,04, 0,00) | |

| Author, year, country | Language | SCO-PUS | Mean (range), mmol/l | | | | | Population | Tests | | Results | | |
|------------------------------|----------|---------|----------------------------|----------------------|---------------------|--|------------------------------|------------------|----------------------------|---|--|----------------|---|
| | | | TC | TG | HDL-C | LDL-C measured with Test 1 method/merany referencnou metódou | Test 1 or „Ref Std“ (metric) | | Test 2 (metric) | | | | |
| Author, rok publikácie, štát | Jazyk | ohlasy | Priemer (rozpätie), mmol/l | | | | | Populácia | Test 1 (referencná metóda) | Test 2 (porovnávaná metóda) | Výsledky | | |
| Okazaki 2008, (58), Japan | english | 4 | 50 | 4,96 (3,15-7,03) | 1,37 (0,46-3,73) | 1,34 (0,69-1,91) | 2,98 (1,48-4,69) | Healthy controls | BQ | F | %Bias (min,max) 0,9 (-9,7, 34,2) | | |
| | | | 17 | 7,63 (5,29-16,86) | 11,02 (5,5-25,9) | 0,82 (0,29-1,55) | 2,25 (0,54-4,46) | Hyper TG | BQ | F | %Bias (min,max) nd | | |
| | | | 8 | 5,44 (3,83-7,24) | 2,63 (1,63-3,34) | 1,36 (1,00-1,79) | 1,50 (0,93-2,04) | Apo E2/2 | BQ | F | %Bias (min,max) 92,2 (28,3, 130) | | |
| | | | 10 | 6,89 (5,27-8,23) | 0,74 (0,43-1,35) | 3,34 (2,59-4,40) | 3,27 (1,64-5,24) | Hyper HDL | BQ | F | %Bias (min,max) -2,6 (-12,8, 3,0) | | |
| | | | 12 | 5,29 (3,49-8,62) | 1,23 (0,46-1,75) | 1,25 (0,56-2,52) | 3,55 (2,18-6,81) | Hyper Lp(a) | BQ | F | %Bias (min,max) -1,5 (-6,9, 1,6) | | |
| | | | 50 | 4,96 (3,15-7,03) | 1,37 (0,46-3,73) | 1,34 (0,69-1,91) | 2,98 (1,48-4,69) | Healthy controls | BQ | HPLC | %Bias (min,max) -3,2 (-12,5, 0,3) | | |
| | | | 17 | 7,63 (5,29-16,86) | 11,02 (5,5-25,9) | 0,82 (0,29-1,55) | 2,25 (0,54-4,46) | Hyper TG | BQ | HPLC | %Bias (min,max) 24,6 (-3,6, 71,7) | | |
| | | | 8 | 5,44 (3,83-7,24) | 2,63 (1,63-3,34) | 1,36 (1,00-1,79) | 1,50 (0,93-2,04) | Apo E2/2 | BQ | HPLC | %Bias (min,max) 21,0 (-12,4, 70,2) | | |
| | | | 10 | 6,89 (5,27-8,23) | 0,74 (0,43-1,35) | 3,34 (2,59-4,40) | 3,27 (1,64-5,24) | Hyper HDL | BQ | HPLC | %Bias (min,max) -15,2 (-38,8, -4,0) | | |
| | | | 12 | 5,29 (3,49-8,62) | 1,23 (0,46-1,75) | 1,25 (0,56-2,52) | 3,55 (2,18-6,81) | Hyper Lp(a) | BQ | HPLC | %Bias (min,max) -13,4 (-25,0, -5,0) | | |
| | | | Evans 2007, (59), USA | english | 3 | 271 | | | | HIV-infected persons, treated, with TG below 4,5 mmol/l | UC | Direct Genzyme | agreement statistics*, precision, accuracy 0,923, 0,977 |
| | | | | | | | | | | | UC | F | agreement statistics*, precision, accuracy 0,896, 0,996 |

| | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------------------|---------|---|------|------------------|------------------|------------------|-------------------|--|---|----|--------------------------|-----------------|------------------------|
| Garcia Aguilar 2006, (60), Spain | spanish | 1 | 251 | | | | | | Consecutive in-patients, normolipemia, n=40 | BQ | Direct (popis v legende) | B-A LOA (95%CI) | 0,052 (-8,31, 0,186) |
| | | | | | | <2,26 | | | Consecutive in-patients, hypercholesterolemia, n=54 | BQ | Direct (popis v legende) | B-A LOA (95%CI) | -0,253 (-0,528, 0,517) |
| | | | | | | >2,26 | | | Consecutive in-patients, hyperlipemia, n=97 | BQ | Direct (popis v legende) | B-A LOA (95%CI) | -0,026 (-0,256, 0,139) |
| | | | | | | >2,26 | | | Consecutive in-patients, hypertriglyceridemia, n=60 | BQ | Direct (popis v legende) | B-A LOA (95%CI) | 0,113 (-0,040, 0,253) |
| Tremblay 2005, (61), Canada | english | 3 | 1302 | 5,9 (1,78-16,94) | 2,43 (0,36-4,52) | 0,99 (0,08-2,55) | 3,86 (0,58-15,51) | | Patients from Lipid Clinic, all | BQ | F | %Bias (SD) | -0,7 (15,7) |
| | | | | | | | | | Patients from Lipid Clinic, Genotype E4/E4 | BQ | F | %Bias (SD) | -4,1 (7,1) |
| | | | | | | | | | Patients from Lipid Clinic, Genotype E4/E3 | BQ | F | %Bias (SD) | -3,6 (6,7) |
| | | | | | | | | | Patients from Lipid Clinic, Genotype E3/E3 | BQ | F | %Bias (SD) | -4,4 (6,7) |
| | | | | | | | | | Patients from Lipid Clinic, Genotype E4/E2 | BQ | F | %Bias (SD) | 0,7 (8,7) |
| | | | | | | | | | Patients from Lipid Clinic, Genotype E3/E2 | BQ | F | %Bias (SD) | -0,07 (10,9) |
| | | | | | | | | | Patients from Lipid Clinic, Genotype E2/E2 | BQ | F | %Bias (SD) | 40,2 (36,9) |
| | | | | | | | | | Patients from Lipid Clinic, Genotype E2/E2 non-type III | BQ | F | %Bias (SD) | 11,0 (16,6) |
| | | | | | | | | | Patients from Lipid Clinic, Genotype E2/E2 type III | BQ | F | %Bias (SD) | 63,5 (31,6) |

| Author, year, country | Language | SCO-PUS | N | Mean (range), mmol/l | | | | Population | Tests | | Results | |
|-------------------------------|----------|---------|------|----------------------------|---------------------|--------------------|--|--|--|--|--|---|
| | | | | TC | TG | HDL-C | LDL-C measured with Test 1 method/merany referencnou metodou | | Test 1 or „Ref Std“ (metric) | Test 2 (metric) | | |
| Author, rok publikácie, štát | Jazyk | ohlasy | n | Priemer (rozpätie), mmol/l | | | | Populácia | Test 1 (referencná metóda) | Test 2 (porovnávaná metóda) | Výsledky | |
| Bairaktari 2004, (62), Greece | english | 7 | 86 | 4,97 | 2,07 | 0,94 | 2,77 | Patients undergoing hemodialysis | BQ | F | Mean bias (SD) 0,18 (0,34) mmol/l | |
| | | | | | | | | | Patients undergoing hemodialysis | BQ | Planella | Mean bias (SD) -0,11 (0,28) mmol/l |
| | | | | | | | | | | BQ | Hattori | Mean bias (SD) 0,10 (0,33) mmol/l |
| Tremblay 2004, (63), Canada | english | 31 | 2034 | 0,94 | 0,94 (0,03-1,26) | 4,64 | 4,64 | Patients from Lipid Clinic, 1st quartile according TG levels | BQ | F | %Bias (SD) -2,8 (4,1) | |
| | | | | | | | | | Patients from Lipid Clinic, 2nd quartile according TG levels | BQ | F | %Bias (SD) -3,0 (5,3) |
| | | | | | | | | | | Patients from Lipid Clinic, 3th quartile according TG levels | BQ | F |
| | | | | | | | | | Patients from Lipid Clinic, 4th quartile according TG levels | | BQ | F |
| Wagner 2003, (64), Spain | english | 8 | 64* | 5,15 | 1,26 (0,46-5,12) | 1,1 (0,64-2,08) | 3,46 | Consecutive type 2 diabetic patients | BQ | Direct LDL-c Plus Roche | mean bias (range) -8,5% (-22%, 7%) | |
| | | | | | | | | | Consecutive type 2 diabetic patients | BQ | F | mean bias (range) -3,1% (-20%, 12%) |
| | | | | | | | | | | Consecutive type 2 diabetic patients | BQ | Wagner formula |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------|---------|----|-----|--|--|--|--|--|----|----------------|--|---------------------|------------------------|-----------------------------|------------------------|
| Miller 2002, (46), USA | english | 34 | 100 | | | | | ambulatory patients, incl. different dysli- poproteinemias | BQ | Direct Daiichi | mean bias, % (95% CI) | -1,4 (-2,7 to 0) | | | |
| | | | | | | | | | | | Total error as percentage of indivi- dual biases >12% | 8,0 | | | |
| | | | | | | | | | | | ambulatory patients, incl. different dysli- poproteinemias | BQ | Direct Denka Seiken | mean bias, % (95% CI) | -3,5 (-5,0 to -2,1) |
| | | | | | | | | | | | Total error as percentage of indivi- dual biases >12% | 11,0 | | | |
| | | | | | | | | | | | ambulatory patients, incl. different dysli- poproteinemias | BQ | Direct Kyowa | mean bias, % (95% CI) | 2,8 (-3,4 to 8,9) |
| | | | | | | | | | | | Total error as percentage of indivi- dual biases >12% | 10,0 | | | |
| | | | | | | | | | | | ambulatory patients, incl. different dysli- poproteinemias | BQ | Direct Wako | mean bias, % (95% CI) | 14 (9,6 to 18) |
| | | | | | | | | | | | Total error as percentage of indivi- dual biases >12% | 30,0 | | | |

| Author, year, country | Language | SCOPUS | N | Mean (range), mmol/l | | | | Population | Tests | | Results |
|-------------------------------|----------|--------|----|----------------------------|----|-------|--|--|------------------------------|-----------------------------|--|
| | | | | TC | TG | HDL-C | LDL-C measured with Test 1 method/meraný referenčnou metódou | | Test 1 or „Ref Std“ (metric) | Test 2 (metric) | |
| Author, rok publikácie, štát | Jazyk | ohlasy | n | Priemer (rozpätie), mmol/l | | | | Populácia | Test 1 (referenčná metóda) | Test 2 (porovnávaná metóda) | Výsledky |
| Bairaktari 2001, (65), Greece | english | 23 | 54 | < 2,26 | | | 2,63 | Patients on hemodialysis, with TG below 2,26 mmol/l | UC | F | Bias, mean (SD) 0,11 (0,22) mmol/l |
| | | | 54 | < 2,26 | | | 2,63 | Patients on hemodialysis, with TG below 2,26 mmol/l | UC | Direct homogeneous Genzyme | Bias, mean (SD) -0,01 (0,25) mmol/l |
| | | | 54 | < 2,26 | | | 2,63 | Patients on hemodialysis, with TG below 2,26 mmol/l | UC | Planella | Bias, mean (SD) -0,14 (0,27) mmol/l |
| | | | 38 | 2,26-4,52 | | | 2,77 | Patients on hemodialysis, with TG between 2,26 and 4,52 mmol/l | UC | F | Bias, mean (SD) 0,39 (0,41) mmol/l |
| | | | 38 | 2,26-4,52 | | | 2,77 | Patients on hemodialysis, with TG between 2,26 and 4,52 mmol/l | UC | Direct homogeneous Genzyme | Bias, mean (SD) 0,20 (0,30) mmol/l |
| | | | 38 | 2,26-4,52 | | | 2,77 | Patients on hemodialysis, with TG between 2,26 and 4,52 mmol/l | UC | Planella | Bias, mean (SD) -0,07 (0,32) mmol/l |
| | | | 6 | >4,52 | | | 2,8 | Patients on hemodialysis, with TG over 4,52 mmol/l | UC | Direct homogeneous Genzyme | Bias, mean (SD) 0,19 (0,27) mmol/l |
| | | | 6 | >4,52 | | | 2,8 | Patients on hemodialysis, with TG over 4,52 mmol/l | UC | Planella | Bias, mean (SD) 0,13 (0,16) mmol/l |

| | | | | | | | | | | | | | |
|--|---------|----|------|----------------------|----------------------|----------------------|------------------|--|--|--------------|-----------------|---|----------------------|
| Chotkowska 2001, (38), Poland | polish | 2 | 2161 | | | | | 3,98 | Consecutive patients + healthy, all | BQ | F | mean of difference, mmol/l (95%CI) | 0,07 (0,06, 0,08) |
| | | | | < 4,5 | < 4,5 | | | 2,95 | Consecutive patients + healthy, normolipi- demia, n=522 | BQ | F | mean of difference, mmol/l (95%CI) | 0,12 (0,10, 0,13) |
| | | | | < 5,2 | < 4,5 | | | 4,31 | Consecutive patients + healthy, hyperlipide- mia, n=1639 | BQ | F | mean of difference, mmol/l (95%CI) | 0,05 (0,04, 0,06) |
| Scharnagl 2001, (66), Germany | english | 45 | 176 | 4,89 (2,12- 9,73) | 1,64(0,16- 4,52) | 1,33 (0,67- 2,01) | 3,07 (0,83-6,97) | Patients before and after apheresis | BQ | F | Bias (%) | -8,3 | |
| | | | | | | | 1,58 (0,83-2,24) | Patients before and after apheresis, quin- tiles 1+2 | BQ | F | Bias (%) | -18,5 | |
| | | | | | | | 2,40 (1,68-3,43) | Patients before and after apheresis, quin- tiles 2+3 | BQ | F | Bias (%) | -14,5 | |
| | | | | | | | 3,49 (2,22-4,49) | Patients before and after apheresis, quin- tiles 3+4 | BQ | F | Bias (%) | -7,3 | |
| | | | | | | | 4,67 (3,51-6,97) | Patients before and after apheresis, quin- tiles 4+5 | BQ | F | Bias (%) | -3,8 | |
| | | | | | | | | Outpatients from the lipid clinic | BQ | Direct Roche | bias, % (SD) | -6,6 (9,5) | |
| Esteban- Salán 2000, (52), Spain | english | 29 | 167 | | | | | Outpatients from the lipid clinic | BQ | Direct Wako | bias, % (SD) | -0,4 (6,7) | |
| | | | | | | | 3,43 | Outpatients from the lipid clinic, normolipi- demia | BQ | Direct Roche | bias, % (SD) | -5,6 (6,1) | |
| | | | | 5 | 1,18 (0,35- 2,24) | 1,27 | 5,44 | Outpatients from the lipid clinic, Type IIa HPL | BQ | Direct Roche | bias, % (SD) | -2,0 (4,7) | |
| | | | | 7,36 | 1,27 (0,57- 2,24) | 1,42 | 4,3 | Outpatients from the lipid clinic, Type IIb HPL | BQ | Direct Roche | bias, % (SD) | -7,9 (9,6) | |
| | | | | | | | 2,93 | Outpatients from the lipid clinic, Type IV HPL | BQ | Direct Roche | bias, % (SD) | -14,3 (18,3) | |
| | | | | | | | | | | | | | |

| Author, year, country | Language | SCO-PUS | Mean (range), mmol/l | | | | Population | Tests | | Results | |
|-------------------------------|----------|---------|----------------------------|------|-------|--|---|---|-----------------------------|--|---|
| | | | TC | TG | HDL-C | LDL-C measured with Test 1 method/meraný referenčnou metódou | | Test 1 or „Ref Std“ (metric) | Test 2 (metric) | | Analysis |
| Author, rok publikácie, štát | Jazyk | ohlasy | Priemer (rozpätie), mmol/l | | | | Populácia | Test 1 (referenčná metóda) | Test 2 (porovnávaná metóda) | Výsledky | |
| | | | 39 | | | | 3,18 | Outpatients from the lipid clinic, normolipidemia | BQ | Direct Wako | bias, % (SD) 0,1 (6,6) |
| | | | 33 | | | | 5,3 | Outpatients from the lipid clinic, Type IIa HPL | BQ | Direct Wako | bias, % (SD) -3,7 (4,7) |
| | | | 38 | | | | 4,6 | Outpatients from the lipid clinic, Type IIb HPL | BQ | Direct Wako | bias, % (SD) -2,7 (11,7) |
| | | | 35 | | | | 2,98 | Outpatients from the lipid clinic, Type IV HPL | BQ | Direct Wako | bias, % (SD) -0,7 (13,4) |
| Bairaktari 2000, (67), Greece | english | 22 | 5,09 | 2,06 | 0,99 | 2,88 | Not specified | BQ | F | Bias, mmol/l, absolute (%) 0,35 mmol/l, 12,3% | |
| Benlian 2000, (21), France | english | 17 | 130 | 5,09 | 2,06 | 0,99 | 2,88 | Not specified | BQ | Planella | Bias, mmol/l, absolute (%) -0,13 mmol/l, -3,3% |
| | | | 275 | | | | 4,03 | Patients, not specified, with TG below 1,69 mmol/l | UC | agarose gel elfo SEBIA | bias, % (SD) 0,93 (11,6) |
| | | | 275 | | | | 4,03 | Patients, not specified, with TG below 1,69 mmol/l | UC | F | bias, % (SD) -5,04 (12,9) |
| | | | 136 | | | | 4,5 | Patients, not specified, with TG between 1,69 and 4,50 mmol/l | UC | agarose gel elfo SEBIA | bias, % (SD) 5,97 (11,1) |
| | | | 136 | | | 4,5 | Patients, not specified, with TG between 1,69 and 4,50 mmol/l | UC | F | bias, % (SD) -10,11 (9,5) | |

| | | | | | | | | | | |
|---|----|-----|------|--------------|------|------|----|----------------|---------------|--------------|
| Gómez 2000, (68), Spain | 7 | 44 | 5,52 | 1,46 | 1,29 | 3,9 | UC | Direct Randox | mean of diff. | -0,92 mmol/l |
| Nauck 2000, (69), Germany (+ 5 different countries) | 11 | 313 | | | | 3,51 | UC | Direct Roche | bias | -0,16 mmol/l |
| | | 313 | 3,97 | 1,22 | 1,22 | 2,12 | UC | Direct Randox | mean of diff. | -0,03 mmol/l |
| Nauck 2000, (47), USA+ Germany | 21 | 115 | | (0,21-4,56) | | 3,62 | UC | Direct Roche | bias | -0,37 mmol/l |
| | | 115 | | (0,21-4,56) | | 3,62 | UC | Direct Genzyme | bias | -0,21 mmol/l |
| | | 115 | | (0,21-4,56) | | 3,62 | UC | F | bias | -0,12 mmol/l |
| | | 19 | | (4,56-14,01) | | 2,85 | UC | Direct Roche | bias | -0,29 mmol/l |
| | | 19 | | (4,56-14,01) | | 2,85 | UC | Direct Genzyme | bias | 0,03 mmol/l |
| Wagner 2000, (70), Spain | 18 | 95 | | < 4,5 | | 3,76 | BQ | F | mean bias | -0,17 mmol/l |
| | | | | < 4,5 | | 3,76 | BQ | Wagner formula | mean bias | 0,02 mmol/l |

F* - Friedewald formula

Niemi* - regresné priamky sú iba časťou porovnaní, podstatou porovnaní sú špeciálne matematické postupy

Evans* - podstatu štatistiky zhody popisuje originálna práca

Wagner* - 2 vzorky zo 64 mali TG nad 4,5 mmol/l

Tabuľka 3. Porovnanie priamych metód 3. generácie s nepriamymi metódami. Podrobnejšie charakteristiky použitých priamych metód sú uvedené v citovaných publikáciách.

| Author, year, country | Language | SCOPUS citations | N | Mean (range), mmol/l | | | | Population | Tests | | Analysis | Results |
|-----------------------------|----------|------------------|------|----------------------------|-----------------|-------|--|--|--------------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------|
| | | | | TC | TG | HDL-C | LDL-C measured with Test 1 method/meraný referenčnou metódou | | Test 1 or „Ref Std“ (metric) | Test 2 (metric) | | |
| Autor, rok publikácie, štát | Jazyk | ohlasy | n | Priemer (rozpätie), mmol/l | | | | Populácia | Test 1 (referenčná metóda) | Test 2 (porovnávaná metóda) | Analýza - metóda | Výsledky |
| Otokozawa 2010 (71), USA | english | 0 | 1335 | 5,17 | 1,32(0,93-1,86) | 1,17 | 3,37 | participants in the Framingham Offspring Study, men, non-CHD | Direct Kyowa | F | Bias | -0,05 mmol/l |
| | | | 173 | 4,81 | 1,42(1,04-2,09) | 1,05 | 3,07 | participants in the Framingham Offspring Study, men, CHD | Direct Kyowa | F | Bias | -0,08 mmol/l |
| | | | 1606 | 5,48 | 1,24(0,87-1,83) | 1,48 | 3,42 | participants in the Framingham Offspring Study, women, non-CHD | Direct Kyowa | F | Bias | -0,11 mmol/l |
| | | | 74 | 5,58 | 1,52(1,06-2,04) | 1,35 | 3,46 | participants in the Framingham Offspring Study, women, CHD | Direct Kyowa | F | Bias | -0,13 mmol/l |
| Tanno 2010, (72), Japan | english | 0 | 3270 | | | | | apparently healthy subject aged 40 to 79 years | Direct Kyowa | F | r | 0,971 |
| Batal 2010, (73), Turkey | english | 0 | 193 | 4,71(2,25-8,15) | 1,78(0,48-4,37) | | 2,79(1,00-5,40) | renal transplant recipients | Direct Roche | F | mean percentage difference | -0,18 (-0,20, -0,13) |
| Baruch 2010 (745), USA | english | 0 | 67 | 5,59 | 1,46 | 1,27 | 3,85 | Not specified, Initiation study | Siemens Advia Chemistry System | F | Bias | -0,20 mmol/l |
| | | | 79 | 4,47 | 1,52 | 1,19 | 2,69 | Not specified, Maintenance study | Siemens Advia Chemistry System | F | Bias | -0,05 mmol/l |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------------|---------|---|--------|---------------|------|------------------|------|------------------|---|---|--------------|----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| Chen 2010 (75), China | english | 0 | 1220 | (nd-2,25) | 5,79 | 1,88 | 1,31 | 3,9 | Adult outpatients, ages > 18 years, TG < 2,25 mmol/l | Direct Roche | F | B-A, Cor-relation plot | only graphical presentation | |
| | | | 480 | | | | | | (2,26-4,50) | Adult outpatients, ages > 18 years, TG 2,26-4,50 mmol/l | Direct Roche | F | B-A, Cor-relation plot | only graphical presentation |
| | | | 480 | | | | | | (4,50-11,25) | Adult outpatients, ages > 18 years, TG 4,50-11,25 mmol/l | Direct Roche | F | B-A, Cor-relation plot | only graphical presentation |
| Vujovic 2010, (76), Serbia | english | 0 | 1010 | 1,88 | 5,79 | 1,88 | 1,31 | 3,9 | patients underwent routine lipid status estimation | Direct ROCHE | F | mean percentage difference | -6,9% | |
| | | | 1043 | | | | | | 1,71 | patients underwent routine lipid status estimation | Direct ROCHE | F | mean percentage difference | -6,1% |
| Can 2009, (77), Turkey | english | 0 | 320 | 1,53(nd-4,52) | 6,13 | 2,35 | 1,4 | 2,35 | Sequential different patients, LDL-C below 2,56 mmol/l | Direct Roche | F | Bias | -0,42 mmol/l | |
| | | | 277 | | | | | | 3,44 | Sequential different patients, LDL-C between 2,56 and 3,36 mmol/l | Direct Roche | F | Bias | -0,49 mmol/l |
| | | | 264 | | | | | | 4,18 | Sequential different patients, LDL-C between 3,36 and 4,11 mmol/l | Direct Roche | F | Bias | -0,35 mmol/l |
| | | | 106 | | | | | | 4,92 | Sequential different patients, LDL-C between 4,14 and 4,89 mmol/l | Direct Roche | F | Bias | -0,38 mmol/l |
| | | | 34 | | | | | | 5,9 | Sequential different patients, LDL-C more than 4,92 mmol/l | Direct Roche | F | Bias | -0,49 mmol/l |
| Mora 2009, (23), USA | english | 1 | 27 331 | 1,53(nd-4,52) | 5,46 | 3,22(R), 3,36(F) | 1,4 | 3,22(R), 3,36(F) | Apparently healthy women, age 45 years+, fasting + nonfasting | Direct Roche | F | Bias | -0,14 mmol/l | |
| | | | 19 777 | | | | | | 3,26(D), 3,40(F) | Apparently healthy women, age 45 years+, fasting | Direct Roche | F | B-A LOA (95%CI) | -0,146(-0,149, -0,143) mmol/l |
| | | | 16 840 | | | | | | < 2,26 | Apparently healthy women, age 45 years+, fasting | Direct Roche | F | Bias | -0,16 mmol/l |

| Author, year, country | Language | SCOPUS citations | N | Mean (range), mmol/l | | | | Population | Tests | | Analysis | Results |
|-------------------------------|----------|------------------|-----|----------------------|-----------------|-------|---|---|--------------------------------|-----------------|---|----------------------|
| | | | | TC | TG | HDL-C | LDL-C measured with Test 1 method/merací referenčný metodou | | Test 1 or „Ref Std“ (metric) | Test 2 (metric) | | |
| Puavilai 2009, (78), Thailand | english | 0 | 84 | | <3,38 | | | last meal before 8 - 12 h | Direct (without specification) | F | Calculated LDL differences from Direct to 0,28 mmol/l | 34,4% of 84 samples |
| Yamashita 2009, (99), Japan | english | 0 | 161 | nd | < 4,52 | nd | nd | General hospital | Direct (without specification) | F | Calculated LDL differences from Direct to 0,28 mmol/l | 31,7% of 454 samples |
| | | | | | | | | | F | B-A LOA (SD) | -0,03 (0,21) mmol/l | |
| Ahmadi 2008, (79), Iran | english | 1 | 115 | 6,89 | 0,88(0,02-1,13) | 1,44 | 4,68 | adult hypercholesterolemic outpatients, TG below 1,13 mmol/l | F | Kyowa Medex | B-A LOA (SD) | -0,07 (0,13) mmol/l |
| | | | | | | | | | F | Denka Seiken | B-A LOA (SD) | -0,03 (0,26) mmol/l |
| | | | | | | | | | F | Wako | B-A LOA (SD) | -0,12 (0,21) mmol/l |
| Ahmadi 2008, (79), Iran | english | 1 | 115 | 7,55 | 2,57(1,69-3,95) | 1,34 | 5,07 | adult hypercholesterolemic outpatients, TG between 1,69 and 3,95 mmol/l | Direct (without specification) | F | Bias | 0,32 mmol/l |
| | | | | | | | | | Direct (without specification) | F | Bias | -0,04 mmol/l |

| | | | | | | | | | | | | |
|--|---------|---|--------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|--|----------------------------------|---|--------------------|---------------------|
| Aral 2008, (80), Turkiye | turkish | 0 | 319 | 4,8 | 0,4-1,68 | 1,2 | 3,28 | In-patients, excluded HIV infection, chronic renal failure, chronic hepatitis, with TG below 1,68 | Direct enzymatic (Olympus) | F | %Bias (SD) | -6 (5) |
| | | | 122 | 5,47 | 1,68-2,25 | 1,11 | 3,86 | In-patients, excluded HIV infection, chronic renal failure, chronic hepatitis, with TG between 1,68 and 2,25 | Direct enzymatic (Olympus) | F | %Bias (SD) | -12 (7) |
| | | | 127 | 5,83 | 2,25-4,50 | 1,01 | 4,11 | In-patients, excluded HIV infection, chronic renal failure, chronic hepatitis, with TG above 2,25 | Direct enzymatic (Olympus) | F | %Bias (SD) | -17 (8) |
| Jun 2008, (81), Korea | english | 3 | 38 243 | 4,93(1,87-10,71) | 1,40(0,14-4,51) | 1,41(0,16-4,05) | 3,16(0,57-8,44) | Consecutive patients* | Direct (Kyowa) | F | %Bias (min, max) | -9,1 (-91,8, 146,7) |
| Rungtanapirom, 2008, (82), Thailand | english | 0 | 9 285* | 5,39(1,32-14,82) | 1,40(0,12-12,9)* | 1,58(0,21-3,78) | 3,64(0,31-9,54) | Consecutive patients | Direct Kyowa | F | mean of diff. (SD) | 13,4 (8,8) % |
| Vohnout 2008, (83), Slovakia | english | 0 | 93 | 5,97 | 1,31(nd-4,5) | 1,43 | | Cross-sectional screening for CVD risk factors, all | Direct Randox | F | %Bias | 7,6 |
| | | | | | | | | Cross-sectional screening for CVD risk factors, TG below 1,7 mmol/l, n=77 | Direct Randox | F | %Bias | 7,2 |
| | | | | | | | | Cross-sectional screening for CVD risk factors, TG between 1,7 and 4,5 mmol/l, n=16 | Direct Randox | F | %Bias | 9,5 |
| Gaško, 2007, (84), Brazil* | english | 1 | 10 324 | | | | 2,99 | Consecutive patients | Direct Wako | F | mean of diff. (SD) | -0,10 (0,41) |
| Krittayaphong 2006, (85), Thailand | english | 0 | 191 | 5,17 | 0,98 | 1,6 | 3,01 | Consecutive apparently healthy | Direct enzymatic (not specified) | F | mean of diff. | 0,11 mmol/l |
| Srivastava 2006, (86), India | english | 1 | 60 | 4,59 | 1,71 | 1,2 | 3 | Patients with TG below 4,5 mmol/l | Direct LDL-C Roche | F | mean bias | -16,79% |
| Wongtiraporn 2006, (87), Thailand | english | 1 | 764 | 5,29(1,86-9,90) | 1,48(0,20-4,48) | 1,38(0,23-3,15) | 3,77(0,85-7,63) | Randomly selected individuals with TG below 4,50 mmol/l, dataset 1 | Direct (without specification) | F | mean of diff. | -0,54 mmol/l |
| | | | 800 | 5,22(1,16-9,46) | 1,48(0,36-4,48) | 1,33(0,16-3,00) | 3,49(0,83-7,60) | Randomly selected individuals with TG below 4,50 mmol/l, dataset 2 | Direct (without specification) | F | mean of diff. | -0,28 mmol/l |

| Author, year, country | Language | SCOPUS citations | N | Mean (range), mmol/l | | | | Population | Tests | | Analysis | Results |
|--------------------------------|----------|------------------|-----|----------------------|-----------------|-----------------|---|---|---------------------------------------|-----------------|--------------------|---------------------|
| | | | | TC | TG | HDL-C | LDL-C measured with Test 1 method/merací referenční metodou | | Test 1 or „Ref Std“ (metric) | Test 2 (metric) | | |
| Charuruks 2005, (88), Thailand | english | 1 | 109 | 5,60(2,07-11,46) | 1,35(0,42-2,19) | 1,37(0,26-2,56) | 3,70(0,49-9,31) | Randomly blood samples, TG below 2,25 mmol/l | Direct homogeneous LD-L-C plus, Roche | F | mean absolute bias | -4,70% |
| Sahu 2005, (89), India | english | 2 | 30 | 6,82(3,03-12,05) | 3,20(2,36-4,46) | 1,26(0,75-2,25) | 4,18(0,13-7,78) | Randomly blood samples, TG between 2,25 and 4,49 mmol/l | Direct homogeneous LD-L-C plus, Roche | F | mean absolute bias | -11,73% |
| | | | 204 | | | | 2,2 | Routine blood samples, TG below 1,13 mmol/l | Direct Daiichi | F | mean of diff. (SD) | 0,20 (0,46) mmol/l |
| | | | 478 | | | | 2,61 | Routine blood samples, TG between 1,14 and 2,25 mmol/l | Direct Daiichi | F | mean of diff. (SD) | 0,15 (0,71) mmol/l |
| Amayo 2004, (90), Kenya | english | 2 | 163 | | | | 3,06 | Routine blood samples, TG between 2,26 and 3,38 mmol/l | Direct Daiichi | F | mean of diff. (SD) | 0,08 (0,47) mmol/l |
| | | | 34 | | | | 2,91 | Routine blood samples, TG between 3,39 and 4,5 mmol/l | Direct Daiichi | F | mean of diff. (SD) | -0,02 (0,51) mmol/l |
| | | | 152 | 4,9 | 1,28 | 1,28 | 2,97 | normolipidaemia | Direct Abbott | F | mean of diff. (SD) | 0,03 (0,371) |
| | | | 32 | 6,9 | 1,63 | 1,4 | 4,4 | Patients with Type IIa HLP | Direct Abbott | F | mean of diff. (SD) | 0,38 (0,62) |
| | | | 15 | 5,2 | 3,23 | 1,04 | 2,86 | Patients with Type IIb HLP | Direct Abbott | F | mean of diff. (SD) | 0,20 (0,310) |
| | | | 12 | 6,8 | 3,46 | 1,22 | 4,28 | Patients with Type IV HLP | Direct Abbott | F | mean of diff. (SD) | 0,34 (0,526) |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------------|------------------|-------|-----------------|------------------|------------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|---|--------------|--------------------------|-----------------------------|---------------------|--|-------------|---|--------------------------|-----------------|---|-------------|---|--------------------------|-----------------|
| de Cordova 2004, (91), Brazil | english | 12 | 520 | 5,46(1,89-11,69) | 0,22-1,68 | 1,32(0,31-2,66) | 3,26(0,62-7,93) | Consecutive patients, with TG below 1,68 | Direct Wako | F | mean of diff. | 0,36 mmol/l | | | | | | | | | | |
| | | | 897 | 6,05(2,74-12,28) | 1,68-2,25 | 1,19(0,47-2,66) | 3,78(1,01-8,30) | Consecutive patients, with TG between 1,68 and 2,25 | Direct Wako | F | mean of diff. | 0,18 mmol/l | | | | | | | | | | |
| | | | 458 | 6,23(3,36-11,77) | 2,25-3,37 | 1,03(0,49-2,66) | 3,93(1,45-8,59) | Consecutive patients, with TG between 2,25 and 3,37 | Direct Wako | F | mean of diff. | -0,05 mmol/l | | | | | | | | | | |
| | | | 48 | 6,44(2,25-10,16) | 3,38-4,50 | 1,01(0,36-2,04) | 4,06(1,03-7,73) | Consecutive patients, with TG between 3,37 and 4,50 | Direct Wako | F | mean of diff. | -0,41 mmol/l | | | | | | | | | | |
| Désidéri-Vaillant 2004, (92), France | french | 0 | 100 | | | | | | Direct Roche | F | r | 0,97 | | | | | | | | | | |
| | | | 19 343 | 6,05(2,74-12,28) | 1,68-2,25 | 1,19(0,47-2,66) | 3,78(1,01-8,30) | Patients from institution's database | Direct Wako | F | r; absolute difference (SD) | 0,94; -0,50 (0,31) | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | 9 057 | 3,93(1,45-8,59) | Patients from institution's database, TG below 1,13 mmol/l | Direct Wako | F | absolute difference (SD) | -0,32 (0,18) | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | 3 068 | 4,06(1,03-7,73) | Patients from institution's database, TG between 1,14 and 2,27 mmol/l | Direct Wako | F | absolute difference (SD) | -0,48 (0,22) |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 018 | 4,06(1,03-7,73) |
| 900 | 6,44(2,25-10,16) | <2,25 | 1,01(0,36-2,04) | 4,06(1,03-7,73) | Random healthy screened population | Direct (without specification) | F | absolute difference (SD) | -1,12 (0,27) | | | | | | | | | | | | | |
| Puavilai 2004, (94), Thailand | english | 7 | 900 | <2,25 | 1,01(0,36-2,04) | 4,06(1,03-7,73) | Random healthy screened population | Direct (without specification) | F | absolute difference (SD) | -1,12 (0,27) | 5,9% of 900 samples | | | | | | | | | | |

| Author, year, country | Language | SCOPUS citations | N | Mean (range), mmol/l | | | | Population | Tests | | Analysis | Results |
|------------------------------|----------|------------------|-----|----------------------------|-----------|-------|--|---|--------------------------------|-----------------------------|---|----------------------|
| | | | | TC | TG | HDL-C | LDL-C measured with Test 1 method/merací referenčnou metódou | | Test 1 or „Ref Std“ (metric) | Test 2 (metric) | | |
| Author, rok publikácie, štát | Jazyk | ohlasy | n | Priemer (rozpätie), mmol/l | TG | HDL-C | LDL-C measured with Test 1 method/merací referenčnou metódou | Populácia | Test 1 (referenčná metóda) | Test 2 (porovnávaná metóda) | Analýza - metóda | Výsledky |
| Hur 2003, (95), Korea | korean | 0 | 119 | | 2,26-3,36 | | | Random healthy screened population | Direct (without specification) | F | Calculated LDL differences from Direct to 0,28 mmol/l | 27,7% of 119 samples |
| | | | 692 | | | | | | Direct Randox | F | mean of diff. | 0,06 mmol/l |
| Faas 2002, (96), USA | english | 0 | 199 | | | | | Patients with TG between 1,69 and 2,24 mmol/l | Direct Randox | F | mean of diff. | -0,09 mmol/l |
| | | | 464 | | | | | | Direct Sigma Diagnostics | F | r | 0,86 |
| Jensen 2002, (97), Denmark | english | 7 | 82 | 5,4 | | 1,58 | 3,3 | nondiabetic patients | Direct Boehringer | F | mean of diff. | 0,02 mmol/l |
| | | | 55 | | | | | | Direct Boehringer | F | mean of diff. | 0,05 mmol/l |
| | | | 70 | | | | | | Direct Boehringer | F | mean of diff. | 0,03 mmol/l |

| | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|---------|---|------|------|-----------------------------|------------------|---|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Nakanishi 2000, (98), Japan | english | 6 | 1953 | 3,08 | healthy male office workers | Direct N-geneous | F | mean of difference, (SD) | 0,04 (0,24) mmol/l | | |
| | | | 1953 | | | | | | TG/4* | mean of difference, (SD) | 0,13 (0,27) mmol/l |
| | | | 1953 | | | | | | TG/4,5 | mean of difference, (SD) | 0,04 (0,25) mmol/l |
| | | | 1953 | | | | | | TG/5,5 | mean of difference, (SD) | 0,10 (0,25) mmol/l |
| | | | 1953 | | | | | | TG/6 | mean of difference, (SD) | 0,15 (0,25) mmol/l |
| | | | 1953 | | | | | | TG/7 | mean of difference, (SD) | 0,22 (0,27) mmol/l |
| | | | 1953 | | | | | | TG/8 | mean of difference, (SD) | 0,28 (0,29) mmol/l |

Yamashita* - B-A - Bland-Altman

Yamashita* - AD - average difference, priemerný rozdiel v Bland-Altmanovom rozdielovom grafe

Jun* - v originálnej práci je podrobnejší rozbor podskupín

Rungtaniapirom* - 255 pacientov, t.j 2,75 %, malo TAG nad 4,5 mmol/l

Gaško* - v práci je podrobnejší rozbor 25 podskupín z 10 000 členov zo súboru de Cordova, 2004

Tabuľka 4. Porovnanie nepriamych metód navzájom

| Author, year, country | Language | SCOPUS | N | Mean (range), mmol/l | TG | HDL-C | LDL-C measured with Test 1 method/merací referenčný metódou | Population | Tests | Analysis | Results |
|-----------------------------|----------|--------|-----|----------------------------|------|-------|---|--|-------|------------------|--------------|
| Gazi 2007, (100), Greece | english | 3 | 118 | Priemer (rozpätie), mmol/l | | | 3,8 | Patients with metabolic syndrome | F | Analýza - metóda | Výsledky |
| | | | 112 | | | | 3,64 | | | | |
| Gásko 2007, (108), Slovakia | english | 0 | 10 | | | | 3,08 | Patients without metabolic syndrome, control group | F | | |
| | | | 102 | | | | | | | | |
| Gazi 2006, (101), Greece | english | 8 | 105 | 6,15 | 2,21 | 1,27 | 3,85 | Consecutive patients with different diseases, from mixed rural and urban Brazil population and urban Brazil population | F | Planella | 11 (-13, 33) |
| | | | 105 | | | | | | | | |
| | | | 105 | 6,15 | 2,21 | 1,27 | 3,85 | Outpatients from Lipid Clinic with Metabolic Syndrome | F | Hattori | 6 (6, 7) |
| | | | 105 | | | | | | | | |
| | | | 105 | 6,15 | 2,21 | 1,27 | 3,85 | Outpatients from Lipid Clinic with Metabolic Syndrome | F | AMORIS | -3 (-31, 35) |

| Author, year, country | Language | SCOPUS | N | Mean (range), mmol/l | TC | TG | HDL-C | LDL-C measured with Test 1 method/merací referenčnou metódou | Population | Tests | Test 2 (metric) | Analysis | Results |
|-------------------------------|----------|--------|------|----------------------------|------|------|-------|--|--|----------------------------|-----------------------------|------------------|----------------|
| Author, rok publikácie, štát | Jazyk | ohlasy | n | Priemer (rozpätie), mmol/l | | | | | Populácia | Test 1 (referenčná metóda) | Test 2 (porovnávaná metóda) | Analyza - metóda | Výsledky |
| | | | 105 | 6,15 | 2,21 | 1,27 | 3,85 | 3,85 | Outpatients from Lipid Clinic with Metabolic Syndrome | F | Wagner | %Bias (range) | 4 (-25, 33) |
| | | | 74 | 5,64 | 1,27 | 1,47 | 3,57 | 3,57 | Outpatients from Lipid Clinic without Metabolic Syndrome | F | Planella | %Bias (range) | 9 (-5, 18) |
| | | | 74 | 5,64 | 1,27 | 1,47 | 3,57 | 3,57 | Outpatients from Lipid Clinic without Metabolic Syndrome | F | Hattori | %Bias (range) | 6 (6, 7) |
| | | | 74 | 5,64 | 1,27 | 1,47 | 3,57 | 3,57 | Outpatients from Lipid Clinic without Metabolic Syndrome | F | AMORIS | %Bias (range) | 6 (-26, 20) |
| | | | 74 | 5,64 | 1,27 | 1,47 | 3,57 | 3,57 | Outpatients from Lipid Clinic without Metabolic Syndrome | F | Wagner | %Bias (range) | 3 (-16, 11) |
| Bairaktari 2000, (67), Greece | english | 22 | 1010 | 6,59 | 1,87 | 1,2 | 4,55 | 4,55 | Patients from Lipid Clinic | F | Planella | Bias, mmol/l | -0,30 mmol/l |

Tabuľka 5. Porovnanie niektorých z metód uvedených v tabuľkách 2 až 4 s raritnými metódami.

| Author, year, country | Language | SCOPUS | N | Mean (range), mmol/l | | | | Population | Tests | Analysis | Results |
|---|----------|--------|-------|----------------------------|------------------|------------------|---|-------------------------|------------------------------|-----------------------------|---------------|
| | | | | TC | TG | HDL-C | LDL-C measured with Test 1 method/merany referenčnou metódou | | | | |
| Chen 2010 (75), China | english | 0 | 1220 | Priemer (rozpätie), mmol/l | (nd-2,25) | | Adult outpatients, ages > 18 years, TG < 2,25 mmol/l | Direct Roche | B-A, Correlation plot | only graphical presentation | |
| | | | 480 | | (2,26-4,50) | | Adult outpatients, ages > 18 years, TG 2,26-4,50 mmol/l | Direct Roche | B-A, Correlation plot | only graphical presentation | |
| | | | 480 | | (4,50-11,25) | | Adult outpatients, ages > 18 years, TG 4,50-11,25 mmol/l | Direct Roche | B-A, Correlation plot | only graphical presentation | |
| Balal 2010, (73), Turkey | english | 0 | 193 | 4,71 (2,25-8,15) | 1,78 (0,48-4,37) | 2,79 (1,00-5,40) | renal transplant recipients | Direct Roche | Modified F* | mean percentage difference | 0 (-67, 0,41) |
| Vujovic 2010, (76), Serbia | english | 0 | 1010 | 5,79 | 1,88 | 3,9 | patients underwent routine lipid status estimation | Direct ROCHE | A | mean percentage difference | -3,90% |
| | | | 1043 | 6,13 | 1,71 | 4,29 | patients underwent routine lipid status estimation | Direct ROCHE | S (TG/3)* | mean percentage difference | -0,90% |
| García-de la Puente 2009, (102), Mexico | spain | 0 | 141 | | | | children with secondary hyperlipidemia | Direct (bez upresnenia) | modifik. F (popis v legende) | r2 | 0,9642 |
| Niemi 2009, (56), Finland | english | 2 | 1 775 | 5,83 (2,14-11,37) | 1,65 (0,12-4,52) | 1,58 (0,34-4,50) | Mixed normolipidemic + dyslipidemic subjects, incl. chronic renal failure | UC | ANN regression models | regression lines*, r | 0,93 |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|----|-----|----------------|----------------|--|------|------|------|------|---|-------------------------|------------------------|---|----------------------|
| Puavilai 2009, (78), Thailand | 0 | 84 | | <3,38 | | 4,96 | 1,69 | 1,25 | 3,13 | last meal before 8-12 h | Direct (bez upresnenia) | Modified F* | Calculated LDL differences from Direct to 0,28 mmol/l | 16,7% of 84 samples |
| | | | | | | | | | | | Direct (bez upresnenia) | Modified F* | Calculated LDL differences from Direct to 0,28 mmol/l | 15,2% of 454 samples |
| Paz 2008, (103), Spain | 2 | 487 | | 1,69 | | 4,96 | 1,69 | 1,25 | 3,13 | Schizophrenic patients treated with antipsychotic drugs | Direct agarose gel elfo | F | mean of diff. | -0,20 mmol/l |
| | | | | | | | | | | | Direct agarose gel elfo | A | mean of diff. | -0,09 mmol/l |
| Kurosawa, 2007, (104), Japan* | 3 | 105 | 6,3 (3,1-38,2) | 7,9 (0,4-41,3) | | 1,4 | | 1,4 | 3,4 | Consecutive outpatients | Direct Daiichi | HPLC | r | 0,823 |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| Gazi 2006, (105), Greece | 8 | 105 | 6,15 | 2,21 | | 1,27 | | 1,27 | 3,85 | Outpatients from Lipid Clinic with Metabolic Syndrome | F | Lipoprint | %Bias (range) | 9 (-47, 37) |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| Srivastava 2006, (86), India | 1 | 60 | 4,59 | 1,71 | | 1,2 | | 1,2 | 3 | Patients with TG below 4,5 mmol/l | Direct LDL-C Roche | Elfo | mean bias | 0,99% |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| Puavilai 2004, (94), Thailand | 7 | 900 | | <2,25 | | | | | 2,64 | Patients with TG below 4,5 mmol/l | F | Elfo | mean bias | -18,38% |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| Benlian 2000, (21), France | 17 | 275 | | 2,26-3,36 | | | | | 4,03 | Patients, not specified, with TG below 1,69 mmol/l | Direct (bez upresnenia) | Modified F* | Calculated LDL differences from Direct to 0,28 mmol/l | 1,0% of 900 samples |
| | | | | | | | | | | | Direct (bez upresnenia) | Modified F* | Calculated LDL differences from Direct to 0,28 mmol/l | 8,3% of 119 samples |
| | | 136 | | | | | | | 4,5 | Patients, not specified, with TG between 1,69 and 4,50 mmol/l | agarose gel elfo SEBIA | agarose gel elfo SEBIA | bias, % (SD) | 0,93 (11,6) |
| | | | | | | | | | | Patients, not specified, with TG between 1,69 and 4,50 mmol/l | UC | UC | bias, % (SD) | 5,97 (11,1) |

| Author, year, country | Language | SCOPUS | N | Mean (range), mmol/l | | | | Population | Tests | Analysis | Results | | | | | | | |
|-----------------------------|----------|--------|------|----------------------------|----|-------|--|-----------------------------|------------------|--------------------------|--------------------|--|--|--|-----------------------------|------------------|--------------------------|--------------------|
| | | | | TC | TG | HDL-C | LDL-C measured with Test 1 method/metric | | | | | | | | | | | |
| Nakanishi 2000, (98), Japan | english | 6 | 1953 | Priemer (rozpätie), mmol/l | | | | healthy male office workers | Direct N-geneous | mean of difference, (SD) | 0,04 (0,24) mmol/l | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | 3,08 | | | | healthy male office workers | Direct N-geneous | mean of difference, (SD) | 0,13 (0,27) mmol/l |
| | | | | | | | | | | | 3,08 | | | | healthy male office workers | Direct N-geneous | mean of difference, (SD) | 0,04 (0,25) mmol/l |
| | | | | | | | | | | | 3,08 | | | | healthy male office workers | Direct N-geneous | mean of difference, (SD) | 0,10 (0,25) mmol/l |
| | | | | | | | | | | | 3,08 | | | | healthy male office workers | Direct N-geneous | mean of difference, (SD) | 0,15 (0,25) mmol/l |
| | | | | | | | | | | | 3,08 | | | | healthy male office workers | Direct N-geneous | mean of difference, (SD) | 0,22 (0,27) mmol/l |
| | | | | | | | | | | | 3,08 | | | | healthy male office workers | Direct N-geneous | mean of difference, (SD) | 0,28 (0,29) mmol/l |
| | | | | | | | | | | | 3,08 | | | | healthy male office workers | Direct N-geneous | mean of difference, (SD) | |

Chen* - modifikovaná FF: LDL-C (mg/dl) = Non-HDL-C x 90% - TG x 10%

Balal* - regresne modifikovaná FF: LDL-C(mg/dl) = 8,018 + (0,99 x FF LDL-C)

Vujovic* - S = Serbian formula, vo Friedewaldovom vzorci je hodnota 2,2 nahradená hodnotou 3

Puavilai 2009*, Puavilai 2004* - modifikovaná FF: LDL-C (mg/dl) = C - HDL-C - 1/6 TG

Kurosawa* - TG aj nad 4,5 mmol/l, vzorky fasting aj nonfasting, bez rozdielu. Nejde o výpočet F, preto táto práca bola zaradená.

Nakanishi* - upravený Friedewaldov vzorec, hodnoty v menovateľi sú pre jednotky mg/l

Citovanosť publikácií v databáze SCOPUS, k termínu 30.6.2010, je dokladom ich serióznosti. Samozrejme, práce z ostatných 1–2 rokov majú zatiaľ nulovú citovanosť.

DISKUSIA

Spôsob porovnávania metód môže byť v princípe dvojaký: 1. Porovnanie rozdielov vo výsledkoch meraných referenčnou a porovnanou metódou = analytický prístup – rozdiel je vyjadrený v absolútnych číslach, v percentách, korelačným koeficientom r , atď. 2. Porovnanie rozdielov v stratifikácii pacientov do jednotlivých liečebných kategórií, podľa rôznych guidelinov, pri výsledkoch meraných referenčnou a porovnanou metódou = viac klinicko-epidemiologický prístup. Každý spôsob má svoje výhody aj nevýhody (106).

Snažili sme sa o zachytenie čo najvýznamnejšej časti šedej literatúry – ku ktorej patria abstrakty prác z konferencií a kongresov, práce publikované v lokálnych časopisoch ktoré nie sú rešeršované v internetových databázach, práce v neanglických jazykoch – pretože aj v týchto prácach sú uvádzané hodnoverné údaje (107). Časť z nich následne nesplnila inklúzne kritériá, avšak ich citovaním v tabuľke 1 ich zverejňujeme na prípadné ďalšie rozbor. V tabuľkách 2 až 4 je zo 68 zdrojových prác 6 v neanglickom jazyku (8,8%). Ďalších 13 prác, z nich 5 v češtine alebo slovenčine, je uvedených v tabuľke 2. Minimálne ďalších 6 prác v neanglickom jazyku nebolo možné posúdiť, pretože sme nezískali ich plné texty. V lokálnych medicínskych databázach z nášho pohľadu exotických (veľkých) štátov Japonsko, Čína, ktoré zhromažďujú údaje o prácach publikovaných v príslušných jazykoch, často bez anglického súhrnu, bolo zachytených ďalších cca 15 prác.

Nie je účelom tohto prehľadu posudzovať výhody a nevýhody priamych neprecipitačných enzymatických metód voči Friedewaldovmu výpočtu. Napriek tomu podotýkame, že náklady na priame stanovenie LDL cholesterolu v ambulantných laboratóriách v ČR v roku 2008 boli 5,44–5,10 % z celkových nákladov laboratórií, čo nie je zanedbateľná položka (109). Pre priame metódy hovorí podstatne nižšia neistota merania. V práci (110) bola vypočítaná neistota priamej metódy 6,9 % oproti neistote 19,4 % pri výpočte podľa Friedewalda. Proti priamym metódam hovorí nedostatočná harmonizácia medzi postupmi, resp. setmi rôznych výrobcov. Dostatočné množstvo prác (35, 44–47, 52) hodnotiacich interassay variabilitu dokladuje, že výsledky namerané rôznymi setmi môžu byť vzájomne odlišné až v rádoch desiatok percent. Friedewaldov výpočet dáva systematicky nižšie hodnoty než priame metódy. Dôsledkom týchto metodických rozdielov je, že epidemiologické práce hodnotiace LDL cholesterol by mali byť prijímané rozpačito. Napríklad, rozsiahla štúdia z údajov od vyše 136 000 hospitalizovaných pacientov z 541 nemocníc hodnotila, okrem iného, aj hladiny LDL cholesterol do 24 hodín po hospitalizácii (111). Hodnoty lipidov,

včítane LDL cholesterolu, boli analyzované v lokálnych laboratóriách týchto nemocníc. Akou metódou – metódami, nie je uvedené. Ako možno serózne interpretovať výsledky porovnávajúce jablká s hruškami? Ku tejto téme viď aj fundované názory uvedené pod nadpisom *Is lowering low-density lipoprotein an effective strategy to reduce cardiac risk? Controversies in cardiovascular medicine* (112, 113).

ZÁVER

Literatúra popisujúca rozdiely v hodnotách LDL cholesterolu získavané rôznymi metódami je v ostatnom desaťročí hojná. Jej výsledky svedčia o nedostatočnej presnosti a správnosti rutinných metód stanovenia, či už nepriamej výpočtom podľa Friedewalda, alebo inými rovnicami, alebo priamymi metódami.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporená výskumným grantom Slovenskej kardiologickej spoločnosti na roky 2009–2011.

LITERATÚRA

1. Friedewald, W. T., Levy, R. I., Fredrickson, D. S.: *Estimation of the concentration of low-density lipoprotein in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge*. Clin Chem 1972; 18: 499–502.
2. Gaško, R., Sánchez-Meca, J.: *LDL-cholesterol: Kritické hodnotenie analytickej presnosti Friedewaldovej rovnice*. Metaanalýza. Cardiol., 2009; 18: 244–255.
3. Sánchez-Meca, J., Botella, J.: *Systematic reviews and meta-analyses: Tools for professional practice*. Papeles del Psicólogo 2010; 31: 7–17.
4. Doust, J. A., Pietrzak, E., Sanders, S., Glasziou, P. P.: *Identifying studies for systematic reviews of diagnostic tests was difficult due to the poor sensitivity and precision of methodologic filters and the lack of information in the abstract*. J. Clin. Epidemiol., 2005; 58: 444–449.
5. Rys, P., Wladysiuk, M., Skrzekowska-Baran, I. et al.: *Review articles, systematic reviews and meta analyses: which can be trusted?* Pol. Arch. Med. Wewn., 2009; 119: 148–155.
6. Deventer, H. E., Miller, W. G., Korzun, W. J. et al.: *Direct LDL-C Methods do not Significantly Improve Cardiovascular Risk Classification over Calculated LDL-C or Non-HDL-C when compared to the Reference Measurement Procedure*. 2010 AACC Annual meeting. Clin. Chem. 2010; 56, Suppl.: A186.
7. Casprini, P., Camiciottoli, M. S., Celli, A., Ruggeri, A.: *An analysis comparing direct LDL assay with Friedewald calculation*. Poster abstracts – IFCC-EFCC-Euromedlab 2009, Innsbruck, 7.–11.6.2009. Clin. Chem. Lab. Med., 2009; 47: Special Supplement, S277.

8. Chittamma, A., Vanavanan, S., Sritara, P. *et al.*: Comparison of LDL-cholesterol values determined by the direct measurement and calculated from various formulas in the large population. Poster abstracts – IFCC-EFCC-Euro-medlab 2009, Innsbruck, 7.–11.6.2009. Clin. Chem. Lab. Med., 2009; 47: Special Supplement, S277.
9. Breinek, P., Dobrovolná, H.: Srovnání přímého stanovení LDL-cholesterolu s výpočtem (abstr.). Sympozium klinické biochemie FONS 2008, Pardubice, ČR, <http://www.stapro.cz/fons/postery/vypis.asp>. Stiahnuté 13.9.2010.
10. Chludilová, P., Kočárková, E., Breinek, P. *et al.*: Srovnání přímého stanovení LDL-cholesterolu s výpočtem. 44. Celostátní sjezd biochemických laborantů BIOLAB 2008, poster P-10. <http://www.cskb.cz/res/file/biolaby/biolab08-program.pdf>. Stiahnuté 13.9.2010.
11. Ferreira, C., Leme, A.C., Manguiera, C.L.P., Pasternak, J.: Comparative study of different low density lipoprotein assay methods (abstr.). Clin. Chem. Lab. Med., 2008; 46, S1 IFCC WorldLab Fortaleza 2008: S786.
12. Vohnout, B., Vachulová, A., Blažiček, P. *et al.*: Calculated LDL-C underestimates true LDL-C levels in both normotriglyceridemic and hypertriglyceridemic subjects. Cardiol., 2005; 14: K/C1108.
18. Jírová, J., Pospíšilová, J.: Srovnání měření cholesterolu ve frakcích HDL a LDL přímou metodou s měřením HDL srážecí metodou a výpočtem LDL dle Friedewaldovy rovnice. VII. celostátní sjezd České společnosti klinické biochemie s mezinárodní účastí, Olomouc, 11.–13.9.2005. Sborník abstrakt přednášek a posterů.
19. Syrová, D., Blažiček, P., Mocák, J.: Comparison of direct and indirect methods for LDL-cholesterol determination by regression analysis. Zborník abstraktov, Labkvalita '01, Poprad, 2001: 223–225.
19. Franecková, J., Vavřík, J., Hermanová, V., Šutá, J.: Dva vzorce (Friedewald, Planella) na výpočet LDL cholesterolu – porovnanie s priamo meraným LDL cholesterolom. Lab Diagnostika 2000; 5: 73–74.
20. Foley, K.F., Silveira, G.M., Hornseth, J.M. *et al.*: A patient with primary biliary cirrhosis and elevated LDL cholesterol. Clin. Chem., 2009; 55: 187–191.
21. Garcia-Hejl, C., Vest, P., Renard, C. *et al.*: Falsely low LDL cholesterol results and cholestasis. Clin Chem 2006; 52: 2125–2127.
22. Wang, T.Y., Haddad, M., Wang, T.S.: Low triglyceride levels affect calculation of low-density lipoprotein cholesterol values. Arch. Pathol. Lab. Med., 2001; 125: 404–405.
23. Sanchez-Muniz, F.J., Bastidam S.: Do not use Friedewald formula to calculate LDL-cholesterol in hypercholesterolaemic rats. Eur. J. Lipid Sci. Technol., 2008; 110: 295–301.
24. Benlian, P., Béréziat, G.: Une nouvelle méthode de dosage direct du LDL cholestérol. Rev Franc Lab 2001; 331: 63–67.
25. Benlian, P., Cansier, C., Hennache, G. *et al.*: Comparison of a new method for the direct and simultaneous assessment of LDL- and HDL-cholesterol with ultracentrifugation and established methods. Clin. Chem. 2000; 46: 493–505.
25. Espondaburu, O.R., Bassols, G.B.: Mathematical determination of LDL-cholesterol: comparison with a homogeneous method [Article in Spanish]. Acta Bioquim Clin Latinoamer, 2002; 36: 215–221.
26. Mora, S., Rifai, N., Buring, J.E., Ridker, P.M.: Comparison of LDL Cholesterol Concentrations by Friedewald Calculation and Direct Measurement in Relation to Cardiovascular Events in 27 331 Women. Clin. Chem. 2009; 55: 888–894.
27. Iwasaki, Y., Matsuyama, H., Nakashima, N.: Improved Specificity of a New Homogeneous Assay for LDL-Cholesterol in Serum with Abnormal Lipoproteins. Clin. Chem. 2006; 52: 886–888.
28. Smets, E.M.L., Péquériaux, N.C.V., Blaton, V., Goldschmidt, H.M.J.: Analytical performance of direct assay for LDL-cholesterol. Clin. Chem. Lab. Med., 2001; 39: 270–280.
29. Sathyapalan, T., Atkins, S.L., Kilpatrick, E.S.: Low density lipoprotein-cholesterol variability in patients with type 2 diabetes taking atorvastatin compared to simvastatin: Justification for direct measurement? Diab. Obesit. Metab., 2010; 12: 540–544.
30. Yamashita, S., Nakamura, M., Koizumi, H. *et al.*: Evaluation of a homogeneous assay for measuring LDL-cholesterol in hyperlipidemic serum specimens. J. Atheroscler Thromb, 2008; 15: 82–86.
31. Fukuyama, N., Homma, K., Wakana, N. *et al.*: Validation of the Friedewald equation for evaluation of plasma LDL-cholesterol. J. Clin. Biochem. Nutr., 2008; 43: 1–5.
32. Abudu, N., Levinson, S.S.: Calculated low-density lipoprotein cholesterol remains a viable and important test for screening and targeting therapy. Clin. Chem. Lab. Med., 2007; 45: 1319–1325.
33. Banks, M., Wilson, G.: Direct measurement of low-density lipoprotein in diabetic patients with end-stage renal failure. Br. J. Biomed. Sci., 2007; 64: 175.
34. Bayer, P., Veinberg, F., Couderc, R. *et al.*: Évaluation multicentrique de quatre méthodes de dosage direct du cholestérol-LDL. Ann. Biol. Clin., 2005; 63: 27–41.
35. Türkalp, I., Zafer, G., Özkazanc, D.: Analytical performance of a direct assay for LDL-cholesterol: a comparative assessment versus Friedewald's formula. Anadolu Kardiyol Derg 2005; 5: 13–17.
36. Hirowatari, Y., Yoshida, S., Kurosawa, H. *et al.*: Measurement of cholesterol of major serum lipoprotein classes by anion-exchange HPLC with perchlorate ion-containing eluent. J. Lipid. Res., 2003; 44: 1404–1412.
37. Usui, S., Kakuuchi, H., Okamoto, M. *et al.*: Differential Reactivity of Two Homogeneous LDL Cholesterol Methods to LDL and VLDL Subfractions, as Demonstrated by Ultracentrifugation and HPLC. Clin Chem 2002; 48: 1946–1954.
38. Sakaue, T., Hirano, T., Yoshino, G. *et al.*: Reactions of direct LDL-cholesterol assays with pure LDL fraction and IDL: comparison of three homogeneous methods. Clin. Chim. Acta., 2000; 295: 97–106.
39. Kim, G.W., Cho, B.D., Lee, H.S. *et al.*: Comparison analysis of an indirect measurement of friedewald formula

- la method and direkt measurement of immunoseparation method on low-density lipoprotein cholesterol measurement.* Korean Med. J., 2003; 64: 41–48.
40. **Ordóñez-Llanos, J., Wägner, A. M., Bonet-Marqués, R. et al.:** Which cholesterol are we measuring with the Roche Direct, homogeneous LDL-C Plus assay? Clin. Chem. 2001; 47: 124–126.
 41. **Chotkowska, E., Kurjata, P., Kupś, W.:** Evaluation of the precision of the Friedewald's formula for the calculation of low density lipoprotein cholesterol concentration in serum. [Article in Polish] Pol. Merkur Lekarski 2001; 64: 348–351.
 42. **Teerakanchana, T., Puavilai, W., Suriyaprom, K., Tungtrongchitr, R.:** Comparative study of LDL-cholesterol levels in Thai patients by the direct method and using the Friedewald formula. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. 2007; 38: 519–527.
 43. **Jabbar, J., Siddiqui, I., Raza, Q.:** Comparison of two methods (precipitation manual and fully automated enzymatic) for the analysis of HDL and LDL cholesterol. J. Pak. Med. Assoc., 2006; 56: 59–61.
 44. **Anandaraja, S., Narang, R., Godeswar, R. et al.:** Low-density lipoprotein cholesterol estimation by a new formula in Indian population. Int. J. Cardiol., 2005; 102: 117–120.
 45. **Ramírez, A., Pistilli, N., Echagüe, G.:** Zavala de Melgarjo MV. Comparison between the analytical determination of LDL-cholesterol and its estimation by calculation. [Article in Spanish] Mem Inst Invest Cienc Salud 2005; 1: 43–46.
 46. **Eblen-Zajjur, A., Eblen-Zajjur, M.:** Estimation of low density lipoprotein cholesterol concentration: regression analysis versus Friedewald's formula. [Article in Spanish] Rev. Med. Chil., 2001; 129: 1263–1270.
 47. **Miller, G. W., Myers, G. W., Sakurabayashi, I. et al.:** Seven direct methods for measuring HDL and LDL cholesterol compared with ultracentrifugation reference measurement procedures. Clin. Chem., 2010; 56: 977–986.
 48. **Rosini, N., Rosini, A. D., Rosini, G. D. et al.:** Inter-assay variability of dyslipidemias in hypertensive patients. [Article in Portuguese] Bras. Patol. Med. Lab., 2009; 45: 285–294.
 49. **Miller, W. G., Waymack, P. P., Anderson, F. P. et al.:** Performance of four homogeneous direct methods for LDL-cholesterol. Clin. Chem., 2002; 48: 489–498.
 50. **Nauck M, Rifai N.:** Analytical performance and clinical efficacy of three routine procedures for LDL cholesterol measurement compared with the ultracentrifugation-dextran sulfate-Mg²⁺ method. Clin. Chim. Acta, 2000; 294: 77–92.
 51. **Fei, H., Maeda, S., Kirii, H. et al.:** Evaluation of two different homogeneous assays for LDL-cholesterol in lipoprotein-X-positive serum. Clin. Chem., 2000; 46: 1351–1356.
 52. **Tighe, D. A., Ockene, I. S., Reed, G., Nicolosi, R.:** Calculated low density lipoprotein cholesterol levels frequently underestimate directly measured low density lipoprotein cholesterol determinations in patients with serum triglyceride levels ≥ 4.52 mmol/l: An analysis comparing the Lipi-Direct\ magnetic LDL assay with the Friedewald calculation. Clin Chim Acta 2006; 365: 236–242.
 53. **Islamčević, Mm, Mocák, J., Brodnjak-Vončina, D., Blažiček, P.:** Correct ways of using regression for method comparison studies – determination of LDL-cholesterol. Scient Papers Uni Pardubice, Series A 2004; 10: 119–129.
 54. **Wägner, A. M., Bonet, R., Jorba, O. et al.:** Direct LDL-cholesterol measurement in type 2 diabetic patients. Available at http://www.tdx.cbuc.es/TESIS_UAB/AVAILABLE/TDX-0125102-104632//aawf3de3.pdf. Stiahnuté 13.9.2010.
 55. **Esteban-Salan, M., Guimon-Bardesi, A., Viuda-Unzueta, J. M. et al.:** Analytical and clinical evaluation of two homogeneous assays for LDL-cholesterol in hyperlipidemic patients. Clin. Chem., 2000; 46: 1121–1131.
 56. **Renard, C., Ragot, C., Tellal, S. et al.:** Estimation of low-density lipoprotein cholesterol: Assay or calculation? [Article in French] Médecine et armées 2002; 30: 49–56.
 57. **Choosongsang, P., Musigawan, P., Chayanannukul, W., et al.:** Comparison of LDL-cholesterol using the Friedewald calculation and homogeneous enzymatic assay [Article in Thai] Songla Med. J., 2008; 26: 43–52.
 58. **Sibal, L., Neely, R. D. G., Jones, A., Home, P. D.:** Friedewald equation underestimates low-density lipoprotein cholesterol at low concentrations in young people with and without Type 1 diabetes. Diabetic Medicine, 2010; 27: 37–45.
 59. **Niemi, J., Mäkinen, V. P., Heikkonen, J. et al.:** Estimation of VLDL, IDL, LDL, HDL2, apoA-I, and apoB from the Friedewald inputs-apoB and IDL, but not LDL, are associated with mortality in type 1 diabetes. Ann. Med., 2009; 1–11.
 60. **Esteban-Salan, M., Aguilar-Doreste, J. A., Arranz-Pena, M. L. et al.:** Multicentric evaluation of the homogeneous LDL-cholesterol Plus assay: Comparison with beta-quantification and Friedewald formula. Clin. Biochem., 2008; 41: 1402–1409.
 61. **Okazaki, M., Usui, S., Nakamura, M., Yamashita, S.:** Evaluation of an HPLC method for LDL-cholesterol determination in patients with various lipoprotein abnormalities in comparison with beta-quantification. Clin. Chim. Acta, 2008; 395: 62–67.
 62. **Evans, S. R., Fichtenbaum, C. J., Aberg, J. A.:** Comparison of direct and indirect measurement of LDL-C in HIV-infected individuals: ACTG 5087. HIV Clin. Trials, 2007; 8: 45–52.
 63. **García Aguilar, G. D., Martín Alfaro, R., Navarro Romero, M. et al.:** Evaluation of a direct method for the measurement of LDL-cholesterol. [Article in Spanish] Quím Clin 2006; 25: 58–63.
 64. **Tremblay, A. J., Bergeron, J., Gagné, J. M. et al.:** Influence of apolipoprotein E genotype on the reliability of the Friedewald formula in the estimation of low-density lipoprotein cholesterol concentrations. Metab. Clin. Experiment, 2005; 54: 1014–1019.
 64. **Bairaktari, E., Tzallas, C., Kalientzidou, M. et al.:** Evaluation of alternative calculation methods for determining low-density lipoprotein cholesterol in hemodialysis patients. Clin. Biochem., 2004; 37: 937–940.
 65. **Tremblay, A. J., Morrissette, H., Gagné, J. M. et al.:** Validation of the Friedewald formula for the determina-

- tiv of low-density lipoprotein cholesterol compared with β -quantification in a large population. Clin. Biochem., 2004; 37: 785–790.
66. **Wagner, A.M., Zapico, E., Bonet, R. et al.:** The effect of VLDL particles on the accuracy of a direct LDL-cholesterol method in type 2 diabetic patients. Clin. Biochem., 2003; 36: 177–183.
 67. **Bairaktari, E., Elisaf, M., Tzallas, Ch. et al.:** Evaluation of five methods for determining low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) in hemodialysis patients. Clin. Biochem., 2001; 34: 593–602.
 68. **Scharnagl, H., Nauck, M., Wieland, H., März, W.:** The Friedewald formula underestimates LDL cholesterol at low concentrations. Clin. Chem. Lab. Med., 2001; 39: 426–431.
 69. **Bairaktari, E., Hatzidimou, K., Tzallas, C. et al.:** Estimation of LDL cholesterol based on the Friedewald formula and on apo B levels. Clin. Biochem., 2000, 7: 549–555.
 70. **Gómez, F., Camps, J., Simó, J.M. et al.:** Agreement study of methods based on the elimination principle for the measurement of LDL- and HDL-cholesterol compared with ultracentrifugation in patients with liver cirrhosis. Clin. Chem., 2000; 46: 1188–1191.
 71. **Nauck, M., Rifai, N.:** Analytical performance and clinical efficiency of free routine procedures for LDL cholesterol measurement compared with the ultracentrifugation-dextran sulfate - Mg^{2+} method. Clin. Chim. Acta, 2000; 294: 77–92.
 72. **Wagner, A.M., Sánchez-Quesada, J.L., Pérez, A. et al.:** Inaccuracy of calculated LDL-cholesterol in type 2 diabetes: Consequence for patient risk classification and therapeutic decisions. Clin. Chem., 2000; 46: 1830–1832.
 73. **Otokazawa, S., Ai, M., Asztalos, B.F. et al.:** Direct assessment of plasma low density lipoprotein and high density lipoprotein cholesterol levels and coronary heart disease: Results from the Framingham Offspring Study. Atherosclerosis, 2010, in press.
 74. **Tanno, K., Okamura, T., Ohsawa, M. et al.:** Comparison of low-density lipoprotein cholesterol concentrations measured by a direct homogeneous assay and by the Friedewald formula in a large community population. Clin. Chim. Acta, 2010; 411: 1774–1780.
 75. **Balal, M., Paydas, S., Inal, T. et al.:** Validation of the Friedewald formula for the determination of low-density lipoprotein cholesterol in renal transplant recipients. Renal Failure, 2010; 32: 455–458.
 76. **Baruch, L., Agarwal, S., Gupta, B. et al.:** Is directly measured low-density lipoprotein clinically equivalent to calculated low-density lipoprotein? J. Clin. Lipidol, 2010, accepted for publication May 31, 2010.
 77. **Chen, Y., Zhang, X., Pan, B. et al.:** A modified formula for calculating low-density lipoprotein cholesterol values. Lipids in Health and Disease 2010, 9: 52.
 78. **Vujovic, A., Kotur-Stevuljevic, J., Spasic, S. et al.:** Evaluation of different formulas for LDL-C calculation. Lipids in Health and Disease 2010, 9: 24.
 79. **Can, M., Acikgoz, S., Mungan, G. et al.:** Is direct method of low density lipoprotein cholesterol measurement appropriate for targeting lipid lowering therapy? Int. J. Cardiol., 2009; Article in press. OPRAVIŤ CITÁCIU.
 80. **Puavilai, W., Loarungpongse, D., Deerochanawong, C. et al.:** The accuracy in using modified Friedewald equation to calculate LDL from non-fasting triglyceride: a pilot study. J. Med. Assoc. Thai, 2009; 92: 182–187.
 81. **Ahmadi, S., Boroumand, M., Gohari-Moghaddam, K. et al.:** The impact of low serum triglyceride on LDL-cholesterol estimation. Arch. Iranian Med., 2008; 11: 318–321.
 82. **Aral, H., Inal, B.B., Usta, M. et al.:** Comparison of Friedewald calculation with direkt LDL-cholesterol measurement. Türk Klinik Biyokimya Deg., 2008; 6: 43–49. [Article in Turkish]
 83. **Jun, K.R., Park, H., Chun, S. et al.:** Effects of total cholesterol and triglyceride on the percentage difference between the low-density lipoprotein cholesterol concentration measured directly and calculated using the Friedewald formula. Clin. Chem. Lab. Med., 2008; 46: 371–375.
 84. **Rungtanapirom, S., Ongphiphadhanakul, B., Kiatbamburungpant, T. et al.:** Comparative study of direct - measured and calculated LDL in clinical use. J. Med. Assoc. Thai, 2008; 91: 989–994.
 85. **Vohnout, B., Vachulová, A., Blažiček, P. et al.:** Evaluation of alternative calculation methods for determining LDL cholesterol. Vnitr. Lek., 2008; 54: 961–964.
 86. **Gasko R.:** Low-density lipoprotein cholesterol estimation by a new formula - Confirmation. Int. J. Cardiol., 2007; 119: 242–243.
 87. **Krittayaphong, R., Chotinaiwatarakul, Ch., Kangkagate, Ch. et al.:** The association of apolipoprotein B and low density lipoprotein with cardiovascular risk factors in the Thai population. J. Med. Assoc. Thai, 2006; 89, Suppl. 5: S1–S7.
 88. **Srivastava, M., Arora, S., Nigam, P.K. et al.:** Variation in different lipoprotein fractions if estimated by different methodologies. Indian Heart J., 2006; 58: 240–245.
 89. **Wongtiraporn, W., Wattanamongkonsil, L., Kiartivich, S. et al.:** Utilization of calculated low density lipoprotein cholesterol and measured low density lipoprotein cholesterol in Siriraj hospital. J. Med. Assoc. Thai, 2006; 89 Suppl 5: S156–163.
 90. **Charuruks, N., Milintagas, A.:** Evaluation of calculated low-density lipoprotein against a direct assay. J. Med. Assoc. Thaim 2005; 88, Suppl 4: S274–S279.
 91. **Sahu, S., Chawla, R., Uppai, B.:** Comparison of two methods of estimation of low density lipoprotein cholesterol, the direkt versus Friedewald estimation. Indian J. Clin. Biochem., 2005; 20: 54–61.
 92. **Amayo, A.A., Kirera, S.:** Comparison of calculated and direct low density lipoprotein cholesterol determinations in a routine laboratory. East Afr. Med. J., 2004; 81: 154–158.
 93. **Mendes de Cordova, C.M., Schneider, C.R., Juttel, I.D., Mendes de Cordova, M.:** Comparison of LDL-cholesterol direct measurement with the estimate using the Friedewald formula in a sample of 10,664 patients. Arquivos Brasileiros de Cardiologia 2004; 83: 482–487.
 94. **Désidéri-Vaillant, C., Bouvier, S., Suignard, B. et al.:** Évaluation du dosage direct du cholestérol des lipoprotéines LDL. Ann. Biol. Clin., 2004; 62: 691–694.

95. Lindsey, C. C., Graham, M. R., Johnston, T. P. *et al.*: A clinical comparison of calculated versus direct measurement of low-density lipoprotein cholesterol level. *Pharmacotherapy*, 2004; 24: 167–172.
96. Puavilai, W., Laoragpongse, D.: Is calculated LDL-C by using the new modified Friedewald equation better than the standard Friedewald equation? *J. Med. Assoc. Thai*, 2004; 87: 589–593.
97. Hur, M., Kim, C. S. K., Park, M. J. *et al.*: Analysis of low-density lipoprotein cholesterol by homogeneous assay in comparison with Friedewald formula. *Korean J. Lab. Med.*, 2003; 23: 104–108.
98. Faas, F. H., Mith, M. E. G., Simmons, L.: How should low-density lipoprotein cholesterol concentration be determined? *J. Fam. Pract.*, 2002; 51: 973–975.
99. Jensen, T., Dinesen, B., Truong, Q. *et al.*: Comparison of a homogeneous with a precipitation method for the measurement of HDL cholesterol in diabetic patients. *Diab Care* 2002; 25: 1914–1918.
100. Nakanishi, N., Matsuo, Y., Yoneda, H. *et al.*: Validity of the conventional indirect methods including Friedewald method for determining serum low-density lipoprotein cholesterol level: comparison with the direct homogeneous enzymatic analysis. *J. Occup. Health*, 2000; 42: 130–137.
101. Yamashita, S., Kawase, R., Nakaoka, H. *et al.*: Differential reactivities of four homogeneous assays for LDL-cholesterol in serum to intermediate-density lipoproteins and small dense LDL: Comparisons with the Friedewald equation. *Clin. Chim. Acta*, 2009; 410: 31–38.
102. Gazi, I. F., Elisaf, M.: LDL-cholesterol calculation formulas in patients with or without the metabolic syndrome. *Int. J. Cardiol.*, 2007; 119: 414–415.
103. Gazi, I., Tsimihodimos, V., Filippatos, T. D. *et al.*: LDL cholesterol estimation in patients with the metabolic syndrome. *Lipids in Health and Disease*, 2006; 5: 8 doi:10.1186/1476-511X-5-8.
104. García-de la Puente, S., Arredondo-García, J., Pérez-Martínez, P.: Cálculo de la lipoproteína de baja densidad en niños con hiperlipidemia secundaria a enfermedades renales. *Acta Ped. Mexico*, 2009; 30: 84–88.
105. Paz, E., Hermida, J., Bouzas, L. *et al.*: LDL cholesterol estimation using the Anandaraja's and Friedewald's formulas in schizophrenic patients treated with antipsychotic drugs. *Clin. Biochem.*, 2008; 41: 1002–1007.
106. Kurosawa, H., Yoshida, H., Yanai, H. *et al.*: Comparative study between anion-exchange HPLC and homogeneous assay methods in regard to the accuracy of high- and low-density lipoprotein cholesterol measurement. *Clin. Biochem.*, 2007; 40: 1291–1296.
107. Gazi, I., Tsimihodimos, V., Filippatos, T. D. *et al.*: LDL cholesterol estimation in patients with the metabolit syndrome. *Lipids in Health and Disease*, 2006; 5: 8.
108. Dewé, W.: Review of statistical methodologies used to compare (bio)assays. *J. Chromatograph*, 2009; 877: 2208–2213.
109. Moher, D., Fortin, P., Jadad, A. R. *et al.*: Completeness of reporting of trials published in language other than English: implications for conduct and reporting of systematic reviews. *Lancet*, 1996; 347: 363–366.
110. Gaško, R.: Low-density lipoprotein cholesterol estimation by a new formula – Confirmation. *Int. J. Cardiol.*, 2007; 119: 242–243.
111. Pollak, M., Štern, P.: Žebříček výkonů odbornosti 801 podle frekvence a nákladů. *FONS*, 2008; 4: 8–12.
112. Fuentes-Arderiu, X., Braga-Fernández, S., Freire-Campo, L. *et al.*: Comparison of measurement uncertainties in direct plasma low-density lipoprotein cholesterol method of measurement and indirect estimation according to Friedewald equation. *Accred. Qual Assur.*, 2009; 14: 179–183.
113. Sachdeva, A., Cannon, C. P., Deedwania, P. C. *et al.*: Lipid levels in patients hospitalized with coronary artery disease: An analysis of 136,905 hospitalizations in Get With The Guidelines. *Am. Heart J.*, 2009; 157: 111–117.
114. Superko, H. R., King, III S.: Is lowering low-density lipoprotein an effective strategy to reduce cardiac risk? Lipid management to reduce cardiovascular risk. A new strategy is required. *Circulation*, 2008; 117: 560–568.
115. Grundy, S. M.: Promise of low-density lipoprotein-lowering therapy for primary and secondary prevention. *Circulation* 2008; 117: 569–573.

MUDr. Rudolf Gaško
 OKB
 Železničná nemocnica s poliklinikou
 Masarykova 9
 040 01 Košice
 e-mail: rgasko@gmail.com

ASOCIÁCIA MEDZI POČTOM LIKVIOROVÝCH OLIGOKLONÁLNYCH PÁSOV IGG A PLAZMATICKÝMI HLADINAMI KOENZÝMU Q10, ALFA- A GAMA-TOKOFEROLU A BETA-KAROTÉNU U PACIENTOV SO SKLERÓZOU MULTIPLEX

Ondrkalová Marta¹, Kalnovičová Terézia¹, Kucharská Jarmila², Kuračka Ľubomír³, Turčáni Peter¹

¹I.neurologická klinika LF UK,

²Farmakobiochemické laboratórium III. Internej kliniky,

³Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, LFUK Bratislava

SÚHRN

Cieľom tejto práce bolo zistiť, či existuje u pacientov so sklerózou multiplex (SM; n = 28; 7 M/21 Ž; priemerný vek 37,3 ± 11,6 r.) korelačný vzťah medzi množstvom oligoklonálnych pásov (OP) v cerebrospinálnom likvore (CSF) a plazmatickými hladinami niektorých antioxidantov (koenzým Q10, alfa-, gama-tokoferol a beta-karotén). Zistili sme negatívnu koreláciu medzi množstvom CSF OP a plazmatickými hladinami beta-karoténu ($r = -0,4347$, $p = 0,023$), pozitívnu koreláciu medzi množstvom CSF OP a gama-tokoferolom ($r = 0,5082$, $p = 0,0068$), hladinami IgG v CSF ($r = 0,6572$; $p = 0,0001$), IgG indexom ($r = 0,90136$; $p < 0,0001$), Reiberovým vzťahom ($r = 0,74428$; $p < 0,0001$) a množstvom mononukleárov v CSF ($r = 0,5083$; $p = 0,058$). Priemerné plazmatické hladiny analyzovaných vitamínov boli u SM pacientov znížené. Na základe uvedených výsledkov predpokladáme, že redukovaná antioxidantná kapacita v asociácii so zvýšenou intratekálnou syntézou IgG by mohla hrať významnú úlohu v patogeneze zápalovej demyelinizácie vo včasnom štádiu tohto ochorenia.

Kľúčové slová: plazma, cerebrospinálny likvor, vitamíny, koenzým Q10, alfa-tokoferol, gama-tokoferol, beta-karotén, TBARS, oligoklonálne pásy.

SUMMARY

The aim of this study was to assess the correlation between some antioxidants in plasma (coenzyme Q10, alpha- and gamma-tocopherol and beta-carotene) and the number of the oligoclonal IgG bands (OCB) in the cerebrospinal fluid (CSF) of patients with multiple sclerosis (MS). The set of 28 patients consisted of 7 males and 21 females (aged 17–59, mean 37,3 ± 11,6 years). We have found negative correlation between the number of CSF OCB and plasmatic levels of beta-carotene ($r = -0,4347$; $p = 0,023$), and positive correlation between the number CSF OCB and gamma-tocopherol ($r = 0,5082$; $p = 0,0068$), CSF levels of IgG ($r = 0,6572$; $p = 0,0001$), IgG index ($r = 0,90136$; $p < 0,0001$), RIG ($r = 0,74428$; $p < 0,0001$) and the number of CSF mononuclear ($r = 0,5083$; $p = 0,058$). The mean plasma levels of coenzyme Q10, gamma-tocopherol and beta-carotene were reduced. We hypothesize that the reduced antioxidant reserve associated with intrathecal IgG synthesis is possibly an early pathogenic mechanism in inflammatory demyelization in MS patients.

tene ($r = -0,4347$; $p = 0,023$), and positive correlation between the number CSF OCB and gamma-tocopherol ($r = 0,5082$; $p = 0,0068$), CSF levels of IgG ($r = 0,6572$; $p = 0,0001$), IgG index ($r = 0,90136$; $p < 0,0001$), RIG ($r = 0,74428$; $p < 0,0001$) and the number of CSF mononuclear ($r = 0,5083$; $p = 0,058$). The mean plasma levels of coenzyme Q10, gamma-tocopherol and beta-carotene were reduced. We hypothesize that the reduced antioxidant reserve associated with intrathecal IgG synthesis is possibly an early pathogenic mechanism in inflammatory demyelization in MS patients.

Key words: plasma, cerebrospinal fluid, vitamins, coenzyme Q10, alpha-tocopherol, gamma-tocopherol, beta-carotene, TBARS, oligoclonal bands.

ÚVOD

Skleróza multiplex (SM) je chronické autoimunitné demyelinizačné ochorenie centrálného nervového systému (CNS) s patologickými znakmi zápalu, demyelinizácie, gliózy a straty axónov. Detekcia oligoklonálnych IgG pásov (OP) v cerebrospinálnom likvore (CSF) je dôležitým laboratórnym nálezom podporujúcim diagnózu SM. Niektoré práce poukazujú, že absencia OP v CSF alebo ich nízky počet by mal byť dobrým indikátorom priaznivej prognózy tohto ochorenia (1). Práca Siritho a spol (16) však tento predpoklad nepotvrdila. V predchádzajúcej práci sme zistili, že chronický zápal u pacientov so sklerózou multiplex vedie k poklesu plazmatických hladín beta-karoténu a tento pokles je spojený so zvýšenou intratekálnou produkciou IgG a vyššou aktivitou lipoperoxidácie (8).

V tejto súvislosti sme vyslovili hypotézu, že priaznivejší priebeh SM ochorenia pri nízkom počte OP by mohol súvisieť s lepším stavom antioxidantnej kapacity organizmu. Zamerali sme sa preto na zistenie, či existujú korelačné vzťahy medzi množstvom likvorových OP a plazmatickými hladinami lipofilných vitamínov (alfa-tokoferolom, gama-tokoferolom, beta-karoténom), ukazovateľom bioenergetického stavu s antioxidantnými vlastnosťami koenzýmom Q10 a malondialdehydom, markerom lipoperoxidácie.

PACIENTI A METÓDY

Vyšetrovaný súbor pozostával z 28 pacientov (21 Ž/7 M, priemerný vek 37,3 ± 11,6 (17–59 rokov)) s klinicky a laboratórne potvrdenou diagnózou skleróza multiplex (SM).

Vzorky likvoru boli získané lumbálnou punkciou. Intratekálna syntéza IgG sa zisťovala kvalitatívne vyšetrením prítomnosti oligoklonálnych IgG pásov v sére a v likvore metódou izoelektrickej fokusácie na polyakrylamidovom géle. Kvantitatívne hodnotenie intratekálnej syntézy IgG sa vykonalo pomocou IgG indexu ($IgGI = IgG_{CSF}/$

albumín_{CSF}:IgG_s/albumín_s) a tiež pomocou Reiberovho vzťahu (RIG) (15). Funkcia hematolikorovej bariéry sa hodnotila pomocou albumínového kvocientu (QAlb - albumín_{CSF}/albumín_s).

Plazmatické hladiny koenzýmu Q10, alfa-tokoferolu, gama-tokoferolu a beta-karoténu sme stanovili modifikovanou HPLC metódou s UV detekciou pri 275 nm (CoQ10), 295 nm (tokoferoly) a 450 nm (beta-karotén) (10,11). Marker lipoperoxidácie MDA, vyjadrený ako TBARS (látky reagujúce s kyselinou tiobarbiturovou), sme stanovili spektrofotometricky pri 532 nm podľa Janero a Burghardt (4).

Výsledky boli hodnotené pomocou štandardných štatistických postupov (Kolmogorov-Smirnov test, Spearmanov korelačný test).

VÝSLEDKY

V porovnaní s referenčnými hodnotami 43 % pacientov so sklerózou multiplex (SM) malo v likvore zvýšené celkové bielkoviny, 36 % SM pacientov poruchu hematolikorovej bariéry a všetci SM pacienti zvýšenú intratekálnu tvorbu IgG vyjadrenú likvorovými hladinami IgG, IgG indexom a Reiberovým vzťahom (RIG) a pozitívny dôkaz prítomnosti oligoklonálnych pásov (OP) (od 3 do 36) v cerebrospínálnom likvore (CSF) (Tab. 1).

Plazmatické hladiny analyzovaných antioxidantov (okrem alfa-tokoferolu) sa pohybovali pod hladinou alebo v dolnej hranici referenčných hodnôt (Tab. 2). Z analyzovaných antioxidantov sa u SM pacientov vyskytoval najvyšší deficit plazmatického gama-tokoferolu (u 75 % SM pacientov). Deficit koenzýmu Q10 (CoQ10) a beta karoténu v plazme sa vyskytoval asi u 40 % pacientov (Tab. 2). 82 % pacientov malo zvýšené plazmatické hladiny TBARS, markera lipoperoxidácie (Tab. 2).

Plazmatické hladiny beta-karoténu a gama-tokoferolu signifikantne korelovali s počtom oligoklonálnych pásov v CSF, pričom beta-karotén koreloval s CSF OP negatívne ($r = -0,4347$; $p = 0,0235$) (Tab. 3). S markerom lipoperoxidácie TBARS koreloval len beta-karotén. Táto inverzná korelácia nebola štatisticky významná ($r = -0,3658$; $p = 0,0788$) (Tab. 3).

S počtom OP koreloval aj počet mononukleárov v CSF ($r = 0,508286$; $p = 0,0058$), likvorové hladiny IgG ($r = 0,6572$; $p = 0,0001$), IgG index ($r = 0,901362$; $p < 0,0001$) a hodnoty Reiberovho vzťahu (RIG; $r = 0,744281$; $p < 0,0001$) (Tab. 4.).

DISKUSIA

Skleróza multiplex (SM) prebieha ako chronický autoimunitný zápal CNS, ktorý vedie k manifestácii perivaskulárnych zápalových lézií v bielej hmote mozgu s následnou demyelinizáciou a stratou axó-

Tab. 1. Hladiny niektorých biochemických parametrov v sére (s) a cerebrospínálnom likvore (L) u pacientov so sklerózou multiplex (SM).

LV - znížené hodnoty, HV - zvýšené hodnoty

| Parametre | Referenčné hodnoty | Skleróza multiplex (SM) |
|-------------------------|--------------------|---|
| Celkové bielkoviny (L) | 150-430 mg/L | 473,2 ± 194,6 (231-1250) MED = 429 HV 12/28 (42,8 %) |
| Albumín (L) | 0-350 mg/L | 275,3 ± 174,6 (114-974) MED = 254 HV 6/28 (21,4 %) |
| Albumín (s) | 37-53 g/L | 42,9 ± 3,8 (33-47,7) MED = 43,5 LV 2/28 (7,1 %) |
| QAlb | < 7,4 | 6,4 ± 3,7 (2,56-20,7) MED = 5,6 HV 10/28 (35,7 %) |
| IgG (L) | 0-40 mg/L | 0,084 ± 0,077 (0,023-0,41) MED = 0,07 HV 28/28 (100 %) |
| IgG (s) | 7-17 g/L | 11,45 ± 2,25 (7,41-16,7) MED = 11,1 HV 0/28 (0 %) |
| IgG index | do 0,66 | 31,1 ± 0,49 (0,68-2,43) MED = 0,87 HV 28/28 (100 %) |
| RIG | 0,0 mg/L | 34,6 ± 57,5 (0,26-262,4) MED = 15,07 HV 28/28 (100 %) |
| Oligoklonálne pásy (OP) | n ≤ 2 | 14,57 ± 10,04 (3-36) MED = 11 HV 28/28 (100 %) |

nov. K excesívnej axonálnej strate, na ktorej sa zúčastňujú zápalové procesy a neurodegeneratívne zmeny, dochádza už v iničiálnom štádiu ochorenia. Včasná a správna diagnóza SM je kľúčovým faktorom, ktorý môže významne ovplyvniť ďalší osud pacienta. Okrem klinického vyšetrenia, vyšetrenia pomocou magnetickej rezonancie a evokovaných potenciálov, má vyšetrenie likvoru osobitný význam pri včasnom štádiu ochorenia, pri negatívnom náleze na MRI. Dôležitým laboratórnym nálezom, ktorý podporuje diagnózu SM je detekcia oligoklonálnych IgG pásov (OP) v CSF.

Tab. 2. Hladiny TBARS a niektorých lipofilných vitamínov v plazme u pacientov so sklerózou multiplex (SM). LV - znížené hodnoty, HV - zvýšené hodnoty

| Parametre | Referenčné hodnoty | Skleróza multiplex (SM) |
|-------------------------|--------------------|--|
| Vek (r) | | 37,4 ± 10,9 (19-59) MED = 36,5 |
| TBARS (umol/L) | < 4,5 | 5,02 ± 0,75 (3,57-6,73) MED = 5,06 HV = 23/28 (82,1 %) |
| Koenzým Q10 (umol/L) | 0,4-1,0 | 0,45 ± 0,12 (0,266-0,759) MED = 0,425 LV = 11/28 (39,3 %) |
| alfa-tokoferol (umol/L) | 15-40 | 21,9 ± 5,5 (14-38,3) MED = 20,85 LV = 2/28 (7,1 %) |
| gama-tokoferol (umol/L) | " 2-7 | 1,56 ± 0,60 (0,505-2,69) MED = 1,635 LV = 21/28 (75 %) |
| beta-karotén (umol/L) | 0,3 - 3,0 | 0,58 ± 0,48 (0,097-1,68) MED = 0,34 LV = 12/28 (42,8 %) |

Tab. 3. Korelácie medzi oligoklonálnymi pásmi (OP), TBARS a plazmatickými hladinami koenzýmu Q10 (CoQ10), alfa-tokoferolu, gama-tokoferolu a beta-karoténu u pacientov so sklerózou multiplex

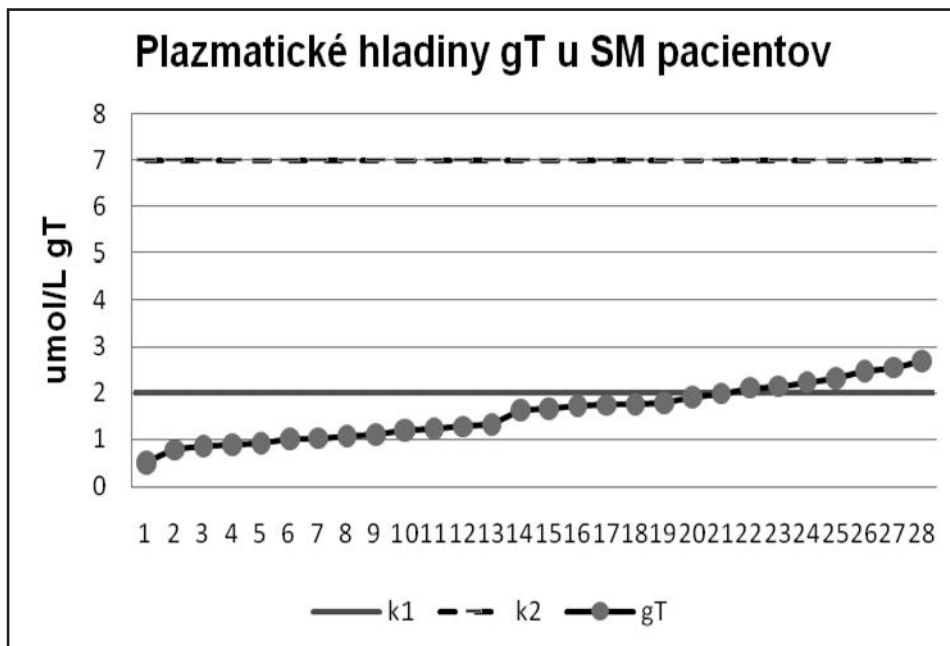
| Parametre | OP | TBARS |
|----------------|---|------------------------------------|
| CoQ10 | r = 0,0762 (n = 27) p = 0,7071 | r = -0,0001 (n = 24) p = 0,9996 |
| alfa-Tokoferol | r = 0,1308 (n = 27) p = 0,5155 | r = -0,1035 (n = 24) p = 0,6303 |
| gama-Tokoferol | r = 0,5082 (n = 27) p = 0,0068 | r = -0,0001 (n = 24) p = 0,9997 |
| Beta-karotén | r = -0,4347 (n = 27) p = 0,0235 | r = -0,3658 (n = 24) p = 0,0788 |
| TBARS | r = 0,1522 (n = 24) p = 0,4778 | |
| OP | | r = 0,1522 (n = 24) p = 0,4778 |

V prechádzajúcej práci (14) sme zistili, že u pacientov so sklerózou multiplex (SM) množstvo OP je asociované

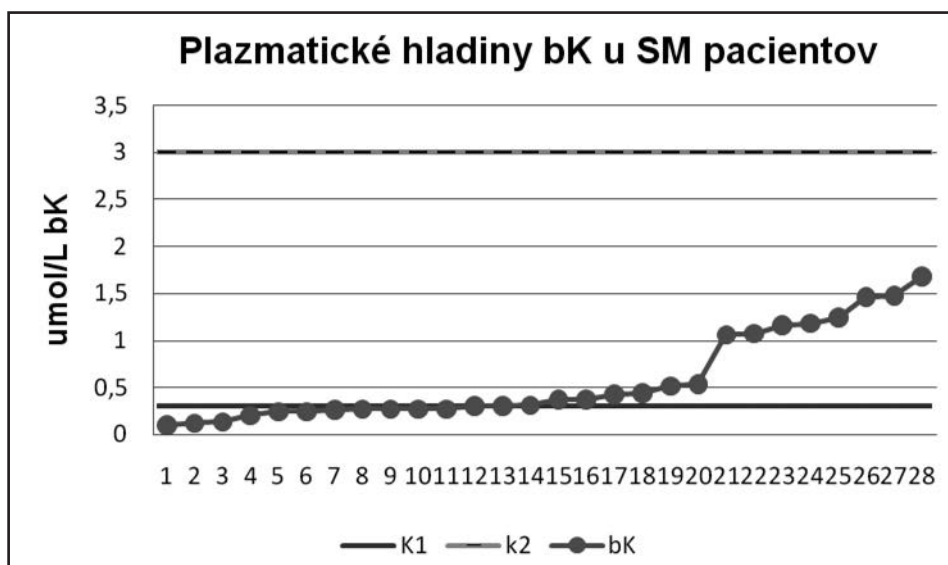
Tab. 4. Korelačné vzťahy medzi množstvom oligoklonálnych pásov (OP) v cerebrospinálnom likvore (CSF) a niektorými biochemickými parametrami v sére a v likvore (L) u pacientov so sklerózou multiplex

| Parametre | Korelácie s OP v CSF |
|-----------------------|-----------------------------------|
| Vek | r = -0,06013 (NS) |
| Albumín-L | r = 0,240296 (NS) |
| Celkové bielkoviny-L | r = 0,265551 (NS) |
| Albumín-s | r = -0,17627 (NS) |
| IgG-s | r = -0,177865 (NS) |
| Mononukleáry-L | r = 0,508286 p = 0,0058 |
| IgG-L | r = 0,657256 p = 0,0001 |
| QA | r = 0,265956 (NS) |
| IgG index | r = 0,901362 p < 0,0001 |
| RIG | r = 0,744281 p < 0,0001 |

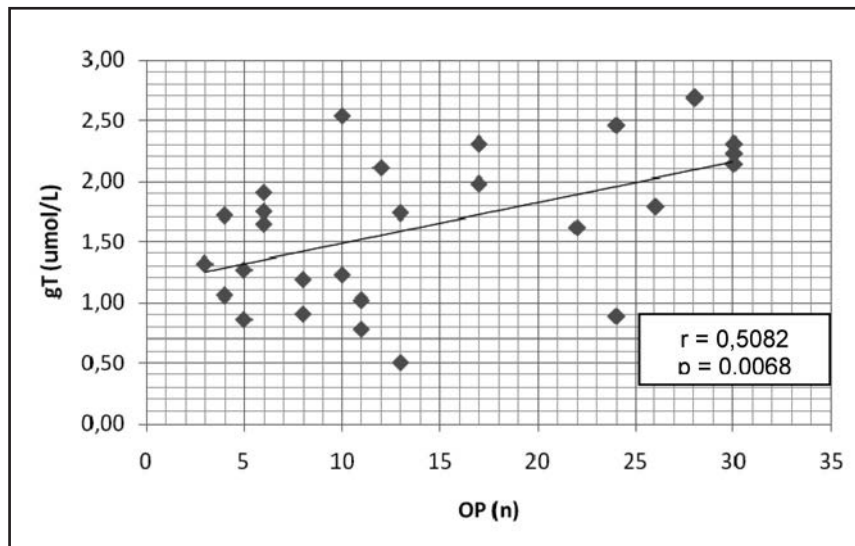
s intenzitou intratekálnej produkcie IgG, koreluje s likvorovými hladinami IgG, IgG indexom a Reiberovým vzťahom (RIG). V cerebrospinálnom likvore pacientov so sklerózou multiplex sme oproti kontrolnému súboru detegovali nižšie hladiny albumínu pri zvýšenej intratekálnej syntéze IgG, čo sme interpretovali ako možný dôsledok zníženej antioxidačnej kapacity organizmu pri tomto ochorení (14). Mareš *a spol.* (12) zistili, že po 4-7 mesiacoch imunomodulačnej liečby (s interferonom beta alebo glatiramer acetátom) sa znižuje počet OP u SM pacientov v priemere o 5,6 OP. V tejto súvislosti nás zaujímalo, či sa počet oligoklonálnych pásov v CSF odrazí v zmene koncentrácie niektorých lipofilných antioxidantov v plazme. V súbore 28 pacientov u všetkých s dôkazom prítomnosti CSF OP (n = 3-36) sme analyzovali v plazme hladiny koenzýmu Q10, alfa-, gama-tokoferolu, beta-karoténu a marker lipoperoxidácie MDA (vyjadrený ako TBARS). Podobne ako Besler *a spol.* (2) sme zistili, že študovaná skupina SM pacientov má redukované hladiny plazmatických vitamínov, ktoré sú implikované v antioxidačnej ochrane organizmu a zvýšenú aktivitu lipoperoxidácie, ktorá sa vyskytuje u viac ako 80 % SM pacientov (Tab. 2). Významný pokles plazmatickej koncentrácie pod referenčný interval sme zaznamenali u gama-tokoferolu (75 % SM pacientov) (obr. 1) a v menšom rozsahu u beta-karoténu (43 %) (obr. 2) a koenzýmu Q10 (39 %) (Tab. 2). Hladiny beta-karoténu a gama-tokoferolu signifikantne korelovali s počtom CSF OP (Tab. 3, Obr. 3, 4). Zistená inverzná korelácia medzi beta-karoténom a počtom CSF OP poukazuje, že beta-karotén by mohol hrať významnú úlohu v inaktivácii voľnoradikálových procesov prebiehajúcich počas zápalovej demyelinizácie, čo naznačuje aj inverzná korelácia medzi plazmatickými hladinami beta-karoténu a markerom lipoperoxidácie TBARS (Tab. 3). Redukované hladiny antioxidantov môžu znižovať schopnosť organizmu chrániť sa pred peroxynitritom a inými



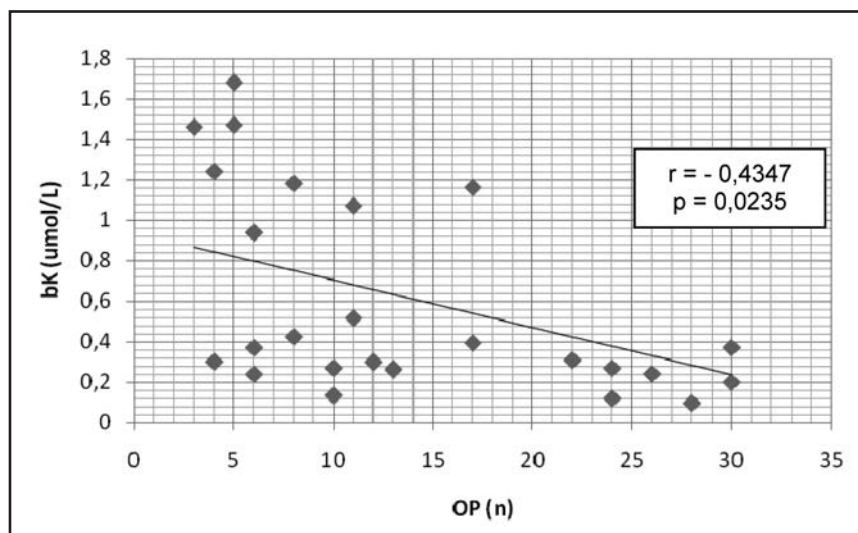
Obr. 1. Hladiny gama-tokoferolu (gT) v plazme u pacientov so sklerózou multiplex (SM; n = 28).
k1, k2 - referenčné hodnoty gama-tokoferolu v plazme (2-7 umol/L)



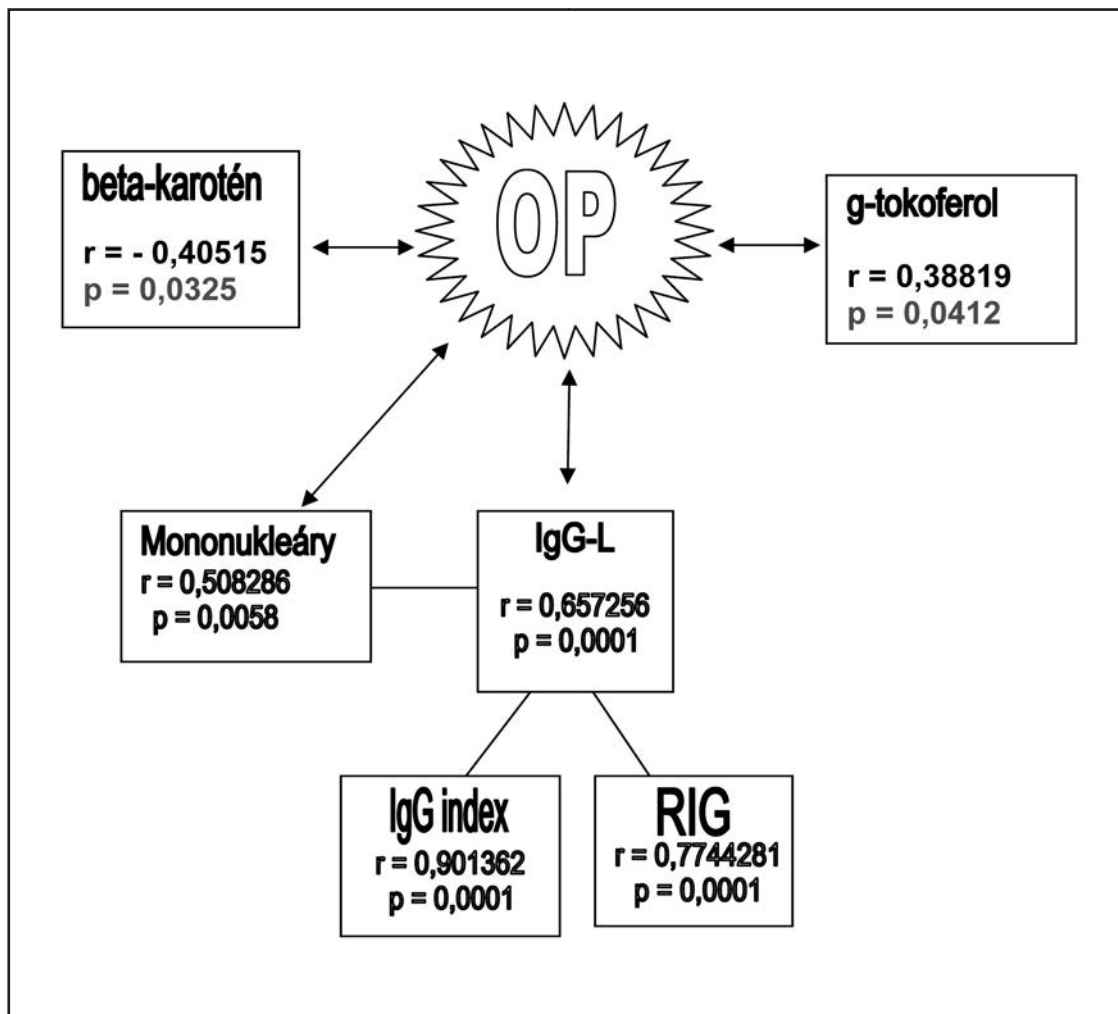
Obr. 2. Hladiny beta-karoténu (bK) v plazme u pacientov so sklerózou multiplex (SM; n = 28).
k1; k2 - referenčné hodnoty beta-karoténu v plazme (0,3-3,0 umol/L)



Obr. 3. Plazmatické hladiny gama-tokoferolu (gT) v závislosti od množstva oligoklonálnych pásov (OP) v cerebrospinálnom likvore u pacientov so sklerózou multiplex



Obr. 4. Plazmatické hladiny beta-karoténu (bK) v závislosti od množstva oligoklonálnych pásov (OP) v cerebrospinálnom likvore u pacientov so sklerózou multiplex



Obr. 5. Korelácie oligoklonálnych pásov IgG (OP) v cerebrospinálnom likvore s plazmatickými hladinami beta-karoténu a gama-tokoferolu a počtom mononukleárov a koncentráciou IgG-L (IgG indexom a RIG) v cerebrospinálnom likvore u pacientov so sklerózou multiplex

voľnými radikálmi, ktoré pôsobia na celulárne zložky a poškodzujú bunky.

Koncentrácia gama-tokoferolu v krvnom riečisku je v porovnaní s alfa-tokoferolom nižšia. Jeho znížené hladiny u pacientov so sklerózou multiplex (Tab. 2, Obr. 1) môžu byť dôsledkom jeho nitrácie pri odstraňovaní reaktívnych foriem dusíka a jeho zvýšeného odbúravania. Kým alfa-tokoferol je preferenčne chránený pred degradáciou alfa-tokoferol-transportným proteínom (5), gama-tokoferol podlieha metabolickým reakciám, omega-hydroxylácii sprostredkovanvej cytochrómom P450 a oxidácii 13´C na hydrofóbnom bočnom reťazci s tvorbou 13´-karboxychromanolu, ktorý sa ďalej degraduje beta-oxidáciou na terminálny metabolit CEHC (2-/beta-karboxyetyl/-6-hydroxychroman), alebo 3´-karboxychromanol (7).

V súvislosti s našimi výsledkami je zaujímavým zistením, že množstvo CSF OP môže mať vplyv na priebeh ochorenia. Avasarala *a spol.* (1) pri retrospektívnej

analýze 1800 pacientov s diagnózou skleróza multiplex zistili, že absencia alebo malý počet oligoklonálnych pásov v cerebrospinálnom likvore (CSF OP) v čase stanovenia diagnózy predikuje lepšiu prognózu ochorenia. Z tohto súboru si vybrali skupinu pacientov, ktorí nemali minimálne 10 rokov zhoršenie klinického stavu. Toto kritérium spĺňalo 44 SM pacientov. U benignej formy SM (EDSS < 3,5; OP = 2,86 ± 3,59; n = 0–10) došlo k zhoršeniu klinického stavu v priemere o 15,8 rokov, u SM so závažnejším klinickým stavom (EDSS > 7,5; OP = 5,7 ± 4,86; n = 0–17) sa klinický stav zhoršil v priemere o 16,2 roka. Počet OP koreloval s priebehom ochorenia. Hoci toto štúdium poukázalo, že nízke množstvo alebo absencia OP predikuje lepšiu prognózu ochorenia, v japonskej štúdií Fukuzawa *a spol.* (3) sa tento predpoklad nepotvrdil. Možným vysvetlením tejto diskrepancie sú populačné rozdiely v lokalizácii lézií a v imunogenetike azijského typu SM (9,13).

ZÁVER

Prevažná časť pacientov so sklerózou multiplex má už v počiatočných štádiách ochorenia znížené plazmatické hladiny lipofilných vitamínov a zvýšenú lipoperoxidačnú aktivitu. Významný pokles sa vyskytuje v hladinách gama-tokoferolu a beta-karoténu, ktorých plazmatické hladiny signifikantne korelujú s množstvom oligoklonálnych pásov v cerebrospinálnom likvore. Deficit beta-karoténu v plazme u SM pacientov je asociovaný so zvýšenou lipoperoxidáciou a zvýšenou intratekálnou tvorbou IgG, ktorá koreluje s množstvom CSF OP. Výsledky poukazujú, že SM pacienti s nízkymi hladinami vitamínov nie sú schopní zabrániť voľnoradikálovej toxicite, čo potom vedie k zvýšenej lipoperoxidácii, k zápalu a k deštrukcii tkaniva. Inou alternatívou je, že zápal, ktorý je súčasťou patogenézy SM, vedie k spotrebe antioxidantov v dôsledku ich skavendžerovej aktivity pri nadmernej tvorbe voľných radikálov.

LITERATÚRA

1. **Avasarala, J. R., Cross, A. H., Trotter, J. L.:** *Oligoclonal band number as a marker for prognosis in multiple sclerosis.* Arch Neurol., 2001; 58: 2044–2045.
2. **Besler, H. Z., Comoglu, S., Okcu, Z.:** *Serum levels of antioxidant vitamins and lipid peroxidation in multiple sclerosis.* Nutr. Neurosci, 2002; 5(3): 215–220.
3. **Fukuzawa, T., Yanagawa, T., Kikuchi, S. a spol.:** *CTL-4 gene polymorphism may modulate disease Japanese multiple sclerosis patients.* J. Neurol. Sci., 1999; 171: 49–55.
4. **Janero, D. R., Burghardt, B.:** *Thiobarbituric acid-reactive malondialdehyde formation during superoxide-dependent, iron-catalyzed lipid peroxidation. Influence of peroxidation conditions.* Lipids, 1989; 24: 125–131.
5. **Jiang, Q., Christen, S., Shigenaga, M. K., Ames, B. N.:** *Gamma-Tocopherol, the major form of vitamin E in US diet, deserves more attention.* Am. J. Clin. Nutr., 2001; 74: 714–722.
6. **Jiang, Q., Ames, B. N.:** *Gamma - tocopherol, but not alpha tocopherol, decreases proinflammatory eicosanoids and inflammation damage in rats.* FASEB J., 2003; 17: 816–822.
7. **Jiang, Q., Freiser, H., Wood, K. V., Yin, X.:** *Identification and quantitation of novel vitamin E metabolites, sulfated long-chain carboxychromanals, in human A549 cells and in rats.* J. Lipid Res., 2007; 48: 1221–1230.
8. **Kalnovičová, T., Kuračka, L., Kucharská, J., Ondrkalová, M., Turčáni, P.:** *Zníženie plazmatických hladín beta-karoténu u pacientov so sklerózou multiplex je spojené so zvýšenou intratekálnou tvorbou IgG a zvýšenou lipoperoxidáciou.* Laboratórna diagnostika, 2011; 16(1):
9. **Kikuchi, S., Fukuzawa, T., Niino, M, a spol.:** *HLA-related subpopulations of MS in Japanese with and without oligoclonal IgG bands.* Neurology, 2003; 60: 647–651.
10. **Kucharská, J., Gvozdjáková, A., Mizera, S., Braunová, Z., Schreinerova, Z., Schrameková, E. Pecháň, I., Fabián, J.:** *Participation of coenzyme Q10 in the rejection development of the transplanted heart clinical study,* Physiol. Res., 1998; 47: 399–404.
11. **Lang, J. K., Gohil, L., Packer, L.:** *Simultaneous determination of tocopherols, ubiquinols, and ubiquinones in blood, plasma, tissue homogenates, and subcellular fractions.* Anal. Biochem., 1986; 157: 106–116.
12. **Mareš, J., Muchová, B., Herzig, R., Urbánek, K.:** *Zmeny vzorce oligoklonálnych proužku v likvoro nemocných s roztrúsenou sklerózou behem terapie interferony beta, resp. glatiramer acetátom. Pilotní studie.* Čes. a slov. Neurol. Neurochir., 2003; 66/99(2): 118–120.
13. **Nakashoima, I., Fujihara, K., Miyazawa, H. a spol.:** *Relevance of callosal and periventricular MRI lesions to oligoclonal bands in multiple sclerosis.* Acta Neurol. Scand., 2006; 113: 125–131.
14. **Ondrkalová, M., Kalnovičová, T., Turčáni, P.:** *Position of IgG oligoclonal bands in the diagnosis of multiple sclerosis.* Clin. Chem. Lab. Med., 2008; 46 (Suppl) S315–S316.
15. **Reiber, H. H., Peter, J. B.** *Cerebrospinal fluid analysis: disease related data patterns and evaluation programs.* J. Neurol. Sci., 2001; 184: 101–122.
16. **Siritho, S., Freedman, M. S.:** *The prognostic significance of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis.* J. Neurol. Sci., 2009; 279(1–2): 21–25.

PLAZMATICKÉ HLADINY KOENZÝMU Q10 V ASOCIÁCII S DEGRADAČNÝMI PRO- DUKTMI PURÍNOVÝCH NUKLEOTIDOV U PACIENTOV SO SKLERÓZOU MULTIPLEX

Kuračka Lubomír¹, Kalnovičová Terézia²,
Kucharská Jarmila³, Turčáni Peter²

¹Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie

²I.neurologická klinika LF UK

³Farmakobiochemické laboratórium III. Internej kliniky,
LFUK Bratislava

SÚHRN

V patogenéze demyelinizačných ochorení vrátane sklerózy multiplex (SM) zohráva významnú úlohu oxidačný stres. Zvýšené energetické požiadavky axónov a zlyhanie mitochondrií spojené s následnou depléciou makroergických fosfátov je jednou z možných príčin axonálnej degenerácie a disability pri SM.

V predchádzajúcej štúdií sme zistili, že pacienti so sklerózou multiplex majú zvýšenú degradáciu purínových nukleotidov v CNS. V tejto súvislosti nás zaujímalo do akej miery sa zvýšenie katabolizmu purínov odráža v anti-oxidačnej kapacite plazmy a či je asociované s alteráciami v plazmatických hladinách koenzýmu Q10 (CoQ10), ktorý je ukazovateľom bioenergetického stavu a má tiež antioxidantné vlastnosti. Analyzovaný súbor 24 pacientov so sklerózou multiplex sa vyznačoval zníženou antioxidantnou kapacitou plazmy (vyjadrenou hladinami beta-karoténu, alfa-, gama-tokoferolu a CoQ10), zvýšenou lipoperoxidáciou (zvýšenými plazmatickými hladinami TBARS) a zvýšenou degradáciou purínových nukleotidov. U všetkých pacientov bola dokázaná kvantitatívne intratekálna syntéza IgG a prítomnosť oligoklonálnych pásov v CSF. Plazmatické hladiny CoQ10 pozitívne korelovali s hladinami alfa-tokoferolu v plazme a s hladinami adenosínu a xantínu v cerebrospinálnom likvore. Výsledky poukazujú na účasť koenzýmu Q10 v regenerácii alfa-tokoferolu a na jeho možný vplyv na bioenergetiku reparačných remyelinizačných procesov, ktoré prebiehajú v skorých štádiách tohto ochorenia.

Kľúčové slová: koenzým Q10, adenosín, inozín, hypoxantín, xantín, kyselina močová, alfa-tokoferol, gama-tokoferol, beta-karotén, TBARS, skleróza multiplex

SUMMARY

In the pathogenesis of demyelinating diseases including multiple sclerosis (MS) an important role plays oxidative stress. Increased energy requirements axons and mitochondria failure associated with subsequent depletion of macroergic phosphate is one of the causes

of axonal degeneration and disability in MS. In a previous study we found that MS patients have an increased degradation of purine nucleotides in the CNS. In this context, we were interested to what extent the increase in purine catabolism affects the antioxidant capacity of plasma and if there is any association with alterations in plasma levels of coenzyme Q10 (CoQ10), which is an indicator of bioenergetic state and has also antioxidant properties. The analyzed set of 24 patients with multiple sclerosis was characterized by reduced antioxidant capacity of plasma (measured by serum beta-carotene, alpha- and gamma-tocopherol and CoQ10), increased lipid peroxidation (increased plasma levels of TBARS) and increased catabolism of purine nucleotides. All patients showed the intrathecal IgG production and the presence of oligoclonal bands in cerebrospinal fluid (CSF). Plasma levels of CoQ10 were positively correlated with alpha-tocopherol in plasma and levels of adenosine and xanthine in CSF. Results suggest participation of CoQ10 in the regeneration of alpha-tocopherol and impact on bioenergetics of reparative remyelinating processes that take place in the early stages of the disease.

Key words: coenzyme Q10, adenosine, inosine, hypoxanthine, xanthine, uric acid, alpha-tocopherol, gamma-tocopherol, beta-carotene, TBARS, multiple sclerosis

ÚVOD

Skleróza multiplex (SM) patrí medzi najčastejšie chronické neurologické ochorenia. Je to zápalovo-neurodegeneratívne ochorenie centrálného nervového systému (CNS), pri ktorom dochádza k demyelinizácii a axonálnej strate v CNS. Na podklade patologickej imunologickej reakcie vzniká multiložiskové poškodenie mozgu a miechy, ktoré sa prejavuje funkčným zneschopnením pacienta s typickým kolísavým priebehom. V skorých štádiách rozvoja lézií dochádza k poruche hematoencefalickej bariéry a k invázii hematogénnych monocytov a T-buniek do tkaniva mozgu, ktorých následná aktivita predstavuje základ pre začiatok a progresiu ochorenia Tieto bunky invadujúce nervový systém participujú v zápalovej reakcii spojennej s produkciou voľných radikálov, ktoré môžu poškodzovať tkanivo CNS lipoperoxidáciou, depléciou intracelulárnych energetických zásob v dôsledku inhibície mitochondriálneho elektrónového transportného reťazca, spotrebou intracelulárnych antioxidantov a poškodením DNA (4,12,16).

Hlavným zdrojom energie v axónoch je ATP produkované mitochondriami. Mitochondrie okrem produkcie ATP majú dôležitú úlohu aj v udržiavaní kalcia a v produkcii reaktívnych látok kyslíka (ROS). Dá sa predpokladať, že dysfunkcia mitochondrií v axónoch asociovaná s absenciou zdravých myelinových pošiev a s redistribúciou sodíkových kanálov spôsobí, že demyelinizované axóny budú citlivejšie na deficit energie ako myelinizované axóny (16). Tieto zvýšené energetické

požiadavky demyelinizovaných/remyelinizovaných axónov pri zlyhaní mitochondrií, čo je sprevádzané depléciou makroergických fosfátov, môžu byť jednou z možných príčin axonálnej degenerácie a následných klinických prejavov MS (16). V tejto súvislosti nás zaujímalo ako sa zvýšené energetické požiadavky axónov a dysfunkcia mitochondrií odrazia v metabolizme purínových nukleotidov, v antioxidačnej kapacite plazmy a v plazmatických hladinách koenzýmu Q10, ktorý je indikátorom bioenergetického stavu a vyznačuje sa tiež antioxidačnými vlastnosťami.

PACIENTI A METÓDY

Vyšetrovaný súbor pozostával z 24 pacientov (ženy, priemerný vek $37,6 \pm 10,7$ (19–59 rokov)) s klinicky a laboratórne potvrdenou diagnózou skleróza multiplex (SM). Všetci SM pacienti mali pozitívny dôkaz prítomnosti oligoklonálnych pásov (OP) v cerebrospinálnom likvore (CSF). Kontrolnú skupinu tvorilo 15 neurologických pacientov (ženy, priemerný vek $36,3 \pm 13,0$ (16–54 rokov)) s diagnózou G43–G44, ktorí mali základné likvorologické parametre (celkové bielkoviny, albumín, chloridy, glukóza, elementy, IgG index) v rámci fyziologickej normy, bez závažných celkových ochorení.

Likvorové hladiny degradačných produktov purínových nukleotidov, kyseliny močovej (KM), hypoxantínu (HYP), xantínu (XAN), inozínu (INO) a adenosínu (ADO) sme stanovili pomocou vysokoučinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC) s UV detekciou. Mobilná fáza obsahovala 60 mmol/L roztok dihydrogénfosforečnanu draselného upraveného kyselinou trihydrogénfosforečnou na pH 2,9 a 2 % metanolu (v/v). Separované látky sme detegovali spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 254 nm.

Plazmatické hladiny koenzýmu Q10, alfa-tokoferolu, gama-tokoferolu a beta-karoténu sme stanovili modifikovanou HPLC metódou s UV detekciou pri 275 nm (CoQ10), 295 nm (tokoferoly) a 450 nm (beta-karotén) (13,14). Marker lipoperoxidácie MDA, vyjadrený ako TBARS (látky reagujúce s kyselinou tiobarbiturovou), sme stanovili spektrofotometricky pri 532 nm podľa Janero a Burghardt (8).

Výsledky boli hodnotené pomocou štandardných štatistických postupov (Kolmogorov-Smirnov test, Spearmanov korelačný test).

VÝSLEDKY

Analyzovaný súbor pacientov so sklerózou multiplex (SM) zložený z 24 žien s priemerným vekom $37,6 \pm 10,7$ (19–59) rokov sa vyznačoval patologicky zvýšenými hladinami IgG, dôkazom intratekálnej tvorby imunoglobulínu IgG vyjadrenej zvýšenými hodnotami IgG indexu a hodnotou Reiberovho vzťahu (Tab 1). V porovnaní s kontrolnou skupinou mali SM pacienti zvýšené likvorové hladiny kyseliny močovej ($p=0,04$), xantínu

Tab. 1. Hladiny niektorých biochemických parametrov v cerebrospinálnom likvore (L) a v sére (s) u pacientov so sklerózou multiplex (SM) a v kontrolnom súbore

| Parameter | Kontrola (n = 15) | SM (n = 24) |
|------------------------|---|---|
| Vek (roky) | $36,3 \pm 13,0$ (15–54) MED = 38,0 | $37,6 \pm 10,7$ (19–59) MED = 37,0 |
| IgG - L | $0,021 \pm 0,006$ (0,012–0,027) MED = 0,021 | $0,072 \pm 0,047$ (0,023–0,228) MED = 0,064 p < 0,0001 |
| IgG - s | $9,65 \pm 2,26$ (7,06–14,29) MED = 8,58 | $11,37 \pm 1,78$ (8,44–15,2) MED = 11,1 p = 0,0225 |
| Albumín - L | $0,19 \pm 0,06$ (0,134–0,342) MED = 0,179 | $0,25 \pm 0,11$ (0,114–0,543) MED = 0,245 |
| Albumín - s | $42,1 \pm 3,9$ (37,3–48,7) MED = 42,0 | $42,2 \pm 3,7$ (33,0–47,7) MED = 43,05 |
| Q albumín | $4,65 \pm 1,25$ (3,13–7,45) MED = 4,01 | $5,98 \pm 2,61$ (2,66–11,48) MED = 5,56 |
| IgG index | $0,48 \pm 0,05$ (0,41–0,58) MED = 0,48 | $1,07 \pm 0,46$ (0,68–2,43) MED = 0,87 p < 0,0001 |
| RIG | 0 | $26,8 \pm 38,5$ (0,26–166,8) MED = 15,1 p < 0,0001 |
| Oligoklonálne pásy (n) | 0 | $13,8 \pm 8,6$ (3–30) MED = 11 p < 0,0001 |

($p=0,002$), hypoxantínu ($p=0,09$), inozínu ($p=0,002$) a signifikantne znížené likvorové hladiny adenosínu ($p=0,003$) (Tab. 2). V porovnaní s kontrolným súborom sme u SM pacientov tiež zaznamenali signifikantne zvýšený metabolický obrat adenosínu na inozín vyjadrený pomerom ADO/INO ($p < 0,0001$) (Tab. 2). Na zvýšenú intenzitu degradácie purínových nukleotidov poukazujú aj alterácie v korelačných vzťahoch medzi jednotlivými metabolitmi a ich prekurzormi. (Tab. 4). Tieto korelačné zmeny sa pozorovali najmä medzi hypoxantínom a jeho prekurzorom inozínom (HYP-INO) a kyselinou močovou a xantínom (KM-HYP) (Tab. 4).

Plazmatické koncentrácie koenzýmu Q10 (CoQ10) u SM pacientov boli znížené (u 37,5 % SM) alebo sa

Tab. 2. Hladiny degradačných produktov purínových nukleotidov v cerebrospinálnom likvore u pacientov so sklerózou multiplex (SM) v porovnaní s kontrolným súborom

| Parameter | Kontrola (n=15) | SM (n=24) |
|----------------------|---|---|
| Kyselina močová (KM) | 15,8 ± 5,7 (4,8-29,9) MED = 15,1 | 22,1 ± 11,3 (11,28-57,02) MED = 17,5 p = 0,04 |
| Hypoxantin (HYP) | 2,30 ± 0,91 (0,84-3,93) MED = 2,04 | 3,06 ± 1,44 (0,75-7,53) MED = 2,76 P = 0,0958 |
| Xantin (XAN) | 1,58 ± 0,59 (0,69 - 2,96) MED = 1,43 | 2,46 ± 1,08 (1,35 - 6,11) MED = 2,21 p = 0,0024 |
| Inozín (INO) | 0,85 ± 0,34 (0,26-1,43) MED = 0,85 | 1,26 ± 0,37 (0,71-1,96) MED = 1,15 p = 0,0018 |
| Adenozín (ADO) | 0,48 ± 0,17 (0,25-0,90) MED = 0,46 | 0,29 ± 0,21 (0,08-0,86) MED = 0,22 p = 0,0027 |
| KM/XAN | 11,08 ± 5,13 (3,36-21,13) MED = 10,84 | 8,61 ± 2,67 (3,94-15,12) MED = 8,44 |
| XAN/HYP | 0,72 ± 0,21 (0,44-1,25) MED = 0,65 | 0,90 ± 0,40 (0,54-2,52) MED = 0,82 p = 0,0673 |
| HYP/INO | 2,88 ± 1,06 (1,54 - 5,84) MED = 2,89 | 2,53 ± 1,02 (0,45 - 4,62) MED = 2,69 |
| INO/ADO | 2,02 ± 1,16 (0,48-5,18) MED = 2,02 | 6,37 ± 3,98 (1,1-17) MED = 5,50 p < 0,0001 |

nachádzali v dolnom rozsahu referenčných hodnôt (Obr. 1, Tab. 3). Podobný trend sa pozoroval aj v koncentrácii beta-karoténu (Tab. 3). Patologické hodnoty beta-karoténu v plazme sa vyskytovali u 42 % SM pacientov. Najvyšší deficit z analyzovaných vitamínov sa pozoroval u gama-tokoferolu, kde patologické hodnoty malo takmer 80 % pacientov. (Tab. 3). Hladiny alfa-tokoferolu v plazme sa od referenčných hodnôt významne nelíšili (Obr. 2). Znížené hodnoty alfa-tokoferolu sa pozorovali len v 2 prípadoch (2/24; 7,1 % SM) (Tab. 3). Hodnoty TBARS, markera lipoperoxidácie, boli zvýšené u 81 % SM pacientov (Tab. 3)

Plazmatické hladiny CoQ10 korelovali s alfa-tokoferolom ($r=0,3861, p=0,06$), adenozínom ($r=0,3638, p=0,080$)

Tab. 3. Korelácie medzi degradačnými produktmi purínových nukleotidov v cerebrospinálnom likvore u pacientov so sklerózou multiplex (SM) a v kontrolnom súbore

| Parameter | Kontrola | SM |
|-----------|---|---|
| INO-ADO | $r=0,025106$ $p=0,9292$ | $r=0,13707$ $p=0,523$ |
| HYP-INO | $r=-0,247106$ $p=0,3746$ | $r=0,36254$ $p=0,0817$ |
| XAN-HYP | $r=0,83175$ $p=0,0001$ | $r=0,8642$ $p<0,0001$ |
| KM-HYP | $r=-0,1131$ $p=0,688$ | $r=0,2073$ $p=0,3310$ |
| KM-XAN | $r=0,04099$ $p=0,8847$ | $r=0,3511$ $p=0,0925$ |

Tab. 4. Korelácie medzi degradačnými produktmi purínových nukleotidov v cerebrospinálnom likvore u pacientov so sklerózou multiplex (SM) a v kontrolnom súbore

| Parameter | Kontrola | SM |
|-----------|---|---|
| INO-ADO | $r=0,025106$ $p=0,9292$ | $r=0,13707$ $p=0,523$ |
| HYP-INO | $r=-0,247106$ $p=0,3746$ | $r=0,36254$ $p=0,0817$ |
| XAN-HYP | $r=0,83175$ $p=0,0001$ | $r=0,8642$ $p<0,0001$ |
| KM-HYP | $r=-0,1131$ $p=0,688$ | $r=0,2073$ $p=0,3310$ |
| KM-XAN | $r=0,04099$ $p=0,8847$ | $r=0,3511$ $p=0,0925$ |

a signifikantne xantínom ($r=0,4160, p=0,043$), prekuzorom kyseliny močovej (Tab. 5, Obr. 3).

DISKUSIA

Prezentované výsledky poukazujú, že analyzovaná skupina pacientov so sklerózou multiplex (SM) sa v skorých štádiách ochorenia vyznačuje poruchami v metabolizme purínových nukleotidov spojených so zníženou antioxidantnou a neuroprotektívnou ochranou. K niektorým podobným výsledkom prišli viacerí autori (1, 2, 15, 17, 18). U pacientov so sklerózou multiplex sme v cerebrospinálnom likvore (CSF) zaznamenali

Tab. 5. Korelácie plazmatických hladín CoQ10 s degradačnými produktmi purínových nukleotidov v cerebrospinálnom likvore (CSF), hladinami niektorých vitamínov v plazme a množstvom oligoklonálnych pásov (OP) v CSF

| parametre | Korelácie s CoQ10 | |
|-----------------|--------------------|-------------------|
| adenozín | r = 0,36378 | p = 0,0806 |
| inozín | r = 0,11910 | p = 0,5794 |
| hypoxantín | r = 0,289 | p = 0,1704 |
| xantín | r = 0,41601 | p = 0,0432 |
| kyselina močová | r = -0,21350 | p = 0,3165 |
| INO/ADO | r = -0,29304 | p = 0,1646 |
| HYP/INO | r = 0,08458 | p = 0,6944 |
| XAN/HYP | r = 0,21175 | p = 0,3206 |
| KM/XAN | r = -0,33338 | p = 0,1201 |
| Alfa-tokoferol | r = 0,3861 | p = 0,0624 |
| Gama-tokoferol | r = 0,20917 | p = 0,3266 |
| Beta-karotén | r = 0,217505 | P = 0,3073 |
| OP | r = -0,161309 | p = 0,4514 |

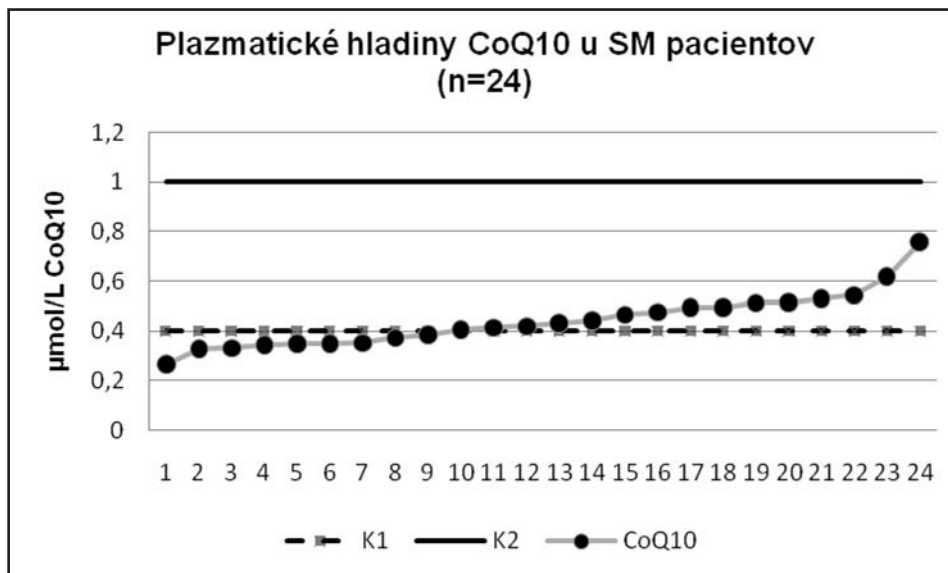
signifikantný pokles hladín adenosínu ($0,29 \pm 0,21$ vs $0,48 \pm 0,17$; $p = 0,0027$), štatisticky významné zvýšenie hladín inozínu ($1,26 \pm 0,37$ vs $0,85 \pm 0,34$; $p = 0,0018$), kyseliny močovej ($22,1 \pm 11,3$ vs $15,8 \pm 5,7$; $p = 0,04$), xantínu ($2,46 \pm 1,08$ vs $1,58 \pm 0,59$; $p = 0,0024$) a zníženie likvorových hladín hypoxantínu ($3,06 \pm 1,44$ vs $2,30 \pm 0,91$; $p = 0,0958$) (Tab. 2). Degradácia adenínových nukleotidov sa aktivuje v situáciách spojených s poklesom množstva adenosíntrifosfátu (ATP) a vzostupom adenosínmonofosfátu (AMP) pri narušení fyziologického stavu alebo pri zvýšenej funkčnej aktivite tkaniva. Z tohto dôvodu nás zaujímalo, či sa zistené alterácie v metabolizme purínových nukleotidov u SM pacientov odrzkadlia aj v plazmatických hladinách koenzýmu Q10 (CoQ10), ktorý je indikátorom bioenergetického stavu a funguje tiež ako antioxidant. Spolu s CoQ10 sme v plazme stanovovali aj hladiny antioxidantov alfa a gama-tokoferolu a beta-karoténu a marker lipoperoxidácie TBARS.

V porovnaní s referenčnými hodnotami (Tab.3) sa prevažná väčšina SM pacientov vyznačovala zníženými plazmatickými hladinami CoQ10 a ďalších analyzovaných antioxidantov a zvýšením hladín markera lipoperoxidácie TBARS. Pozorovaný plazmatický deficit CoQ10 ($0,44 \pm 0,11$ $\mu\text{mol/L}$) (obr. 1, Tab. 3), antioxidantov beta-karoténu a gama-tokoferolu (Tab. 3) a zvýšenie plazmatických hladín TBARS u 80 % SM pacientov (Tab. 3) odrzkadľuje zvýšenú spotrebu antioxidantov voľnými radikálmi, ktoré sa tvoria v zápalových reakciách po

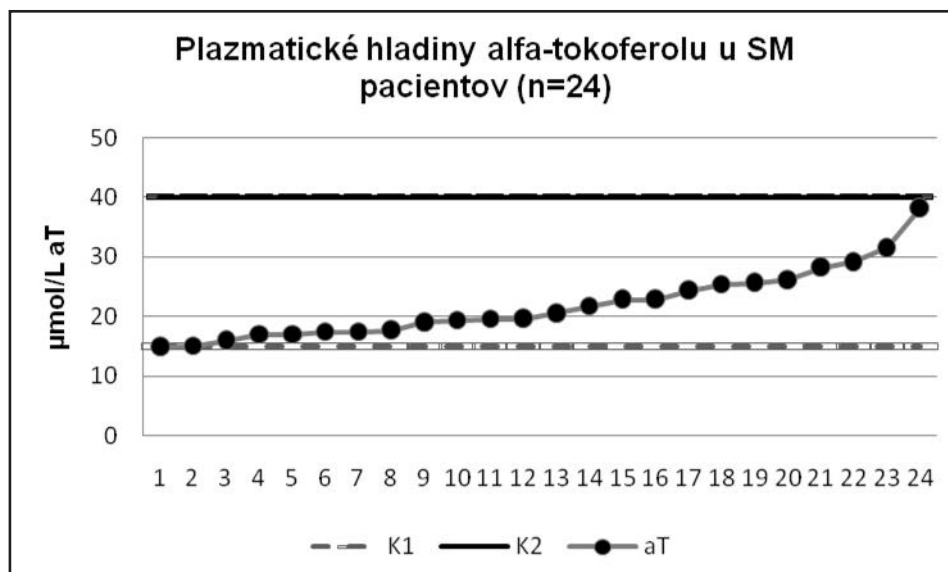
invázii hematogénnych monocytov a T buniek do tkaniva mozgu. Zápalový proces, ktorý je najvýraznejší v aktívnych léziách, môže v dôsledku deplécie antioxidantov viesť k zníženej antioxidantnej ochrane CNS. V takejto situácii bude organizmus v snahe chrániť CNS pred voľnými radikálmi pravdepodobne mobilizovať najprv antioxidanty, ktoré môžu prenikať funkčnú hematolikorovú bariéru. Korelácie plazmatických hladín CoQ10 s likvorovými hladinami adenosínu ($r = 0,33637$; $p = 0,0806$), xantínu ($r = 0,41601$; $p = 0,0432$) a s plazmatickými hladinami alfa-tokoferolu ($r = 0,3861$; $p = 0,0624$) (Tab. 5, Obr. 3) poukazujú, že CoQ10 je zahrnutý okrem mechanizmov, ktoré vedú k alteráciám v metabolizme purínových nukleotidov (Tab. 2), aj v procesoch regenerácie alfa-tokoferolu (Obr. 3).

Koenzým Q10 je esenciálny faktor pre tvorbu ATP v procese oxidačnej fosforylácie prebiehajúcej v mitochondriách. Prenáša elektróny z komplexu I (NADH CoQ reduktáza) na komplex III (cytochróm bc1 komplex) alebo z komplexu II (sukcinátdehydrogenáza) na komplex III (Obr. 4). Deficit CoQ10 pri zvýšených energetických požiadavkách axónov spôsobuje pokles produkcie ATP a aktiváciu procesov, ktoré vedú po degradácii ATP na AMP k defosforylácii AMP enzýmom 5'-nukleotidázou na adenosín, ktorý sa ďalej deaminuje enzýmom adenosindeaminázou na inozín. Tento energetický deficit u pacientov so sklerózou multiplex indikuje aj signifikantný vzostup metabolického obratu adenosínu na inozín (INO/ADO) ($6,4 \pm 4,0$; vs $2,02 \pm 1,16$ $p < 0,0001$) (Tab. 2). Pri fyziologických koncentráciách ATP je preferovaná deaminácia AMP na inozínmonofosfát (IMP), pretože ATP je aktivátorom adenylátdeaminázy a silným inhibítorom 5'-nukleotidázy (6). Pozorované alterácie v metabolizme purínových nukleotidov u pacientov so sklerózou multiplex sú zaujímavé aj z hľadiska výsledkov niektorých experimentálnych prác (7, 19), ktoré poukazujú na terapeutický efekt niektorých metabolitov purínových nukleotidov. Na zvieracom modeli sklerózy multiplex, klinickej experimentálnej autoimunitnej encefalomyelitide (EAE), sa zistilo, že terapeutické dávky kyseliny močovej (KM) podanej pred nástupom EAE zabraňovali invázii zápalových buniek do CNS a vzniku ochorenia (7). Terapeutický efekt sa pozoroval aj po podaní prekursora KM inozínu (19) Tento efekt bol asociovaný so zvýšením hladín KM v tkanive CNS a s inaktiváciou peroxynitritu a látok produkovaných monocytmi, ktoré prispievali k tkanivovej patológii CNS

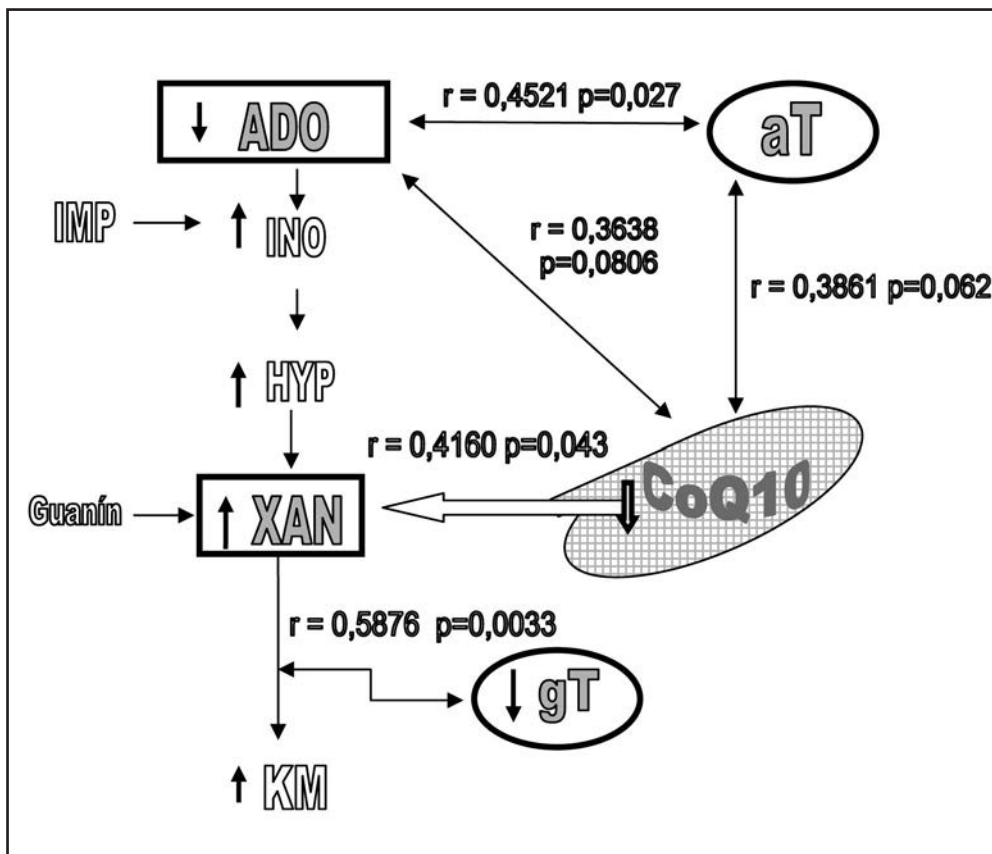
Vitamín E, ktorý sa vyskytuje vo forme alfa-, beta-, gama-, a delta-tokoferolov, sa vyznačuje antioxidantnou, protizápalovou a antikarcinogénnou aktivitou (3, 5). Hlavnou formou vitamínu E v krvi a v tkanivách je alfa-tokoferol, ktorého základnou funkciou je ukončiť reťazovú reakciu lipoperoxidácie a takto chrániť bunkové membrány a LDL častice pred oxidačnou dezintegráciou. Pri ochorení skleróza multiplex má alfa-tokoferol okrem jeho antioxidantných účinkov, ktoré sa prejavujú v jeho antiapoptickom efekte a ochrane axónov pred demyelinizáciou, tiež pozitívny efekt na proces remyelinizácie



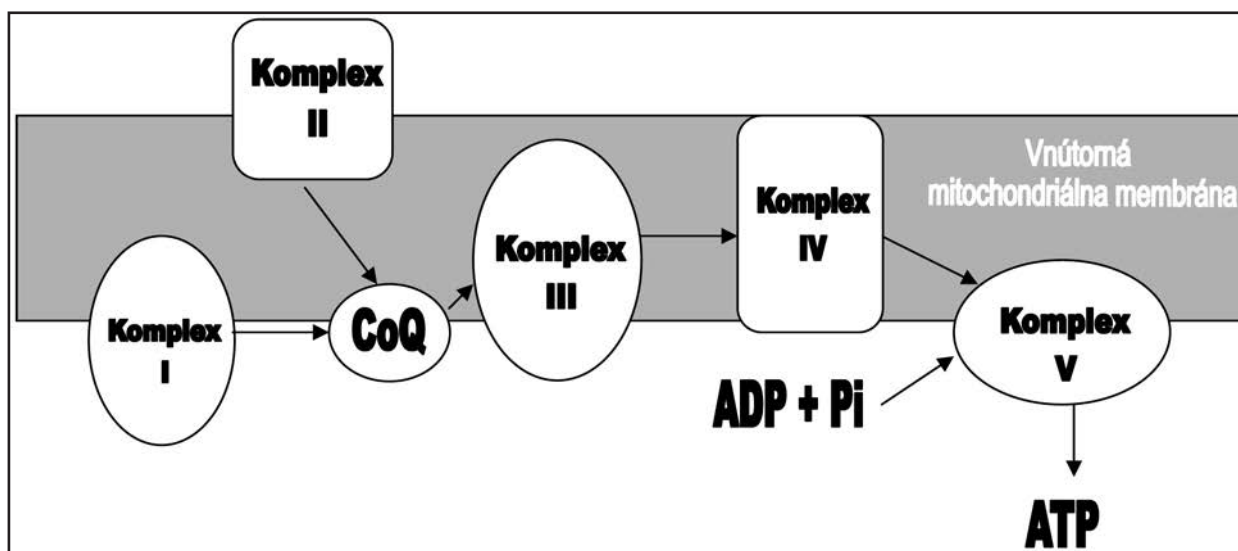
Obr. 1. Hladiny koenzýmu Q10 (CoQ10) v plazme u pacientov so sklerózou multiplex (SM; n=24).
k1, k2 - referenčné hodnoty CoQ10 v plazme (0,4-1,0 μmol/L)



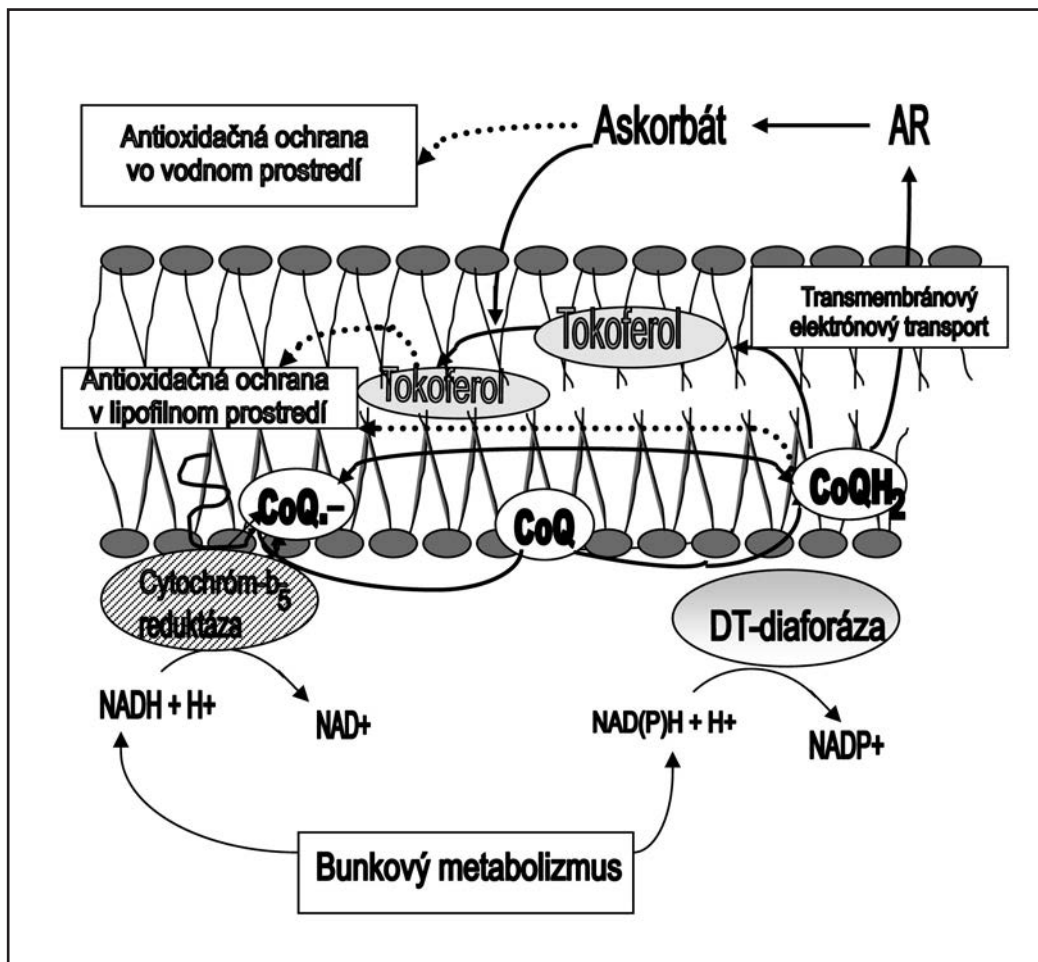
Obr. 2. Hladiny alfa-tokoferolu (aT) v plazme u pacientov so sklerózou multiplex (SM; n=24).
k1, k2 - referenčné hodnoty alfa-tokoferolu v plazme (15-40 μmol/L)



Obr. 3 Korelačné vzťahy medzi degradačnými produktmi purínových nukleotidov a koenzýmom Q10 (CoQ10), alfa a gama-tokoferolom (aT, gT).
 ADO - adenosín, INO - inozín, HYP - hypoxantín, XAN - xantín, KM - kyselina močová



Obr. 4. Kľúčová úloha koenzýmu Q10 (CoQ10) pri transporte elektrónov z komplexu I a II na komplex III v respiračnom reťazci mitochondrií (Rodriguez-Hernandez a spol. 2009)



Obr. č. 5. Interakcie medzi koenzýmom Q10 (CoQ10) a alfa-tokoferolom v antioxidačnej ochrane lipofilného prostredia bunky

endogénnymi progenitornými bunkami (5). Vzhľadom na absenciu korelácie alfa-tokoferolu s likvorovými metabolitmi purínov nie je pravdepodobné, že by sa alfa-tokoferol v našej skupine SM pacientov priamo podieľal na alteráciách v metabolizme purínových metabolitov (Obr. 3)

Jeho izomér gama-tokoferol vykazuje pozitívnu signifikantnú koreláciu s premenou xantínu na kyselinu močovú (Obr. 3) vyjadrenú metabolickým obratom KM/XAN. Gama-tokoferol má silnejšiu protizápalovú aktivitu ako alfa-tokoferol (3). Účasť gama-tokoferolu v procese degradácie purínových nukleotidov súvisí pravdepodobne s jeho schopnosťou účinne vychytávať NO a iné voľne radikály dusíka a so skavendžerovou aktivitou kyseliny močovej, ktorá účinne vychytáva peroxynitrit vznikajúci reakciou NO so superoxidovým radikálom

Beta-karotén vzhľadom na absenciu korelačnej asociácie s degradáciou purínových nukleotidov nemá významný podiel na pozorovaných metabolických alteráciách.

ZÁVER

Analyzovaný súbor pacientov so sklerózou multiplex má zvýšenú degradáciu purínových nukleotidov v CNS, čo pravdepodobne súvisí aj so zníženou antioxidačnou ochranou reprezentovanou plazmatickými hladinami lipofilných vitamínov beta-karoténom, gama-tokoferolom a energetickým indikátorom CoQ10, ktorý je tiež antioxidantom. Znížené hladiny CoQ10 v plazme korelujú s plazmatickými hladinami alfa-tokoferolu a s degradačnými produktmi purínových nukleotidov, adenozinom a xantínom, čo poukazuje na účasť CoQ10 v procesoch regenerácie alfa-tokoferolu a jeho možnom zahrnutí v mechanizmoch spôsobujúcich alterácie v metabolizme purínových nukleotidov. Výsledky naznačujú, že suplementácia CoQ10 (a deficitných vitamínov) by mohla priaznivo ovplyvniť priebeh reparačných procesov v demyelinizovaných axónoch vo včasnom štádiu tohto ochorenia.

LITERATÚRA

1. Amorini, A. M., Petzold, A., Tavazzi, B. a spol.: Increase of uric acid and purine compounds in biological fluids of multiple sclerosis patients. *Clin. Biochem.* 2009; 42: 1001–1006.
2. Besler, H. Z., Comoglu, S., Okcu, Z.: Serum levels of antioxidant vitamins and lipid peroxidation in multiple sclerosis. *Nutr. Neurosci.* 2002; 5(3): 215–220.
3. Chung, S. Y., Gang, L., Jihyeung, J., Guang, X. L.: Inhibition of inflammation and carcinogenesis in the lung and colon by tocopherols. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2010; 1203: 29–34
4. Giovannoni, G., Heales, S. J., Land, J. M., Thompson, E. J.: The potential role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 1998; 4(3): 212–216
5. Gourdarzvand, M., Javan, M., Mirnajafi-Zadeh, J., Mozafari, S., Tiraihi, T.: Vitamins E and D3 attenuate demyelination and potentiate remyelination process of hippocampal formation of rats following local injection of ethidium bromide. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2010; 30(2): 289–299.
6. Hartman, S. C. Purines and pyrimidines. In: Greenborg, D. M. (ed.): *Mehabolic pathways, IV.* Academic Press, New York an London 1970, 499.
7. Hooper, D. C., Scott, G. S. Zborek, A., Mikheeva, T., Kean, R. B., Koprowski, H., Spitsin, S. V.: Uric acid, a peroxynitrite scavenger, inhibic CNS inflammation, blood-CNS barrier permeability changes, and tissue damage in a mouse model of multiple sclerosis. *FASEB J* 2000; 14(5): 691–698.
8. Janero, D. R., Burghardt, B.: Thiobarbituric acid-reactive malondialdehyde formation during superoxide-dependent, iron-catalyzed lipid peroxidation. Influence of peroxidation conditions. *Lipids* 1889; 24: 125–131.
9. Jiang, Q., Ames, B. N.: Gamma-tocopherol, but not alpha-tocopherol, decreases proinflammatory eicosanoids and inflammation damage in rats. *FASEB J.* 2003; 17: 816–822.
10. Jiang, Q., Freiser, H., Wood, K. V, Yin, X.: Identification and quantitation of novel vitamin E metabolites, sulfated long-chain carboxychromanals, in human A549 cells and in rats, *J. Lipid Res.* 2007; 48: 1221–1230.
11. Kalnovičová, T., Traubner, P., Turčáni, P.: Plazmatické hladiny kyseliny močovej u pacientiek so sklerózou multiplex - klinický význam. *Laboratórna diagnostika* 2007; 12(1): 11–15.
12. Kalnovičová, T., Turčáni, P.: Kyselina močová a jej úloha v patogenéze sklerózy multiplex. *Laboratórna Diagnostika* 2009; 14(1–2): 126–130.
13. Kucharská, J., Gvozdjáková, A., Mizera, S., Braunová, Z., Schreinerova, Z., Schrameková, E. Pecháň, I., Fabián, J.: Participation of coenzyme Q10 in the rejection development of the transplanted heart clinical study, *Physiol. Res.* 1998; 47: 399–404.
14. Lang, J. K., Gohil, L., Packer, L.: Simultaneous determination of tocopherols, ubiquinols, and ubiquinones in blood, plasma, tissue homogenates, and subcellular fractions. *Anal. Biochem.* 1986; 157: 106–116.
15. Lazzarino, G. Amorini, A. M., Eikelenboom, M. J.: Cerebrospinal fluid metabolites in multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 2010; 16(5): 549–554.
16. Mahad, D., Lassmann, H., Turnbull, D.: Mitochondria and disease progression in multiple sclerosis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2008; 34(6): 577–589.
17. Molyneux, S. L., Young, J. M., Florkowski, C. M., Lever, M., George, P. M.: Coenzyme Q10: is there a clinical role and a case for measurement? *Clin. Biochem. Rev.* 2008; 29(2): 71–82.
18. Salemi, G., Gueliu, M. C., Vitale, F. a spol.: Blood lipids, homocysteine, stress factors, and vitamins in clinically stable multiple sclerosis patients. *Lipids Health Dis.* 20910: 9: 19–25.
19. Scott, G. S., Spitsin, S., Kean, R. B., Mikheeva, T., Koprowski, H., Hooper, D. C.: Therapeutic intervention in experimental allergic encephalomyelitis by administration of uric acid precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99(25): 16303–16308.

PROKALCITONÍN - BIOCHÉMIA, GENETIKA A FYZIOLOGIA

Renáta Lenártová¹, Anna Birková²
Juraj Guzy², Mária Mareková^{2*}

¹LABMED, a.s., Srbská 4, 040 01 Košice
²Ústav lekárskej a klinickej biochémie UPJŠ LF
v Košiciach, Tr. SNP 1, 040 01 Košice
*maria.marekova@upjs.sk

SÚHRN

Prokalcitonín je proteín, ktorý je od roku 1993 známy nielen ako prekursor hormónu kalcitonínu, ale aj ako marker sepsy. Neskôr sa zistilo, že nárast jeho koncentrácie v plazme stimuluje predovšetkým bakteriálny lipopolysacharid. Prokalcitonín dokázu produkovať mnohé typy buniek. Jeho presná úloha počas generalizovanej bakteriálnej infekcie je stále predmetom výskumu.

SUMMARY

Since the year 1993 is protein procalcitonin known not only as hormones calcitonin precursor, but also as the marker of sepsis. Later was found, that increasing of procalcitonins plasmatic concentration is stimulated mainly by bacterial lipopolysaccharide. Many cell types can produce procalcitonine. The exact role of procalcitonine during generalized bacterial infection is still unknown and subject of research.

ÚVOD

Od 90. rokov 20. storočia sú diagnostické možnosti u pacientov s akútnymi zápalovými stavmi rozšírené o spektrum pro- a protizápalových cytokínov. Cytokíny ako mediátory prvého sledu pri imunitnej odpovedi organizmu predchádzajú o 6–24 hodín nástup proteínov akútnej fázy (APP - Acute Phase Proteins).

Tento časový benefit predstavuje hlavnú výhodu cytokínov oproti APP. Vyšetrenie cytokínov sa z metodologických a ekonomických dôvodov nestalo rutinnou metódou. Prokalcitonín (PCT) - pred rokom 1993 známy iba ako prekursor hormónu kalcitonínu, je svojimi vlastnosťami na rozhraní cytokínov, hormónov, proteínov akútnej fázy a postupne sa zapája do siete zápalových mediátorov. V súčasnosti prebieha klinický výskum s cieľom dokázať, nakoľko je PCT senzitívnym a špecifickým indikátorom systémového bakteriálneho zápalu, s využitím v medicínskej diagnostike. Súčasne s novými poznatkami o prozápalových a protizápalových cytokínoch, APP a ich zaradení

medzi faktory kompenzačnej protizápalovej odpovede sa objavujú nové hypotézy a teórie hodnotiace napr. význam PCT pri zápale, regulačné väzby cytokínov, PCT a APP v priebehu obrannej reakcie. V situácii, keď ešte nepoznáme niektoré základné fyziologické vlastnosti tohto proteínu, prechádza PCT neodvratne zo sféry výskumu do bežnej diagnostickej praxe. Hodnotí sa jeho diagnostická výťažnosť, špecificita a senzitivita v akútnej a transplantáčnej medicíne. Významné sa zdá byť jeho využitie pri stavoch, kde štandardné diagnostické postupy majú svoje obmedzenia, napr. pri včasných pooperačných infekčných komplikáciách.

1. CHARAKTERISTIKA PCT

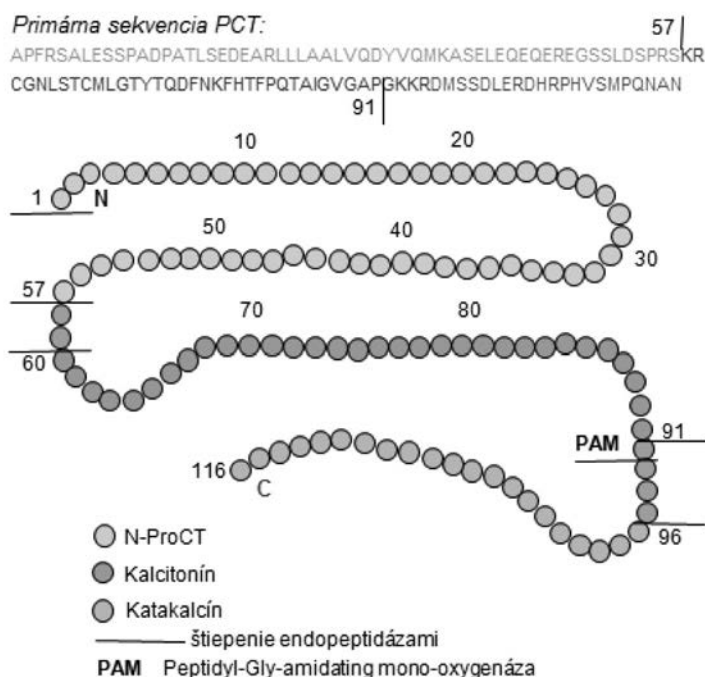
1.1 História prokalcitonínu

V roku 1962 bol podaný prvý nepriamy dôkaz existencie tretieho calciotropného hormónu, neskôr nazvaného kalcitonín. Zdroj nového hormónu bol lokalizovaný v štítnej žľaze. V roku 1975 bol objavený intracelulárny prekursor kalcitonínu - preprokalcitonín a jeho štiepne produkty, včítane PCT. Jeho štruktúra ako glykoproteínu je známa od roku 1981. V roku 1983 prenikol do diagnostiky po jeho detekcii v sére krýs s medulárnym karcinómom štítnej žľazy. V roku 1986 boli rovnaké výsledky získané aj u pacientov s touto chorobou. Assicot *a kol.* (1993) zaznamenali extrémne vysoké hodnoty plazmatického PCT u septických pacientov. V roku 1994 je za hlavného stimulátora tvorby PCT počas zápalu označený bakteriálny lipopolysacharid (LPS, endotoxín). Plazmatický PCT sa v nasledujúcich rokoch začal uplatňovať v diagnostike akútnych stavov ako senzitívny a vysoko selektívny marker systémovej bakteriálnej infekcie. Až v roku 2000 sa podarilo objasniť zdroj zápalového prokalcitonínu. Na rozdiel od klasických hormónov nie je tvorený endokrinnou žľazou, ale na jeho produkciu sa v priebehu reakcie akútnej fázy podieľa viacero bunkových typov. Maximálna syntéza PCT bola zaznamenaná v pečeňových bunkách a v tukovom tkanive.

1.2 Biochemická charakteristika

Prokalcitonín je proteín tvorený C-bunkami štítnej žľazy, pozostávajúci zo 116 aminokyselín a s molekulovou hmotnosťou 13 kD. Štruktúra reťazca PCT detegovateľného v plazme počas zápalu je identická so štruktúrou známeho peptidu, ktorý je prohormónom kalcitonínu (Obr. 1).

PCT je v endoplazmatickom retikule C-buniek štítnej žľazy premenený na kalcitonín, nedochádza k jeho uvoľneniu do obehu. Hladina prokalcitonínu u zdravých jedincov je nízka, často pod detekčným limitom. V plazme pravdepodobne neexistujú enzýmy, ktoré by cirkulujúci PCT štiepili. Ak u prokalcitonínu neprebehne intracelulárna proteolýza a je secernovaný do obehu, zostáva v nezmenenej podobe s polčasom 25–30 hodín.



Obr. 1. Štruktúra PCT

Za hlavný eliminačný mechanizmus cirkulujúceho PCT sú považované obličky. U pacientov s vysokými plazmatickými hladinami PCT boli stanovené významné koncentrácie aj v moči. Úvahy o kinetike PCT v obličkách sa opierajú o znalosti iných proteínov s rovnakou molekulovou hmotnosťou. Nepodarila sa dokázať korelácia plazmatickej hladiny prokalcitonínu so stupňom renálnej insuficiencie. Tento poznatok naopak vedie k teórii o obličkách ako o minoritnej exkretnej ceste. Uvažuje sa, že PCT je podobne ako prevažná väčšina plazmatických proteínov degradovaný proteolytickým štiepením (Ricci a Ronco, 2005).

1.3 Genetická charakteristika

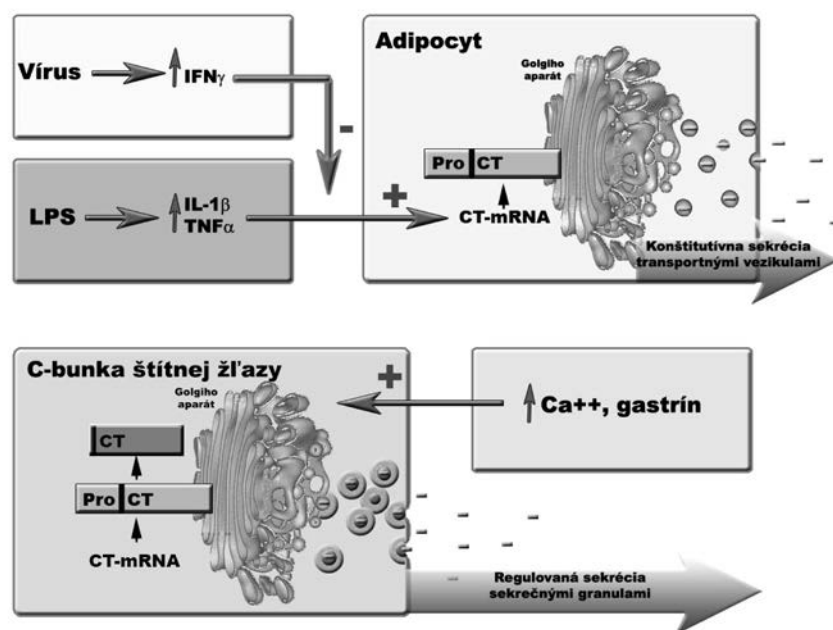
Predpokladá sa, že PCT uvoľnený pri zápale je kódovaný rovnakým génom ako prekursor kalcitonínu v C-bunkách štítnej žľazy. Gén pre prekursor kalcitonínu, ktorý je uvoľňovaný C-bunkami štítnej žľazy a je známy ako CALC-I a u človeka je lokalizovaný na krátkom ramienku 11. chromozómu.

Hypoteticky môže existovať iný, zatiaľ neznámy gén tejto skupiny, ktorý je indukovaný počas zápalu a zodpovedá za syntézu zápalového PCT. Predpokladá sa, že jeho zápalová syntéza nie je exprimovaná C-bunkami štítnej žľazy a regulácia jeho transkripcie je podobná prozápalovým cytokínom, vrátane TNF- α a IL-6.

1.4 Tvorba a regulácia PCT v priebehu zápalu

Prokalcitonín detegovateľný v plazme počas zápalu nie je tvorený C-bunkami štítnej žľazy, keďže dynamika zmien pri zápale má rovnaký charakter aj u jedincov po tyreoidektómii. Za kódovanie PCT počas zápalu je zodpovedný pravdepodobne gén CALC-I. Majoritne sa zápalový prokalcitonín tvorí v pečeni, ale schopnosť jeho tvorby počas zápalu má väčšina ľudských bunkových línií. Na určenie lokalizácie zdroja zápalového PCT prispela metóda reverznej polymerázovej reakcie (RT-PCR), využívajúca nové priméry na odlišenie rôznych foriem mRNA PCT (PCT-I, PCT-II) a mRNA CGRP-I. Russwurm *a kol.* (2001) dokázali expresiu týchto 3 foriem mRNA v 13 zo 16 testovaných ľudských tkanív. Najvyššie hodnoty boli nájdené v pečeni, v semenníkoch, pľúcach, prostate, obličkách a v tenkom čreve, v malej miere v monocytoch a makrofágoch. Za tvorbu PCT v čreve a pľúcach sú zodpovedné neuroendokrinné bunky. Minoritným zdrojom prokalcitonínu v priebehu sepsy je napr. aj hypofýza, čo popisuje vo svojej práci Kiryama *a kol.* (2002), kde v pokusoch na potkanoch boli hypofýzárne bunky vystavené pôsobeniu LPS pri súčasnej tvorbe PCT.

Od roku 2003 niektorí autori považujú za majoritný zdroj zápalového PCT tukové tkanivo. Preto sa študuje úloha adipocytov v expresii, interakciách a potenciál-



Obr. 2. Expresia génu CALC-I adipocytmi a C-bunkami štítnej žľazy. Adipocytom a iným parenchymálnym bunkách chýbajú sekrečné granuly. Preto sa po indukcii CT-mRNA prokalcitonín môže neregulovane uvoľňovať

nych úlohách produkcie peptidov odvodených od kalcitonínu. Linscheid *a kol.* (2005) dokázali produkciu PCT diferencovanými adipocytmi. Predpokladajú, že aj produkcia PCT inými bunkami je obmedzená len na diferencované bunky. Zároveň popisujú, že samotná diferenciácia adipocytov je charakterizovaná zvýšením niektorých cytokínov, napríklad IL 6.

Prokalcitonín, spolu s ďalšími peptidmi (GIP - glucose-dependent insulinotropic polypeptide a CGRP-I) sa spája s obezitou. Stimulom pre expresiu prokalcitonínu adipocytmi je GIP, čo vedie k hypotéze, že zvýšené uvoľnenie PCT môže byť spôsobené aj vysoko tukovou diétou (Timper *a kol.*, 2011).

Štruktúra tyreoidálneho a zápalového prokalcitonínu je totožná, ich regulácia sa však za fyziologických podmienok výrazne líši (Tab. 1). C-bunky štítnej žľazy reagujú na vzostup hladiny kalcia. Ako stimulatory tvorby kalcitonínu pôsobia glukokortikoidy, CGRP I a II, glukagón, gastrín, β -adrenergne podnety. Somatostatín a vitamín D naopak tvorbu kalcitonínu inhibujú. Hyperkalcémia, ani iný z uvedených faktorov nemajú vplyv na PCT, ktorý je uvoľňovaný do cirkulácie pri zápale. Jeho tvorba počas zápalu je úzko spätá s bakteriálnym endotoxínom a s prozápalovými cytokínmi. Bakteriálny endotoxín je najsilnejším stimulatorom syntézy a uvoľnenia PCT do obehu. Endotoxín aktivuje syntézu PCT a jeho uvoľnenie do obehu sprostredkované cez skupinu cytokínov.

Tab. 1. Porovnanie vlastností zápalového PCT, PCT tvoreného C-bunkami štítnej žľazy a kalcitonínu

| | Zápalový PCT | PCT tvorený C-bunkami | Kalcitonín |
|----------------------|-----------------------------|------------------------|-----------------------|
| Gén | CALC-I | CALC-I | CALC-I |
| Zdroj | hepatocyty | C bunky štítnej žľazy | C-bunky štítnej žľazy |
| Dominantná regulácia | LPS, TNF α , IL1 | hypokalcémia | hypokalcémia |
| M _r | 13 000 | 13 000 | 3 500 |
| Dĺžka retazca | 116 AMK | 116 AMK | 32 AMK |
| Polčas v cirkulácii | 25-30 h | nie je uvoľň. do obehu | 4-5 min. |
| Fyziologický význam | modulácia cytokinovej siete | hormonálny prekurzor | kalciotropný hormón |

Nijsten *a kol.* (2001) testovali indukciu prokalcitonínu a ďalších reaktantov akútnej fázy na línii pečeneých buniek. Potvrdili, že hepatocyty reagujú na podanie rekombinantného humánneho TNF- α indukciou syntézy PCT. V porovnaní s CRP a sérovým amyloidom A dosiahol PCT po tomto stimule 50 % maximálnej koncentrácie za 8 hodín, APP až za 20 hodín.

Vzostup hladiny PCT po podaní endotoxínu nastáva až po vzostupe TNF- α a IL-6, tieto dosahujú maximálne koncentrácie 90, resp. 180 min. po experimentálnom podaní endotoxínu. Prokalcitonín reaguje po 3–6 hodinách a jeho tvorba vrcholí po 6–8 hodinách. Z dôvodu dlhého polčasu hladina kulminuje medzi 12–48 hodinou. PCT stúpa niekoľko hodín po elevácii hladín TNF- α a IL-6, ale pred vzostupom hladiny CRP. Na rozdiel od prozápalových cytokínov, ktorých elevácia v zápalových situáciách je nešpecifická voči etiológii zápalu, PCT stúpa s vysokou selektivitou pri bakteriálnych infekciách (Reihart *a kol.*, 2000).

1.5 Úloha prokalcitonínu v zápalovej odpovedi

Je málo pravdepodobné, aby organizmus v priebehu zápalu svoju proteosyntetickú kapacitu poskytol na syntézu afunkčného mediátora. Aj keď doposiaľ nebola dokázaná fyziologická úloha plazmatického PCT, jeho potenciálnymi úlohami môže byť ovplyvnenie:

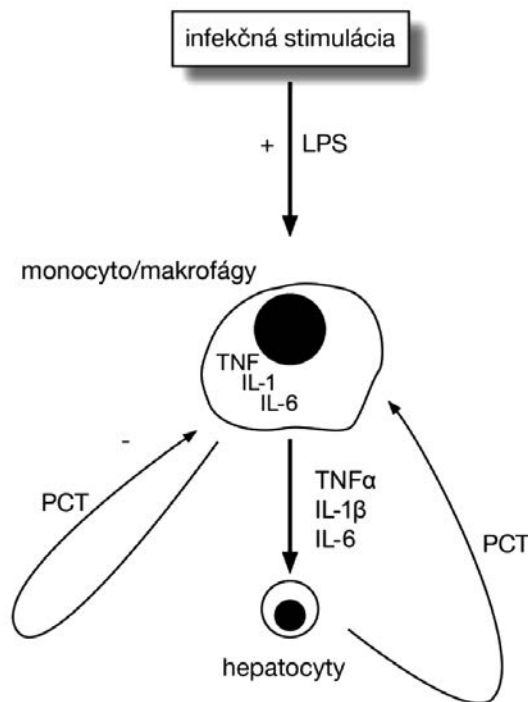
- chemotaxie monocytov,
- cytokínovej siete a modulácie syntézy NO,
- analgetického účinku,
- metabolizmu kalcia a fosfátov.

Hypotetická úloha PCT v regulácii metabolizmu kalcia a fosfátov v priebehu sepsy vychádza zo štrukturálnej podobnosti PCT a hormónu kalcitonínu. PCT obsahuje aminokyselinovú sekvenciu kalcitonínu. Podobnosť primárnej štruktúry proteínového reťazca je menej významná ako odlišnosti sekundárnej a terciárnej štruktúry. U pokusných zvierat v experimentálnej sepe bola pozorovaná hypokalcémia a vzostup koncentrácie fosfátov. Ďalšie štúdie tento nález nepotvrdzujú a dokumentujú striedavo vzostup, pokles alebo nezmenené hladiny kalcia v modeloch sepsy. U septických pacientov dochádza často k hypokalcémii. Napriek tomu hladiny kalcia a fosfátov významne nekorelujú s hladinou PCT.

Je známe, že hormón kalcitonín má chemotaktický vplyv na monocyty a tento efekt je intracelulárne sprostredkovaný cAMP v monocytoch. Wiedermann *a kol.* (2002) dokázal tento efekt aj u PCT, ktorý pôsobí ako chemoatraktans. Granulocyty na PCT ani na kalcitonín nereagujú. Prokalcitonín a kalcitonín zvyšujú koncentráciu cAMP v monocytoch.

Zapojenie PCT do cytokínovej siete by malo mať fyziologické opodstatnenie. Cytokíny majú rozhodujúcu úlohu v regulácii syntézy PCT počas zápalu a hladiny prvých prozápalových cytokínov u septických pacientov významne korelujú s hladinou PCT.

Priamy stimulačný efekt PCT v syntéze cytokínov väčšina štúdií nedokázala. PCT pravdepodobne neindukuje syntézu cytokínov. Brucker *a kol.* (1999) na línii monocytov dokumentuje modulačný účinok PCT na tvorbu TNF α a IL-6 navodenú podaním endotoxínu (Obr. 3), pričom PCT redukoval stimulačný efekt LPS o 20–30%. Whang *a kol.* (2000) v modele sepsy potvrdili modulačný (inhibičný) efekt PCT na endotoxínom stimulovanú syntézu IL-1 β .



Obr. 3. Model zapojenia PCT do negatívnej spätnej väzby regulujúcej aktivitu TNF α a IL-1 β

Bakteriálny endotoxín teda stimuluje syntézu PCT prostredníctvom cytokínovej siete za účasti niektorého z cytokínov (TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6), ale mechanizmus indukcie nie je doposiaľ známy. Vo vzťahu ku hlavným prozápalovým cytokínom môžeme PCT označiť za mediátora druhého sledu. Na rozdiel od cytokínov, napr. TNF- α a IL-6, ktorých elevácia je v zápalových situáciách nešpecifická voči typu zápalu, stúpa PCT s vysokou selektivitou pri systémovom zápale bakteriálneho pôvodu. Tvorbu PCT adipocytmi výrazne potencujú IL-1 β a endotoxín a inhibuje IFN γ . Súčasné pôsobenie IFN γ , ktorý stúpa predovšetkým počas vírusových infekcií, zníži tvorbu PCT indukovaného IL-1 β až o 89%. Tento inhibičný efekt IFN γ je pravdepodobne zodpovedný za odlišné hladiny PCT pri systémových zápaloch vírusového a bakteriálneho pôvodu (Linscheid *a kol.*, 2003). Na tejto skutočnosti je založená celá indikačná šírka prokalcitonínu. Cytokíny (TNF- α a IL-6) merané u septických pacientov majú po vypuknutí infekcie spravidla veľmi rýchly nástup a po odznení akútnej fázy sa rýchlo vracajú do normálnych hodnôt. Hladina PCT je úmerná rozsahu imunitnej reakcie a rýchlosť poklesu hladiny pri ústupe infekcie je limitovaná dlhým polčasom eliminácie. Prokalcitonín odráža načasovanie a intenzitu aktivácie cytokínovej kaskády. Cytokíny, najmä zo skupiny prozápalových

faktorov (TNF- α , IL-1, IL-6) vo včasnej fáze zápalovej odpovede pôsobia endokrinným mechanizmom. Ich hladiny sú detegovateľné v plazme a odrážajú intenzitu obrannej odpovede. Plazmatická hladina však nevytvára o lokálnych pomeroch cytokínovej siete v zápalovom ložisku, alebo v jednotlivých kompartmentoch (peritoneálna tekutina, mozgovomiechový mok).

Vplyv prokalcitonínu ako „nesteroidného analgetika“ počas zápalu je popísaný v práci Bruckera *a kol.* (1999). Analgetický efekt lososieho kalcitonínu je známy a je terapeuticky využívaný najmä u pacientov s osteolytickými metastázami. Mechanizmus účinku nie je celkom jasný. Podobne by sa mohol uplatniť aj PCT počas zápalu. *In vitro* bol dokázaný pokles koncentrácie tromboxánu B2 po pridaní kalcitonínu alebo PCT. Účinok je pravdepodobne spôsobený inhibíciou prostaglandín-G a -H-syntázy, ktorú inhibujú aj nesteroidné analgetiká.

Niektoré nedávne štúdie poukazujú aj na škodlivý vplyv prokalcitonínu tvoreného počas sepsy (Linscheid *a kol.*, 2005).

2. PCT V KLINICKÝCH STAVOCH

2.1 Akútny infekčný zápal

Najvyššie plazmatické hladiny dosahuje PCT pri akútnych bakteriálnych infekciách a sepe. Plazmatická hladina PCT pri bakteriálnych infekciách narastá s celkovou zápalovou reakciou organizmu. Lokálne bakteriálne zápaly, napr. abscesy, PCT významne nezvyšujú. Zvýšenie hladiny je úmerné typu a rozsahu zápalu. Pri ťažkých bakteriálnych infekciách dosahujú plazmatické hladiny PCT až 1000 ng/ml. Normálna koncentrácia v sére u zdravých jedincov pritom nepresahuje 0,5 ng/ml (Hoffmann a Schobersberger, 2001). Normálne hodnoty rozsahov PCT u 60 žien s nekomplikovaným tehotenstvom popisujú Paccolat *a kol.* (2011). Mediány hladiny PCT boli: 24. až 28. týždeň – 0,043 μ g/l, 36–40 týždeň – 0,061 μ g/l, pri pôrode – 0,068 μ g/l; 2–3 dni po pôrode – 0,200 μ g/l a na 10 deň po pôrode – 0,060 μ g/l. *Cut off* PCT úroveň 0,25 μ g/l môže byť použitá počas tretieho trimestra, pri pôrode a krátko po pôrode k vylúčeniu infekcie (Paccolat *a kol.*, 2011).

Pri infekciách spôsobených gram-negatívnymi baktériami boli zaznamenané vyššie hodnoty PCT ako pri infekciách pôvodcom ktorých boli gram-pozitívne baktérie. V porovnaní s CRP a inými APP reaguje prokalcitonín na infekčný podnet rýchlejšie a jeho pokles nastáva pri zlepšení klinického stavu. V priebehu akútneho zápalu nedochádza k potlačeniu produkcie PCT, jeho elevácia zostáva po celé obdobie infekčného procesu. Pokles hladiny PCT na konci akútnej zápalovej reakcie je ovplyvnený dlhším plazmatickým polčasom proteínu v porovnaní s výrazne kratším polčasom eliminácie cytokínov. U pacientov so septickým šokom pri zlepšovaní stavu dochádza k poklesu PCT na 50 % maximálnych hodnôt v priemere za 2 dni. Aktuálne

PCT testy sú rýchle, špecifické a dostatočne citlivé pre detekciu zvýšenia hladiny PCT v sére v priebehu 4 až 6 hodín od začiatku infekcie. Klinicky môže stanovenie PCT pomôcť v rozhodovaní o nutnosti antibiotickej liečby resp. trvaní liečby antibiotikami (Gilbert, 2010). Využitie stanovenia hladiny PCT na určovanie dĺžky trvania antibiotickej terapie na jednotkách intenzívnej starostlivosti sa vo svojej práci zaoberajú Agarwal a Schwartz (2011).

V porovnaní s plazmatickými hladinami zostávajú koncentrácie PCT v ostatných telových kompartmentoch nízke. Peritonitída neindukuje výraznejšie zvýšenie PCT v peritoneálnej tekutine a koncentrácia v ascite nepresahuje plazmatickú hladinu. Nie je dokumentované zvýšenie v likvore pri bakteriálnej meningitíde.

Vírusové infekcie ako napr. hepatitída B, cytomegalovírusová infekcia, HIV nezvyšujú hladinu PCT vôbec, alebo veľmi mierne. **Infekcia má zásadný význam u imunokompromitovaných pacientov s orgánovou dysfunkciou.** Aj napriek obmedzenej špecifickosti u kriticky chorých pacientov s poruchou imunity, môže stanovenie koncentrácie PCT pomôcť vylúčiť bakteriálnu infekciu (Bele *a kol.*, 2011).

Pri generalizovaných mykózach (*Candida*, *Aspergillus*) rovnako nenastáva zvýšenie PCT. Na odlišenie bakteriálnej a nebakteriálnej etiológie zápalu je založený diferenciálno-diagnostický význam prokalcitonínu.

2.2 Perioperačné obdobie

Prokalcitonín je spolu s ďalšími zápalovými mediátormi súčasťou systémovej imunitnej odpovede na operačnú traumu. Rozsiahle operačné výkony, najmä vnútrobrušné zákroky, tvorbu PCT aktivujú. Rozsiahlu štúdiu na skupinách chirurgických pacientov publikovali Meisner *a kol.* (1998), kde porovnávali dosiahnuté maximálne koncentrácie PCT pri rôznych typoch chirurgických výkonov. Operovaní pacienti boli sledovaní do 5 dňa po výkone, kedy sa koncentrácia prokalcitonínu vracia k norme. Pacienti po menších chirurgických výkonoch (operácia inguinálnej hernie, tyreoidektómia, operácia periférnych žíl) dosahujú vo včasnej pooperačnej fáze nízke hladiny PCT. Mierne zvýšenie nastáva u pacientov s menším abdominálnym výkonom (cholecystektómia). Najvyššie hodnoty sú u pacientov s rozsiahlymi vnútrobrušnými a retroperitoneálnymi výkonmi (resekcia hrubého čreva, gastrektómia, operácia veľkých ciev).

Výsledky ukázali, že pooperačný vzostup PCT zodpovedá lokalizácii a rozsahu výkonu. Maximálne koncentrácie u menších zákrokov nepresahujú 2 ng/ml, pri závažných výkonoch individuálne koncentrácie často presahujú 5 ng/ml. V mnohých prípadoch ale tieto vysoké koncentrácie PCT znamenajú nástup infekčných komplikácií.

Maximálne koncentrácie sú spravidla dosahované na 1.–2. deň po výkone, ale môžu kulminovať aj v nasledujúcich dňoch.

Pri kardiochirurgických výkonoch elevácia PCT nedosahuje hodnôt, ktoré nachádzame u abdominálnych

operácií (Silomon *a kol.*, 1999). Najvyššie hodnoty PCT nachádzajú Hensel *a kol.* (1998) u pacientov s akútnym kardiopulmonálnym zlyhaním v pooperačnom období. Podobne ako iné zápalové parametre, včítane APP je i PCT využívaný v porovnávacích štúdiách hodnotiacich vzájomne rôzne chirurgické postupy u rovnakej diagnózy.

Príčiny pooperačného vzostupu PCT nie sú doposiaľ jasné. Pripúšťa sa vplyv latentnej bakteriálnej kontaminácie počas výkonu alebo účinkov endotoxínu uvoľneného do cievného riečiska v portálnej oblasti a u pacientov s extrakorporálnym obehom aj faktor bakteriálnej translokácie. Súčasná elevácia TNF α , IL-1 β , IL6 pripúšťa iné aseptické mechanizmy podieľajúce sa na indukcii PCT cestou cytokínovej aktivácie (Apelseth *a kol.*, 2006).

2.3 Leukopenické stavy

V roku 1998 boli publikované prvé výsledky dokumentujúce dynamiku PCT u neutropenických pacientov s potvrdenou infekciou. Aj v aplastickej fáze po transplantácii kostnej drene (BMT) je zachovaná schopnosť imunitného systému tvoriť cytokíny a stimulovať syntézu APP a PCT.

Leukopenické obdobie, najmä u onkologických pacientov po intenzívnej chemoterapii, alebo u pacientov po BMT, je vysoko rizikové z hľadiska možného nástupu infekčných komplikácií (Finberg *a kol.*, 1999). Je to obdobie, keď zlyhávajú klasické indikátory nástupu infekcie typu leukocytózy, alebo horúčky. Mortalita neutropenických pacientov na infekčné komplikácie predstavuje vážny problém. Sledovanie dynamiky PCT pri ťažkej leukopénii prispieva k poznaniu fyziologických mechanizmov regulácie PCT. Najväčší súbor dát 112 pacientov s hematologickými malignitami nachádzame v práci Lestin *a kol.* (1998). Štúdia hodnotila koncentrácie zápalových markerov pred chemoterapiou a počas nej. Koncentrácie PCT sa nezmenili v porovnaní s východiskovými hodnotami ani u pacientov s ťažkou, cytostatikami navodenou leukopéniou. V súbore prof. Lestina bolo jednoznačne potvrdené zvýšenie PCT pri rozvoji infekcie pri ťažkej neutropénii. Pri lokálnych infekciách sa hladina PCT pohybovala v nižších koncentráciách ako pri systémovej infekcii. Najvyššie hladiny boli zaznamenané u gram-negatívnych infekcií, následne u gram-pozitívnych infekcií, najnižšie u mykotických infekcií.

Výrazný vzostup PCT už v prvý deň sepsy u pacientov s ťažkou leukopéniou zaznamenal Henster *a kol.* (2003). Svaldi *a kol.* (2001) na súbore 73 hematologických pacientov s ťažkou leukopéniou navodenou cytostatickou liečbou nezaznamenali hladinu PCT vyššiu než 2 ng/ml ani pri sepe a septickom šoku. Paradoxne zaznamenali v 1. deň gram-negatívnej sepsy hodnoty často nad 10 ng/ml. V porovnaní s ďalšími zápalovými parametrami je prediktívna hodnota PCT v čase nástupu sepsy vyššia než CRP, TNF α , resp. IL-6, ale nižšia než IL-8. PCT je vysoko špecifický, ale nedostatočne senzitivný marker sepsy u neutropenických pacientov, najmä pri gram-

pozitívnej bakteriémii. Z hľadiska časových vzťahov je dynamika PCT podobná ako pri TNF- α a IL-6 (Honey *a kol.*, 1992).

Gac *a kol.* (2011) popisujú dynamiku PCT u 29 pacientov s akútnou myeloidnou leukémiou (AML) a u 39 pacientov s neutropéniou indukovanou chemoterapiou. Plazmatické hladiny PCT boli stanovované každé štyri dni od začiatku chemoterapie a pokračovali do rozlíšenia horúčky. Zistili, že bakteriémia zvyšovala hladiny PCT nad 0.5 ng/ml predpokladanej bakteriémie na 15. deň chemoterapie. Toto zistenie môže byť dôležité pri rozhodovaní o zmene antibiotika, režimu pre zníženie toxicity a nákladov, keď pacienti zostávajú v horúčkach dlhšie.

Problémom všetkých doterajších štúdií o PCT u neutropenických pacientov je malý súbor pacientov, často je nedostatočná koncepcia a výber pacientov. Súborné pacientov sú heterogénne tak z hľadiska diagnózy (napr. nádory a leukémie) ako aj vekového rozloženia (deti a dospelí) (Person *a kol.*, 2004; Ciaccio *a kol.*, 2004). Všetky doterajšie údaje týkajúce sa dynamiky PCT a ďalších zápalových markerov je nutné považovať za predbežné (Hitoglou-Hatzi *a kol.*, 2005). PCT je nutné hodnotiť v kontexte ďalších ukazovateľov (neopterin, IL-8) a pri interpretácii je dôležitá individuálna interpretácia.

Všetky štúdie sa zhodujú v tom, že vzostup PCT u infekčných pacientov je pri súčasnej leukopénii nižší než u pacientov s normálnou bielou krvotvorbou.

2.4 Pacienti po transplantácii

Infekčné komplikácie ohrozujú život 25 % pacientov po transplantácii srdca, pľúc alebo pečene. Vysoké dávky kortikoidov, imunosupresívna liečba a systémová antibiotická terapia modifikujú priebeh normálnej imunitnej odpovede. Štandardné zápalové indikátory majú u týchto pacientov limitovaný význam. Akútna rejeckcia musí byť od infekcie, z dôvodu odlišného a vzájomne nekompatibilného liečebného postupu odlišená včas.

Vývoj koncentrácie PCT po transplantácii orgánu je typický pre rozsiahly chirurgický zákrok. U pacientov bez komplikácií kulminuje hladina PCT na 1. až 2. pooperačný deň. Štúdie so súbormi transplantovaných pacientov Eberhard *a kol.* (1998), Langefeld *a kol.* (1997), Kuse *a kol.* (2001), Hammer *a kol.* (2001) sa zhodujú v tom, že akútna rejeckcia transplantovaného orgánu nemá žiadny vplyv na pooperačný vývoj PCT. Systémová bakteriálna infekcia spôsobí aj u imunokompromitovaných pacientov signifikantný vzostup PCT.

Hladina prokalcitonínu môže byť ovplyvnená aj terapiou. Podanie antilymfocytárneho globulínu alebo monoklonálnych protilátok proti CD3 navodí až 10-násobné zvýšenie hladiny PCT. Liečba indukuje masívne uvoľnenie TNF- α , ktorý stimuluje tvorbu PCT. Nedokázalo sa, aby vysoké dávky kortikoidov u pacientov po transplantácii mali vplyv na reakciu PCT a TNF- α .

2.5 PCT u novorodencov a detí

Koncentrácia PCT bezprostredne po narodení stúpa. Maximum dosahuje 24 hodín po narodení v rozmedzí 0,5–21 ng/ml (medián 2,0 ng/ml). Po 48 hodinách od pôrodu hladiny klesajú pod 0,5 ng/ml. Vzostup PCT v prvých hodinách života je nešpecifickou reakciou, ktorej fyziologický význam, ani mechanizmus indukcie nie sú objasnené. PCT je aj u novorodencov považovaný za vysoko senzitivný marker bakteriálnej infekcie. Pri hodnotení nálezu je nutné rešpektovať odlišnú interpretáciu normálnych hodnôt (Janota *a kol.*, 2000)

Bohnhorst *a kol.* (2011) sa vo svojej štúdii pokúsili posúdiť, ktoré laboratórne metódy najviac prispievajú k určeniu novorodeneckej bakteriálnej infekcie. Sledovali hladiny PCT, CRP a IL-6 u 170 predčasne narodených novorodencov. Diagnóza novorodeneckej bakteriálnej infekcie bola stanovená pri pozitívnej kultivácii inak sterilných telesných tekutín alebo pri rádiologicky overenom zápale pľúc v kombinácii so zvýšenou hladinou zápalových markerov. Zistili, že s preukázaným neskorým nástupom novorodeneckej bakteriálnej infekcie bolo diagnostikovaných 58 (34 %) pacientov. Citlivosť kombinovaného stanovenia CRP (> 10 µg/l) a IL-6 (> 100 pg/ml) bola 91,4 %, špecificita 80,4 %, pozitívna prediktívna hodnota 70,7 % a negatívna prediktívna hodnota 94,7 %. Pridanie PCT (> 0,7 ng/ml) do kombinácie vyšetovaných zápalových indikátorov, vyústilo do citlivosti 98,3 %, 65,2 % špecificity, 58,8 % pozitívnej prediktívnej hodnoty a 98,6 % negatívnej prediktívnej hodnoty. Stanovenie PCT zlepšuje citlivosť na takmer 100 %, ale je spojené s poklesom špecificity.

Cieľom štúdie Canpolat *a kol.* (2011) bolo preskúmať diagnostickú citlivosť a špecifickosť stanovenia CRP a PCT u novorodencov, ktorí sa narodili po predčasnom odtoku plodovej vody (PPROM) a porovnať ich význam s IL-6. Do štúdie bolo zapojených 74 detí narodených po PPRM. IL-6, CRP, krvný obraz a hladiny PCT boli merané v prvý deň života, a stanovenie CRP, PCT a krvného obrazu opakovali na 3. deň života. Hladina CRP 1. deň života má *cut off* hodnotu 0,72 mg/dl so senzitivitou a špecificitou 56 % a 58 %. Hladina CRP na 3. deň mala *cut off* na úrovni 0,78 mg/dl so 60 % senzitivitou a 63 % špecificitou. PCT hladiny *cut off* boli na úrovni 1,74 ng/ml so senzitivitou 76 % a špecificitou 85 % v 1. deň života, a 1,8 ng/ml s 89 % senzitivitou a 86 % špecificitou na 3. deň života. Štatistická analýza ukázala, že hraničná hodnota 7,6 pg/ml pre IL-6 mala 93 % senzitivitu a 96,7 % špecificitu. Stanovenie hladiny PCT je citlivejšie ako CRP. Interleukín IL-6 sa javí ako najspoľahlivejším markerom pre včasnú detekciu sepsy u predčasne narodených novorodencov s PPRM (Cetinkaya *a kol.*, 2011).

Stanovenie PCT u detí môže byť veľmi užitočné v diferenciálnej diagnostike niektorých vážnych stavov. Syndróm precitlivelosti na antiepileptiká (AHS) je život ohrozujúca reakcia na liečbu antikonvulzívami typicky v priebehu 1–12 týždňov od nástupu liečby, spojená

s horúčkou, kožnými prejavmi, hepatopatiou, či lymfadenopatiou. Môže postihovať aj iné orgány. Jej patogenéza nie je objasnená a hypotézy uvažujú o nahromadení toxických metabolitov, produkcii protilátok, či vírusovej infekcii. Najakceptovanejšou je toxická hypotéza (Gogtay *a kol.*, 2005). Cantarín-Extremiera *a kol.* (2011) popisujú u detí (14-ročný chlapec a 13-ročné dievča) s AHS signifikantne zvýšenie hladiny PCT.

Účinnosť sérového amyloidu A (SAA), CRP a PCT v diagnostike a sledovaní nekrotizujúcej enterokolitídy (NEC) u predčasne narodených detí sledovali Cetinkaya *a kol.* (2011), pričom zistili, že všetky sú presnými a spoľahlivými markermi v diagnostike NEC.

2.6 Renálna insuficiencia

Cirkulujúci prokalcitonín je vysoko stabilná molekula. V plazme sa pravdepodobne nenachádza enzým, ktorý by významnejšie degradoval molekulu PCT. Keďže eliminačným mechanizmom PCT z cirkulácie sú obličky, vyšetrenie jeho hladiny najmä u detí s infekciou močových ciest sa preto javí ako veľmi vhodné (Leroy a Gervaix, 2011).

Meisner *a kol.* (2001) v troch štúdiách porovnáva stupeň eliminácie plazmatického prokalcitonínu u pacientov s rôznym stupňom renálnej dysfunkcie, odlišného veku a pohlavia a porovnáva renálny clearance PCT s vývojom hladiny PCT u septických pacientov, ktorí absolvovali hemofiltráciu. Výsledky dokázali, že renálny clearance PCT nie je ovplyvnený žiadnym z týchto ukazovateľov. Clearance kreatinínu nemá vplyv na plazmatické hladiny PCT v kľudovej fáze, ani počas zápalu. Benador *a kol.* (1998) uvádza, že u pacientov s akútnym alebo chronickým ochorením obličiek PCT s renálnymi funkciami nekoreluje. Súvisí výhradne s prítomnosťou a aktivitou zápalu. U pacientov s myeloperoxidáza (MPO)-ANCA-spojenou glomerulonefritídou boli sérové hladiny PCT $\geq 0,5$ ng/ml odporúčané ako *cut off* pre rozhodovanie o bakteriálnych a plesňových infekciách. Zvýšené sérové hladiny PCT môžu byť u niektorých pacientov s ťažkým poranením obličiek a/alebo pľúc aj v neprítomnosti infekcie (Komatsuda *a kol.*, 2011).

3. LITERATÚRA

1. Agarwal, R., Schwartz, D. N.: *Procalcitonin to guide duration of antimicrobial therapy in intensive care units: a systematic review.* Clin Infect Dis. 2011 Aug; 53(4): 379–87.
2. Apelseth, T. O., Hervig, T. A., Wentzel-Larsen, T., Bruserud, O.: *Cytokine accumulation in photochemically treated and gamma-irradiated platelet concentrates during storage.* Transfusion, 2006 May; 46(5): 800–10.
3. Assicot, M., Gendrel, D., Carsin, H., Raymond, J., Guillbaud, J., Bohuon, C.: *High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection.* Lancet. 1993., 341: 515–518.

4. Benador, N., Siegrist, C. A., Gendrel, D., Greder, C., Benador, D., Assicot, M., Bohuon, C., Girardin, E.: *Procalcitonin is a marker of severity of renal lesions in pyelonephritis*. *Pediatrics*. 1998, 102: 1422–1425.
5. Bele, N., Darmon, M., Coquet, I., Feugeas J. P., Legriél, S., Adaoui, N., Schlemmer, B., Azoulay, E.: *Diagnostic Accuracy of Procalcitonin in Critically Ill Immunocompromised Patients*. *BMC Infect Dis.*, 2011 Aug 24; 11(1): 224.
6. Bohnhorst, B., Lange, M., Bartels, D. B., Bejo, L., Hoy, L., Peter, C.: *Procalcitonin and valuable clinical symptoms in the early detection of neonatal late-onset bacterial infection*. *Acta Paediatr.*, 2011 Aug 8. doi: 10.1111/j.1651-2227.2011.02438.
7. Brucker, A.: *Eifluss von Procalcitonin auf die Stimulation von Zytokinen, cyclo AMP und Eicosanoiden in ausgewählten ex vivo und in vitro modellen*. FAU, Erlangen-Nürnberg, 1999.
8. Canpolat, F. E., Yiğit, S., Korkmaz, A., Yurdakök, M., Tekinalp, G.: *Procalcitonin versus CRP as an early indicator of fetal infection in preterm premature rupture of membranes*. *Turk J Pediatr.*, 2011 Mar–Apr; 53(2): 180–6.
9. Cantarín-Extremera, V., Castaño-De La Mota, C., Alvarez-Coca, J., Rojas, M. R., Gutiérrez-Solana, L. G., García Peñas, J. J., Martínez-Pérez, J., Duat-Rodríguez, A., López-Marín, L., Losada-Del Pozo, R.: *Procalcitonin, a high acute phase reactant in antiepileptic hypersensitivity syndrome in pediatric age*. *Eur. J. Paediatr Neurol.*, 2011 Jul 27.
10. Cetinkaya, M., Ozkan, H., Köksal, N., Akacı, O., Özgür, T.: *Comparison of the efficacy of serum amyloid A, C-reactive protein, and procalcitonin in the diagnosis and follow-up of necrotizing enterocolitis in premature infants*. *J. Pediatr Surg.*, 2011 Aug; 46(8): 1482–9.
11. Ciaccio, M., Fugardi, G., Titone, L., Romano, A., Giordano, S., Bivona, G., Scarlata, F., Vocca, L., Di Gangi, M.: *Procalcitonin levels in plasma in oncohaematologie patients with and without bacterial infections*. 2004, *Clin Chim Acta* 340: 149–152.
12. Eberhard, O. K., Langefeld, I., Kuse, E. R., Brunkhorst, F. M., Kliem, V., Schlitt, H. J., Pichlmayr, R., Koch, K. M., Brunkhorst, R.: *Procalcitonin in the early phase after renal transplantation-will it add to dagnostic accuracy?* *Clin Transplant*, 1998, 12: 206–211.
13. Finberg, R. W., Talcott, J. A.: *Fever and neutropenia-how to use a new treatment strategy*. *N. Eng. J. Med.*, 1999, 341: 362–363.
14. Gac, A. C., Parienti, J. J., Chantepie, S., Fradin, S., Le Coutour, X., Leclercq, R., Reman, O.: *Dynamics of procalcitonin and bacteremia in neutropenic adults with acute myeloid leukemia*. *Leuk. Res.*, 2011 Oct., 35(10): 1294–6.
15. Gilbert, D. N.: *Use of plasma procalcitonin levels as an adjunct to clinical microbiology*. *J. Clin. Microbiol.*, 2010 Jul; 48(7): 2325–9.
16. Gogtay, N. J., Bavdekar, S. B., Ksihirsagar, N. A.: *Anti-convulsant hypersensitivity syndrome: a review*. In *Informa healthcare*, 2005, 4(3): 571–581.
17. Hammer, C., Fraunberger, P., Meisner, B., Hammer, S.: *Procalcitonin: a new marker for diagnosis of acute rejection and nonviral infection of heart and lung transplant patients*. *Transplant Proc.* 2001, 33: 2204–2206.
18. Heney, D., Lewis, I. J., Evans, S. W.: *Interleukin-6 and its relationship to C-reactive protein and fever in children with febrile neutropenia*. *J. Infect. Dis.*, 1992, 165: 886–890.
19. Hensel, M., Volk, T., Docke, W. D., Kern, F., Tschirna, D., Egerer, K., Konertz, W., Kox, W. J.: *Hyperprocalcitonemia in patients with noninfectious SIRS and pulmonary dysfunction associated with cardiopulmonary bypass*. *Anesthesiology*, 1998, 89: 93–104.
20. Henster, T., Bouillon, B., Rixen, D., Raum, R. M., Andermahr, J., Neugebauer, E.: *Plasma levels of procalcitonin and neopterin in multiple trauma patients with or without brain injury*. *J. Neurotrauma*, 2003, 20: 953–9.
21. Hitoglou-Hatzi, S., Hatzistilianou, M., Gougoustamou, D., Rekliti, A., Agguridaki, Ch., Athanassiadou, F., Frydas, S., Kotsis, A., Catriu, D.: *Serum adenosine deaminase and procalcitonin concentrations in neutropenic febrile children with acute lymphoblastic leukaemia*. *Clin. Exp. Med.*, 2005, 5: 60–65.
22. Hoffmann, G., Schobersberger, W.: *Anti-inflammatory procalcitonin in a human whole blood model septic shock*. *Cytokine*, 2001, 14: 127–128.
23. Janota, J., Straňák, Z., Belohlávková, S.: *Interleukin-6, procalcitonin, C-reaktívny protein a počet neutrofilu v diagnostice sepse u novorozencu s nízkou porodní váhou*. *Čes. Gynekol.*, 2000, 65: S29–S33.
24. Kiriyama, Y., Nomura, Y., Tokumitsu, Y.: *Calcitonin gene expression induced by lipopolysaccharide in the rat pituitary*. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2002, 282: E1 1380–4.
25. Komatsuda, A., Omokawa, A., Fujiwara, T., Sato, R., Togashi, M., Okuyama, S., Sawada, K. I., Wakui, H.: *Serum Procalcitonin Levels in Patients With Myeloperoxidase-Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies-Associated Glomerulonephritis*. *J. Med. Sci.*, 2011 Aug 3.
26. Kuse, E., Jaeger, K.: *Procalcitonin increase after anti-CD3 monoclonal antibody therapy does not indicate infectious disease*. *Transpl. Int.*, 2001, 14: 55.
27. Langefeld, I., Schulzek, P., Schlitt, H. J., Oldhafer, K., Jaeger, K., Kuse, E. R.: *Procalcitonin zur Differenzierung zwischen infection und Abstossung beim transplantierten mit FUO*. *AINS* 1997.
28. Leroy, S., Gervaix, S.: *Procalcitonin: A Key Marker in Children with Urinary Tract Infection*. *Adv. Urol.*, 2011; 2011: 397618.
29. Lestin, F., Lestin, H. G., Burstein, O., Anders, O., Freund, M.: *Vorläufige erfahrungen mit procalcitonin, CRP, Neopterin, ausgewählten Zytokinen und Hämostaseparametern an Patienten mit malignen hämatologischen Erkrankungen, bei zytostatikainduzierter Neutropenie und Fieber*. *Hämostase und Entzündung*. Hrsg. O. Anders, J. Jacob Weller-Verlag, Neckargemünd, 1998.
30. Linscheid, P., Seboek, D., Zulewski, H., Keller, U., Müller, B.: *Autocrine/Paracrine Role of Inflammation-Medi-*

- ated Calcitonin Gene-Related Peptide and Adrenomedullin Expression in Human Adipose Tissue. 2003, *Endocrinology* 146 (6): 2699–2708
31. Linscheid, P., Seboek, D., Nylen, E.S., Langer, I., Schlatter, M., Becker, K.L., Keller, U., Müller, B.: *In Vitro and In Vivo Calcitonin I Gene Expression in Parenchymal Cells: A Novel Product of Human Adipose Tissue*. *Endocrinology*, 2005, 144(12): 5578–5584
 32. Meisner, M., Tschaikowsky, K., Hutzler, A., Schick, C., Schutler, J.: *Postoperative plasma concentrations of procalcitonin after different types of surgery*. *Intensive Care Med.*, 1998, 24: 680–684.
 33. Meisner, M., Huttemann, E., Lohs, T., Kasakov, L., Reihhart, K.: *Plasma concentrations and clearance of procalcitonin during continuous veno-venous hemofiltration in septic patients*. *Shock*. 2001, 15: 171–175.
 34. Nijsten, M. W., Olinga, P., Hoekstra, H. J.: *In vitro and in vivo stimulation of procalcitonin by TNF α and IL-6*. *Journal für Anästhesie und Intensivtherapie* 2001, 2: 58–60.
 35. Paccolat, C., Harbarth, S., Courvoisier, D., Irion, O., de Tejada, B.M.: *Procalcitonin levels during pregnancy, delivery and postpartum*. *J. Perinat. Med.*, 2011 Aug 11.
 36. Person, L., Engervall, P., Magnuson, A., Vikersfors, T., Soderquist, B., Hansson, L., Tidefelt, U.: *Use of inflammatory markers for early detection of bacteraemia in patients with febrile neutropenia*. *Scand. J. Infect. Dis.*, 2004, 36: 365–371.
 37. Ricci, Z., Ronco, C.: *Year in review: Critical Care 2004 –nephrology*. *Critical Care*, 2005, 9: 523–527.
 38. Reinhart, K., Meisner, M.: *Biomarkers in the critically ill patient: procalcitonin*. *Crit. Care Clin.*, 2011 Apr, 27(2): 253–63.
 39. Russwurm, S., Oberhoffer, M., Zipfel, P.F., Reinhart, K.: *Procalcitonin – a novel biochemical marker for the mediator-directed therapy of sepsis*. *Mol. Med. Today*, 1999, 5: 286–287
 40. Schwarz, S., Bertram, M., Schwab, S., Andrassy, K., Hacke, W.: *Serum procalcitonin levels in bacterial and abacterial meningitis*. *Crit. Care Med.*, 2000, 28: 1828–1832
 41. Silomon, M., Bach, F., Ecker, D., Graeter, T., Grundmann, U., Larsen, R.: *Procalcitonin after extracorporeal circulation. Synthesis in the hepatosplanchnic region*. *Anaesthesia*, 1999, 48: 395–398.
 42. Svaldi, M., Hirber, J., Lanthaler, A.I., Mayr, O., Faes, S., Peer, E., Mitterer, M.: *Procalcitonin-reduced sensitivity and specificity in heavily leucopenic and immunosuppressed patients*. *Br. J. Haematol.*, 2001, 115: 53–57.
 43. Timper, K., Grisouard, J., Radimerski, T., Dembinski, K., Peterli, R., Häring, A., Frey, D.M., Zulewski, H., Keller, U., Müller, B., Christ-Crain, M.: *Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide (GIP) Induces Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP)-I and Procalcitonin (Pro-CT) Production in Human Adipocytes*. 2011, *JCEM* 96(2): 297–303
 44. Whang, K. T., Vath, S. D., Becker, K. L., Snider, R. H., Nylen, E. S., Müller, B., Li, Q., Tamarkin, L., White, J. C.: *Procalcitonin and proinflammatory cytokine interactions in sepsis*. *Shock* 2000, 14: 73–78.
 45. Wiedermann, F.J., Kaneider, N., Egger, P., Tiefenthaler, W., Wiedermann, C.J., Linder, K.H., Schobersberger, W.: *Migration of human monocytes in response to procalcitonin*. *Crit. Care Med.*, 2002, 30: 1112–7.

DIAGNOSTICKÝ POTENCIÁL PROKALCITONÍNU

Renáta Lenártová¹, Anna Birková²
Juraj Guzy², Mária Mareková^{2*}

¹LABMED, a.s., Srbská 4, 040 01 Košice

²Ústav lekárskej a klinickej biochémie

LF UPJŠ v Košiciach, Tr. SNP 1, 040 01 Košice

*maria.marekova@upjs.sk

SÚHRN

Napriek mnohým informáciám dostupným o rôznych zápalových mediátoroch je skorá diagnostika septických stavov v klinickej praxi problémom. Sľubným markerom predovšetkým bakteriálnej infekcie je prokalcitonín. Nárast koncentrácie prokalcitonínu od nástupu infekcie je rýchlejší ako nárast proteínov akútnej fázy. V posledných rokoch sa vykonáva mnoho štúdií, v ktorých sa testuje význam stanovenia prokalcitonínu počas rôznych stavov v rozličných medicínskych odboroch a porovnáva sa s proteínmi akútnej fázy a mnohými cytokínmi. Výsledky zhodne poukazujú na jeho vysoký diagnostický aj prognostický potenciál.

SUMMARY

Early diagnostics of sepsis in clinical practice is a big problem, although much information about inflammations mediators is available. Procalcitonin seems to be a promising marker of especially bacterial infection. After infection onset, the increase of procalcitonins concentration overtake acute phase proteins rise. In the last years, during different pathological states and in several medical fields, there are performed many studies testing the importance and significance of procalcitonin determination and comparing to various cytokines and acute phase proteins. Results consistently indicate both, its strong diagnostic and prognostic potential.

ÚVOD

Súčasná diagnostická indikácia PCT je možné rozdeliť do dvoch skupín. Prvá skupina vychádza z vysokej senzitivity PCT k systémovým bakteriálnym infekciám. Senzitivita je zachovaná aj v situáciách, kedy základné zápalové ukazovatele: sedimentácia a leukocytóza strácajú výpovednú hodnotu. Zaznamenávame to pri transplantáciách, neutropenických stavoch, vo včasnom pooperačnom období.

Druhá skupina indikácií je založená na nízkej senzitive PCT k nebakteriálnym zápalom. Vlastnosť, ktorej

fyziologická podstata nie je zatiaľ jasná a ktorá tento mediátor odlišuje od rady cytokínov. Linscheid *a kol.* (2003) popisuje výrazný inhibičný efekt $IFN\gamma$ na tvorbu PCT indukovanú IL-1 β a endotoxínom. Tvorba $IFN\gamma$ je možnou príčinou odlišných hladín PCT pri systémových zápaloch vírusového a bakteriálneho pôvodu (Linscheid *a kol.*, 2003). Ako prínosná a využiteľná sa ukazuje analýza PCT u pacientov s reumatickými chorobami, alebo s nešpecifickými črevnými zápalmi. Základná choroba pri týchto stavoch nemá vplyv na tvorbu PCT, jeho prípadnú eleváciu prisudzujeme infekčnej komplikácii.

Diagnostický potenciál PCT ako zápalového ukazovateľa vychádza z nasledujúcich poznatkov:

- Syntéza PCT a jeho uvoľnenie do cirkulácie je vysoko špecifická reakcia na systémovo pôsobiaci bakteriálny infekčný podnet. Lokalizovaná bakteriálna infekcia, atypická pneumónia, vírusový alebo mykotický zápal sú málo významné stimuly pre syntézu PCT.
- Miera indukcie PCT je závislá na charaktere a intenzite vyvolávajúceho podnetu, maximálne hladiny dosahuje vo včasnom štádiu sepsy.
- Tvorba PCT v porovnaní s pôvodnými predpokladmi nie je obmedzená na bakteriálnu antigénnu stimuláciu. Je indukovaná aj v priebehu aseptického zápalovej reakcie po rozsiahlom chirurgickom výkone a je stimulovaná aj vysokovoltážnou celotelovou rádioterapiou. Pri chirurgických výkonoch je vzostup PCT a jeho trvanie úmerné rozsahu zákroku a jeho lokalizácii. Najvyššie hodnoty bývajú pri rozsiahlych vnútrobrišných výkonoch. Celotelové ožiarenie indukuje reakciu akútnej fázy s vzostupom PCT v závislosti na dávke a type liečebnej schémy.
- Pre indukovanú syntézu PCT v priebehu septickej reakcie nie sú nevyhnutné leukocyty. Poukazujú na to výsledky získané u pacientov v aplastickej fáze po BMT (Bone Marrow Transplantation) alebo pri iných stavoch spojených s leukopéniou. Reakcia cytokínov a PCT u pacientov v aplastickej fáze potvrdzuje, že faktory stimulujúce tvorbu PCT nemusia byť tvorené leukocytmi. Hypotetickým zdrojom týchto faktorov môžu byť endotelálne bunky, hepatocyty alebo tukové tkanivo. U týchto pacientov sa odpoveď PCT na infekčný stimul kvantitatívne odlišuje od pacientov s normálnymi hodnotami krvotvorby a je potrebné porovnávať ju s odlišnými referenčnými limitmi.
- Pečeň je podľa súčasných poznatkov hlavným zdrojom zápalového PCT. Syntéza je zachovaná aj pri závažnom postihnutí pečenej funkcie (ožiarenie, cirhóza pečene) a nekoreluje s biochemickými ukazovateľmi pečenej dysfunkcie. Niektorí autori považujú za majoritný zdroj PCT tukové tkanivo.
- Obličky pravdepodobne predstavujú hlavný eliminačný mechanizmus plazmatického PCT. Lhká a stredne ťažká renálna insuficiencia nemá významný vplyv na plazmatické hladiny PCT. Pripúšťa sa existencia iných enzymatických degradačných

mechanizmov odstraňujúcich PCT priamo v tkanivách.

- Na rozdiel od cytokínov sú koncentrácie PCT v ascite, pleurálnej tekutine alebo v mozgovomiechovom moku vždy nižšie než jeho plazmatické hladiny

1. ZÁKLADNÉ INDIKÁCIE VYŠETRENIA PCT

Zo súčasných znalostí a poznatkov vyplývajú nasledujúce indikácie vyšetrenia PCT:

Diferenciálna diagnostika zápalových ochorení a horúčiek neznámeho pôvodu. PCT môže napomôcť rozlíšeniu ARDS bakteriálnej a nebakteriálnej etiológie významnejšie než napr. CRP. Má vyššiu výpovednú schopnosť odlíšiť aktivitu systémového autoimunitného ochorenia, napr. systémového lupus erythematosus, od bakteriálnych komplikácií u týchto pacientov (Schwenger *a kol.*, 1998). PCT sa zdá byť veľmi užitočný laboratórny marker pre diferenciáciu príčin horúčky a to najmä u autoimunitných a malígnych ochorení (Limper *a kol.*, 2010)

Monitorovanie kriticky chorých pacientov. Vysoké alebo stúpajúce hladiny svedčia pre bakteriálnu komplikáciu a všeobecne pre zlú prognózu pacienta. Naopak rýchly pokles hladiny poukazuje na ústup infekcie a priaznivú prognózu (Schwarz *a kol.*, 2000; Bucová *a kol.*, 2006).

Kontrola terapie a priebehu bakteriálnych infekcií. Absolútna hodnota PCT nekoreluje priamo so závažnosťou stavu, vývoj hladiny odráža narastajúcu alebo ustupujúcu imunitnú odpoveď na infekciu (Sabbatani *a kol.*, 2006).

Diagnóza bakteriálnej infekcie u imunosuprimovaných osôb (Hatzistilianou *a kol.*, 2007).

Hodnotenie prognózy pacientov. Pri MODS, sepse, nekrotizujúcej pankreatitíde koreluje maximálna hladina PCT so závažnosťou ochorenia, ale za zlú prognózu pacienta je zodpovedný predovšetkým čas, počas ktorého zostáva hladina PCT zvýšená.

Sledovanie hladín PCT pri akútnom koronárnom syndróme (ACS) poukazuje na to, že vyššie hladiny PCT do 48 hodín po prijatí môžu odrážať zápalový stav, ktorý je spojený so zvýšenou mortalitou (Ataoglu *a kol.*, 2010). Ozkan *a kol.* (2011) popisujú, že hodnota PCT sa zvyšuje pred CRP, čo môže byť užitočné pre hodnotenie predčasnej aterosklerózy u akromegálií.

2. INTERPRETÁCIA NÁLEZOV

Pre väčšinu klinických situácií možno využiť nasledujúce hodnotenie v tabuľke 1. Je potrebné zdôrazniť, že existujú špecifické situácie, v ktorých PCT reaguje odlišným spôsobom.

Tab. 1. Interpretácia nálezov PCT

| PCT (ng/ml) | Hodnotenie | Charakteristické klinické stavy | Poznámka |
|-------------|---|---|---|
| < 0,5 | normálne hodnoty minimalizuje pravdepodobnosť sepsy | | nie je vylúčená lokalizovaná alebo iná ako bakteriálna infekcia |
| 0,5–2 | sivá zóna vhodné je opakovať vyšetrenie do 24 hod. | lokalizovaný infekčný zápal, chronický zápal, hepatitída A, B | hodnoty bežné vo včasnom pooperač. období a pri ťažkej renálnej insuficiencii |
| 2–10 | vysoká pravdepodobnosť sepsy, septického šoku | systémová bakter. infekcia, intenz. SIRS nebakteriálneho pôvodu | |
| 10 a viac | veľmi vysoké hodnoty | ťažká sepsa, multiorgánové zlyhanie | pri ťažkých bakteriálnych infek. až 1000 ng/ml |

3. VYUŽITIE PCT V KLINICKEJ DIAGNOSTIKE

3.1 Akútne infekcie

SEPSA, MODS

Prokalcitonín umožňuje včasnú detekciu systémového bakteriálneho zápalu. Pri diferenciálnej diagnostike MODS odliší jeho infekčnú a neinfekčnú etiológiu a slúži ako prognostický ukazovateľ. Gendrel *a kol.* (1999) porovnáva PCT s CRP a IL-6, kde poukazuje na jeho nižšiu senzitivitu, ale vyššiu špecificitu. U pacientov s atypickou pneumóniou, lokalizovaným zápalom a nebakteriálnou infekciou je zvýšenie PCT nevýznamné. Sinha *a kol.* (2011) sa pokúsili zhodnotiť užitočnosť testu PCT u kriticky chorých pacientov s podozrením na sepsu. Do štúdie bolo zahrnutých 40 pacientov z jednotky intenzívnej starostlivosti s podozrením na sepsu. Sepsa bola potvrdená klinicky a/alebo pozitívnou kultiváciou krvi. Pacienti s PCT ≥ 2 ng/ml štatisticky významne korelujú s prítomnosťou sepsy ($P < 0,0001$). Autori ukázali, že PCT má strednú citlivosť (86 %) a vysokú špecificitu (95 %) na *cut off* ≥ 2 ng/ml. Bolo zistené, že PCT je veľmi užitočný biomarker sepsy, keďže výsledky sú rýchlo dostupné (do 2 hodín) a poskytujú cenné informácie pred dostupnosťou výsledkov kultivácie, čo by mohlo pomôcť zabrániť zbytočnému užívaniu antibiotík (Sinha *a kol.*, 2011).

Hladina PCT je cenným ukazovateľom pre rýchlu a spoľahlivú diagnózu sepsy. Diagnostický model založený na laboratórnych parametroch pomocou kombinovaných výsledkov stanovenia PCT a CRP môže byť užitočným

prostriedkom pre predikciu predčasného vzniku sepsy (Liu *a kol.* 2010; Reinhart a Meisner, 2011).

Kato *a kol.* (2010) popisujú výrazné zvýšenie PCT u pacientky so syndrómom toxického šoku indukovaného superantigénom *Staphylococcus aureus* po použití menštruačného tampónu.

Peritonitída

Pri peritonitíde je elevácia prokalcitonínu porovnateľná s inými prípadmi sepsy. Spahr *a kol.* (2001) poukazuje na PCT ako vhodný prognostický ukazovateľ pri peritonitíde, keďže priaznivý vývoj sa odráža v jeho klesajúcej hladine počas prvých troch dní.

Pneumónie a infekcie respiračného traktu

Práca Hedlund *a kol.* (2000) potvrdila miernu eleváciu PCT počas bakteriálnej pneumónie. Jeho detekcia v tekutine z bronchoalveolárnej laváže nemá význam. Chronické infekcie dýchacieho traktu navodia hraničné zvýšenie PCT.

Klinické príznaky infekcie neumožňujú správne určenie bakteriálnej a vírusovej etiológie u akútnych respiračných infekcií. PCT je jednak účinným nástrojom poskytujúcim klinickým lekárom pomoc pri identifikácii pacientov, ktorí potrebujú antibiotickú liečbu, pomáha rozlíšiť pacientov s potenciálne závažnou infekciou a môže výrazne zlepšiť starostlivosť o pacientov a obmedziť nadmerné predpisovanie antibiotík. Prokalcitonín je nový marker podozrenia na bakteriálne infekcie, ktorý sa javí ako veľmi sľubný vo vedení antibiotickej liečby u akútnych infekcií dýchacích ciest v nemocnici bez toho, aby bola ohrozená bezpečnosť pacientov. Hladiny PCT sú u zdravých jedincov nízke a môžu byť použité v prvom rade pre vylúčenie závažných infekcií (Aabenhuis a Jensen, 2011).

Hladina sérového PCT sa rýchlo zvyšuje u pacientov s invazívnym bakteriálnym ochorením, pričom PCT sa zvyšuje rýchlejšie ako CRP. Okrem toho, rýchly pokles hladiny PCT je dobrým dôkazom, že zdroj bakteriálnej infekcie reaguje na klinickú liečbu. U pacientov so získanou komunitnou bakteriálnou pneumóniou sú sekvencné úrovne PCT vhodné ako vodítko pre krátkodobú antimikrobiálnu terapiu (Gilbert, 2011; Christ-Crain a Opal, 2010).

Chirurgia

Práce Maruna *a kol.* (1998), Aouifi *a kol.* (2000), Baykut *a kol.* (2000), Bitkover *a kol.* (2000), Buttenschoen *a kol.* (2001), Gürlich *a kol.* (2002), doporúčujú monitorovanie vysoko rizikových pacientov vo včasnom pooperačnom období, kde elevácia PCT predchádza klinickej manifestácii systémových infekčných komplikácií. Je nutné zohľadniť fyziologickú pooperačnú dynamiku PCT úmernú typu a rozsahu operačného zákroku. Prokalcitonín kulminuje na 1.-2. pooperačný deň s najvyššími hodnotami po rozsiahlych abdominálnych výkonoch. Vo svojich prácach potvrdzujú vysokú špecificitu PCT v porovnaní s CRP a cytokínmi.

Polytrauma

Benoist *a kol.* (1998) a Mimos *a kol.* (1998) vo svojich prácach potvrdili zvýšenie PCT pri polytraume aj bez prítomnosti infekcie. Je to predovšetkým pri ťažkej abdominálnej traume, kedy PCT > 10 ng/ml. Pri iných lokalizáciách je mierna elevácia. Za zlú prognózu pokladáme zvýšenie PCT > 2 ng/ml v období 12 hodín.

Cieľom štúdie Castelli *a kol.* (2009) bolo preskúmať diagnostickú hodnotu PCT a CRP v septických komplikáciách po veľkých traumách. Sekundárnym cieľom bolo zistiť, či existuje prognostická hodnota PCT na závažnosť zranenia, orgánové dysfunkcie a sepsu. Pacienti s traumou majú rýchle a výrazné zvýšenie PCT v okamihu septických komplikácií v porovnaní s koncentraciami nameranými 1 deň pred diagnózou sepsy: 0,85 vs 3,32 ng/ml PCT ($p < 0,001$) a 135 vs 175 $\mu\text{g/L}$ pre CRP ($p =$ nie je významný). Zvýšená plazmatická hladina PCT reindukuje známky možnej septickej komplikácie v priebehu systémovej zápalovej odpovede. Okrem toho, vysoké koncentrácie PCT pri prijatí na JIS u pacientov po traume znamená zvýšené riziko septických komplikácií (Castelli *a kol.*, 2009).

Transplantácie

Stanovenie prokalcitonínu umožňuje včasnú detekciu infekčných komplikácií pred ich klinickým rozvojom (Wagner *a kol.*, 2001). Pri diferenciálnej diagnostike odliší začínajúcu sepsu a akútnu rejekciu transplantátu, čo je dokumentované v prácach Manian *a kol.* (1995), Eberhard *a kol.* (1998), Jarešovej *a kol.* (1999), Blijlevens *a kol.* (2000), Cooper *a kol.* (2001). PCT zaznamenáva výrazne vyššiu špecificitu ako CRP a leukocyty. Zvýšenie hladiny PCT predchádza klinickej manifestácii systémových infekčných komplikácií pri monitorovaní pacientov v aplastickej fáze po transplantácii kostnej drene ako potvrdzujú práce Imoto *a kol.* (2000) a Sauer *a kol.* (2000). Jeho elevácia je významná pri diferenciálnej diagnostike začínajúcej sepsy, hladina PCT je spravidla > 10 ng/ml od reakcie graft versus host disease (GVHD).

3.2 Gastroenterológia

Pankreatitída

Elevácia PCT > 1.8 ng/ml v priebehu 2 dní odliší infekčnú bakteriálnu nekrózu od edematózneho pankreatitídy a sterilnej nekrózy pankreasu. Brunkhorst *a kol.* (1998), Mandi *a kol.* (2000) a Kylanpaa-Back *a kol.* (2001) použili stanovenie PCT pri diferenciálnej diagnostike pankreatitídy biliárnej etiológie s jeho zvýšenou hladinou > 1 ng/ml versus pankreatitídy toxickej etiológie. Dokázaná bola vysoká špecificita v porovnaní s CRP a cytokínmi. Protrahovaná elevácia PCT je považovaná za nepriaznivý prognostický ukazovateľ rozvoja MODS pri pankreatitídach.

Crohnova choroba a Colitis ulcerosa

Podľa prác Bohuon *a kol.* (1999) a Gotteland *a kol.* (1999) sa na rozdiel od CRP a IL-6, prokalcitonín ne-

zvyšuje ani pri aktívnom autoimunitnom zápale. Hladina PCT > 1 ng/ml poukazuje na bakteriálnu komplikáciu základného ochorenia.

Ochorenia pečene

Miernu elevácia PCT zaznamenávame pri ťažkej cirhóze pečene a portálnej hypertenzii v súboroch prác Viallon *a kol.* (2000) a Spahr *a kol.* (2001). Hepatitidy typu A, B, C hladinu PCT nezvyšujú.

3.3 Hematológia

Hematologické malignity

a stavy spojené s leukopéniou

Monitorovanie hladiny PCT umožní včasnú detekciu infekčných komplikácií u imunosuprimovaných a leukopenických pacientov (Schuttrump *a kol.*, 2003). Leukopénia redukuje vzostup PCT, v dôsledku toho nie je možné použiť štandardné referenčné rozmedzie pri hodnotení ako vo svojich prácach uvádzajú Bernard *a kol.* (1998), Ruokonen *a kol.* (1999), Bayer *a kol.* (2000), Crokaert *a kol.* (2000), Penel *a kol.* (2004). Imunosupresívna terapia a kortikoidy neinterferujú s dynamikou PCT.

4. PROKALCITONÍN V POROVNANÍ SO ZÁPALOVÝMI MARKERMI

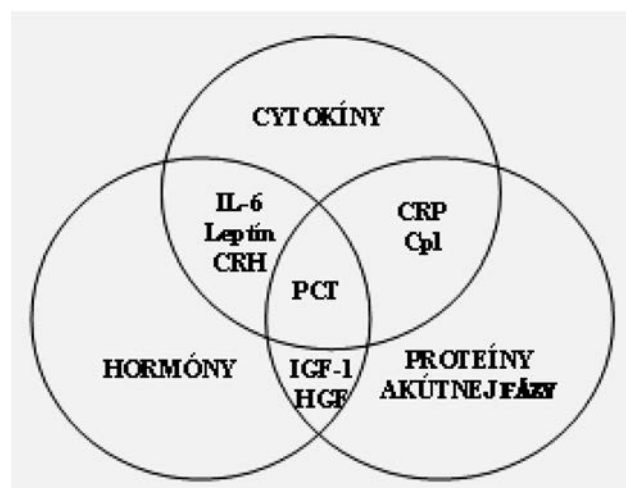
Prokalcitonín je príklad mediátora, ktorý integruje vlastnosti jednotlivých skupín, má spoločné vlastnosti s cytokínmi, hormónmi a proteínmi akútnej fázy (Obr. 1). PCT je prekursor hormónu kalcitonínu a rovnako ako hormóny pôsobí endokrinným mechanizmom. Mechanizmom indukcie a zapojením do spätných väzieb zápalových mediátorov zodpovedá charakteristike cytokínov. Je súčasťou negatívnej spätnej väzby produkcie prozápalových cytokínov makrofágmi. Bucová *a kol.* (2006). Tieto vlastnosti oprávňujú jeho zaradenie medzi cytokíny.

S proteínmi akútnej fázy ho spájajú hepatocyty, ako jeho dominantný zdroj počas zápalu a rovnaký mechanizmus stimulácie prostredníctvom TNF- α , IL-1 a IL-6.

Cytokíny, najmä zo skupiny prozápalových faktorov (TNF- α , IL-1, IL-6) vo včasnej fáze zápalovej odpovede pôsobia endokrinným mechanizmom. Ich hladiny sú detekovateľné v plazme a odrážajú intenzitu obrannej odpovede. Plazmatická hladina však nevypovedá o lokálnych pomeroch cytokínovej siete v zápalovom ložisku, alebo v jednotlivých kompartmentoch (peritoneálna tekutina, mozgovomiechový mok).

4.1 PCT a cytokíny

Bakteriálny endotoxin stimuluje syntézu PCT prostredníctvom cytokínovej siete za účasti niektorého z cytokínov (TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6), ale mechanizmus indukcie nie je doposiaľ známy. Prokalcitonín odráža načasovanie a intenzitu aktivácie cytokínovej kaskády. Vo vzťahu ku hlavným prozápalovým cytokínom môžeme



Obr. 1. PCT medzi cytokínmi, hormónmi a proteínmi akútnej fázy

PCT označiť za mediátor druhého sledu. Na rozdiel od cytokínov, napr. TNF- α a IL-6, ktorých elevácia je v zápalových situáciách nešpecifická voči typu zápalu, stúpa PCT s vysokou selektivitou pri systémovom zápale bakteriálneho pôvodu. Na tejto skutočnosti je založená celá indikačná šírka prokalcitonínu.

Cytokíny (TNF- α a IL-6) merané u septických pacientov majú po vypuknutí infekcie spravidla veľmi rýchly nástup a po odznení akútnej fázy sa rýchlo vracajú do normálnych hodnôt. Hladina PCT je úmerná rozsahu imunitnej reakcie a rýchlosť poklesu hladiny pri ústupe infekcie je limitovaná dlhým polčasom eliminácie.

Pre cytokíny je typický nepomer medzi skutočnou lokálnou produkciou po zápalovom stimule a nameranými plazmatickými hladinami. Reakcia väčšina cytokínov sa odohráva na lokálnej, tkanivovej úrovni, ktorá je nedostupná diagnostickými metódami. Z praktického hľadiska je potrebné zdôrazniť stabilitu prokalcitonínu ako proteínu, ktorú môžeme považovať ako prednosť pri rutinnom stanovení. Na rozdiel od stanovenia cytokínov, kde plazma musí byť zmrazená.

Bohnhorst *a kol.* (2011) vo svojej štúdií sa pokúsili posúdiť, ktoré laboratórne metódy najviac prispievajú k určeniu novorodeneckej bakteriálnej infekcie. Sledovali stanovenie PCT, CRP a IL-6, ktoré zvyšujú citlivosť a presnosť pri stanovení diagnózy u 170 predčasne narodených novorodencov. Novorodenecká bakteriálna infekcia bola definovaná ako pozitívna kultivácia inak sterilných telesných tekutín alebo rádiologicky overený zápal pľúc v kombinácii so zvýšenou hladinou zápalových markerov. Zistili, že 58 (34%) pacientov bolo diagnostikovaných s preukázaným neskorým nástupom novorodeneckej bakteriálnej infekcie. Citlivosť kombinovaného stanovenia CRP (> 10 μ g/l) a interleukínu 6 (> 100 pg/ml) bola 91,4%, špecificita 80,4%, pozitívna prediktívna hodnota 70,7% a negatívna prediktívna hodnota 94,7%. Ďalšie stanovenie PCT (> 0,7 ng/ml),

vyústilo do citlivosti 98,3 %, 65,2 % špecificity, 58,8 % pozitívnej prediktívnej hodnoty a 98,6 % negatívnej prediktívnej hodnoty. Stanovenie PCT zlepšuje citlivosť na takmer 100 %, ale je spojené s poklesom špecificity.

Cieľom štúdie Canpolat *a kol.* (2011) bolo preskúmať diagnostickú citlivosť a špecifickosť CRP a PCT u novorodencov, ktorí sa narodili po predčasnom odtoku plodovej vody (PPROM) a porovnať ich s interleukínom-6 (IL-6). Do štúdie bolo zapojených 74 predčasne narodených novorodencov, ktorí sa narodili po PPRM. IL-6, CRP, krvný obraz a hladiny PCT boli merané v prvý deň života, a CRP, PCT a krvný obraz sa opakovali na 3. deň života. Hladina CRP v prvý deň života má *cut off* hodnotu 0,72 mg/dl so senzitivitou a špecificitou 56 % a 58 %, resp. CRP úroveň na 3. deň mal *cut off* na úrovni 0,78 mg/dl so 60 % senzitivitou a 63 % špecificitou. PCT hladiny *cut off* boli na úrovni 1,74 ng/ml so senzitivitou 76 % a špecificitou 85 % v prvý deň života, a 1,8 ng/ml a 89 % senzitivitu resp. 86 % špecificitu na 3. deň života. Štatistická analýza ukázala, že hraničná hodnota 7,6 pg/ml pre IL-6 mala 93 % senzitivitu a 96,7 % špecificitu. Interleukín IL-6 sa javí ako najspoľahlivejším markerom pre včasnú detekciu sepsy u predčasne narodených novorodencov s PPRM. Stanovenie PCT úrovne je citlivejšie ako CRP u tejto populácie (Cetinkaya *a kol.*, 2011).

4.2 PCT a APP

Odpoveď pečene na systémové poškodenie je charakterizovaná kvantitatívnymi a kvalitatívnymi zmenami v proteosyntéze. Dochádza ku zvýšeniu celkovej syntézy proteínov, ktorá nestačí na vyrovnanie negatívnej dusíkovej bilancie. Z kvalitatívneho hľadiska nastáva vzostup expície na obranu makroorganizmu nevyhnutných plazmatických proteínov pri súčasnom poklese syntézy štruktúrnych proteínov. Tieto zmeny, ktoré tvoria integrálnu súčasť procesov reakcie akútnej fázy dochádza pod priamym stimulačným alebo inhibičným vplyvom prozápalových cytokínov za spoluúčasti ďalších humorálnych faktorov.

APP sú sekrečné proteíny hepatocytov, ktorých tvorba a uvoľnenie do obehu je regulovaná prozápalovými cytokínmi. Postavenie APP v systémovej zápalovej odpovedi má mnoho rysov spoločných s PCT. APP reagujú aktiváciou cytokínovej kaskády rovnako ako prokalcitonín. Senzitivita a špecificita PCT pri systémovej bakteriálnej infekciách je vyššia než pri CRP a ďalších APP.

Je potrebné zdôrazniť, že vyšetrenie PCT nenahradí výpovednú hodnotu APP. Vyšetrenie širšieho spektra APP podáva komplexnejší obraz reakcie akútnej fázy, odrážajúci vplyv mnohých faktorov. Uplatňuje sa tu:

- rozdielna latencia nástupu a intenzita vzostupu v počiatočnej fáze (stimulácia syntézy na transkripčnej, alebo postranskripčnej úrovni);
- rozdielny fyziologický polčas eliminácie: od niekoľkých minút (CRP) do 14 dní (albumín);

- rozdielne pôsobenie jednotlivých stimulačných faktorov a ich kombinácie;
- funkčný stav hepatocytov, nutričný stav;
- konzumpcia cirkulujúcich proteínov v krvi a tkanivách (inravaskulárna hemolýza);
- straty proteínov (nefrotický syndróm, exsudatívna enteropatia);
- stimulačné vplyvy špecifické pre jednotlivé proteíny (hyposiderémia);
- vrodené deficiencie (α 1-antitrypsín, ceruloplazmín, transferín).

Účinnosť PCT, sérového amyloidu A (SAA) a CRP v diagnostike a sledovaní nekrotizujúcej enterokolitídy (NEC) u predčasne narodených detí sledovali Cetinkaya *a kol.* (2011), pričom zistili že všetky sú presnými a spoľahlivými markermi v diagnostike NEC.

Ozkan *a kol.* (2011) popisujú, že hodnota PCT sa zvyšuje pred CRP, čo môže byť užitočné pre hodnotenie predčasnej aterosklerózy u akromegálií.

5 STANOVENIE PCT A JEHO BENEFIT PRE PACIENTA

Všeobecné požiadavky na zápalový marker s optimálnymi vlastnosťami pre diagnostické uplatnenie sú:

- vysoká špecificita a senzitivita,
- možnosť statimového stanovenia,
- jednoduchá interpretácia výsledkov,
- cenová dostupnosť.

Žiadny z dostupných parametrov nespĺňa všetky tieto kritéria. Voľba vyšetrovacej metódy vychádza z porovnania kladov a záporov, ktoré klinickému lekárovi prináša.

Cytokíny a solubilné cytokínové receptory sú reaktanty prvého sledu, majú vysokú senzitivitu a o 6–24 hodín predchádzajú ďalšie diagnostické ukazovatele. Pre cytokíny je typický nepomer medzi skutočnou lokálnou produkciou po zápalovom stimule a ich plazmatickými hladinami. Reakcia väčšina cytokínov sa odohráva na lokálnej, tkanivovej úrovni, ktorá je diagnostickými metódami nedostupná. Ich nevýhodou je nemožnosť statimového stanovenia, nízka špecificita, vysoké nároky na uchovávanie a rýchle spracovanie materiálu a vysoká cena.

Proteíny akútnej fázy poskytujú komplexný obraz imunitného a nutričného stavu pacienta, sú časovo dostupné, majú nízku cenu. Ich nevýhodou je nízka špecificita a ich nástup v druhom slede, nadväzujúci na cytokínovú kaskádu.

Prokalcitonín má možnosť statimového kvantitatívneho stanovenia. Je to marker systémovej bakteriálnej infekcie s vysokou špecificitou a dostatočnou senzitivitou. Senzitivita a špecificita PCT pri systémovej bakteriálnej infekciách je vyššia než pri CRP a ďalších APP. Je potrebné zdôrazniť, že vyšetrenie PCT nenahradí výpovednú hodnotu APP. Vyšetrenie širšieho spektra APP podáva komplexnejší obraz reakcie akútnej fázy, odrážajúci vplyv mnohých faktorov. Uplatňuje sa tu:

- rozdielna latencia nástupu a intenzita vzostupu v počiatočnej fáze (stimulácia syntézy na transkripčnej, alebo posttranskripčnej úrovni);
- rozdielny fyziologický polčas eliminácie: od niekoľkých minút (CRP) do 14 dní (albumín);
- rozdielne pôsobenie jednotlivých stimulačných faktorov a ich kombinácie;
- funkčný stav hepatocytov, nutričný stav;
- konzumpcia cirkulujúcich proteínov v krvi a tkanivách (inravaskulárna hemolýza);
- straty proteínov (nefrotický syndróm, exsudatívna enteropatia);
- stimulačné vplyvy špecifické pre jednotlivé proteíny (hyposiderémia);
- vrodené deficiencie (α 1-antitrypsín, ceruloplazmín, transferín).

PCT má nízku senzitivitu k ohraničeným bakteriálnym zápalom (Lenártová, 2008). Z praktického hľadiska je potrebné zdôrazniť stabilitu procalcitonínu ako proteínu, ktorú môžeme považovať za prednosť pri rutinnom stanovení. Je nenáročný na uchovanie a spracovanie vzoriek, s ľahkou interpretáciou výsledkov. Na rozdiel od stanovenia cytokínov, kde plazma musí byť zmrazená.

Otázka vhodných indikačných kritérií na vyšetrenie PCT, cytokínov a proteínov akútnej fázy nie je zatiaľ definitívne uzavretá. Najvhodnejšie je súbežné stanovenie PCT s ďalšími markermi, napr. CRP, IL-6, ktoré zvyšujú ich diagnostickú výťažnosť. Dôležitý je individuálny prístup k pacientovi, s prihliadnutím na diagnostické skúsenosti lekára, dostupnosť jednotlivých metód a ekonomické možnosti.

6. LITERATÚRA

1. Aabenhus, R., Jensen, J. U.: *Procalcitonin-guided antibiotic treatment of respiratory tract infections in a primary care setting: are we there yet?* Prim Care Respir. J., 2011 Aug 2. pii: pcrj-2011-02-0025-R1. doi: 10.4104/pcrj.2011.00064.
2. Aouifi, A., Piriou, V., Bastien, O., Blanc, P., Bouvier, H., Evans, R., Celard, M., Vandenesch, F., Rousson, R., Lehot, J.: *Usefulness of procalcitonin for diagnosis of infection in cardiac surgical patients.* Crit Care Med. 2000, 28: 3171–3176.
3. Ataoğlu, H. E., Yilmaz, F., Uzunhasan, I., Cetin, F., Temiz, L., Döventaş, Y. E., Kaya, A., Yenigün, M.: *Procalcitonin: a novel cardiac marker with prognostic value in acute coronary syndrome.* J. Int. Med Res., 2010 Jan-Feb, 38(1): 52–61.
4. Bayer, L., Schontube, M., Dorffel, W.: *C-reaktive protein, IL-6 and procalcitonin as infection parameters in children with oncologic diseases.* 2000, Klin Padiatr., 212: 326–31.
5. Baykut, D., Schulte-Herbruggen, J., Krian, A.: *The value of procalcitonin as an infection marker in cardiac surgery.* Eur. J. Med. Res., 2000, 5: 530–536.
6. Benoist, J. F., Mimoz, O., Assicot, M., Edouard, A.: *Serum procalcitonin, but not C-reactive protein, identifies sepsis in trauma patients.* Clin. Chem., 1998, 44: 1778–1779
7. Bernard, L., Ferriere, F., Casassus, P., Malas, F., Leveque, S., Guillevin, L., Lort, Holary O.: *Procalcitonin as an early marker of bacterial infection in severely neutropenic febrile adult.* Clin. Infect. Dis. 1998, 27: 914–915.
8. Bitkover, C. Y., Hansson, L. O., Valen, G., Vaage, J.: *Effects of cardiac surgery on some clinically used inflammation markers and procalcitonin.* Scand. Cardiovasc J., 2000, 34: 307–314.
9. Blijlevens, N. M., Donnelly, J. P., Meis, J. F., De Keizer, M. H., De Pauw, B. E.: *Procalcitonin does not discriminate infection from inflammation after allogeneic bone marrow transplantation.* Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2000, 7: 889–892
10. Bohnhorst, B., Lange, M., Bartels, D. B., Bejo, L., Hoy, L., Peter, C.: *Procalcitonin and valuable clinical symptoms in the early detection of neonatal late-onset bacterial infection.* Acta Paediatr., 2011 Aug 8. doi: 10.1111/j.1651-2227.2011.02438.
11. Bohuon, C., Gendrel, D.: *Procalcitonin a new marker of bacterial infection. Importance and prospects.* Arch Pediatr. 1999, 6:141–144.
12. Brunkhorst, F. M., Heinz, U., Forycki, Z. F.: *Kinetics of procalcitonin in iatrogenic sepsis.* Intensive Care Med., 1998, 24: 888–889.
13. Bucová, M., Záhorec, R., Buc, M.: *Immunomodulatory effect of recombinant human procalcitonin on mitogenic activity of lymphocytes.* Central European Journal of Immunology, 2006, 31: 87–93.
14. Buttenschoen, K., Buttenschoen, D. C., Berger, D., Vasilescu, C., Schafheutle, S., Goeltenboth, B., Seidelmann, M., Beger, H. G.: *Endotoxemia and acute-phase proteins in major abdominal surgery.* Am J. Surg., 2001, 181: 36–43.
15. Canpolat, F. E., Yiğit, S., Korkmaz, A., Yurdakök, M., Tekinalp, G.: *Procalcitonin versus CRP as an early indicator of fetal infection in preterm premature rupture of membranes.* Turk. J. Pediatr., 2011 Mar-Apr; 53(2): 180–6.
16. Castelli, G. P., Pognani, C., Cita, M., Paladini, R.: *Procalcitonin as a prognostic and diagnostic tool for septic complications after major trauma.* Crit. Care Med., 2009, 37 (6): 1845–9.
17. Cetinkaya, M., Ozkan, H., Köksal, N., Akacı, O., Özgür, T.: *Comparison of the efficacy of serum amyloid A, C-reactive protein, and procalcitonin in the diagnosis and follow-up of necrotizing enterocolitis in premature infants.* J. Pediatr Surg., 2011 Aug, 46(8): 1482–9.
18. Cooper, D., Sharples, L., Cornelissen, J., Wallwork, J., Alexander, G., Trull, A.: *Comparison between procalcitonin, serum amyloid A, and C-reactive protein as markers of serious bacterial and fungal infections after solid organ transplantation.* Transplant Proc. 2001, 33: 1808–1810.
19. Crokaert, F.: *Febrile neutropenia in children.* 2000, Int. J. Antimicrob Agents, 16: 173–176
20. Eberhard, O. K., Langefeld, I., Kuse, E. R., Brunkhorst, F. M., Kliem, V., Schlitt, H. J., Pichlmayr, R., Koch, K. M., Brunkhorst, R.: *Procalcitonin in the early phase*

- after renal transplantation-will it add to diagnostic accuracy? Clin Transplant, 1998, 12: 206-211.
21. Gendrel, D., Raymond, J., Coste, J., Moulin, F., Lorrot, M., Guérin, S., Ravilly, S., Lefèvre, H., Royer, C., Lacombe, C., Palmer, P., Bohuoun, C.: Comparison of procalcitonin with C-reactive protein, interleukin 6 and interferon-alpha for differentiation of bacterial vs. viral infections. *Pediatr Infect Dis. J.*, 1999 Oct, 18: 875-81.
 22. Gilbert, D. N.: Procalcitonin as a biomarker in respiratory tract infection. *Clin. Infect. Dis.*, 2011 May, 52 Suppl 4: S346-50.
 23. Gotteland, M., Lopez, M., Munoz, C., Saez, R., Altshiller, H., Llorens, P., Brunser, O.: Local and systemic liberation of proinflammatory cytokines in ulcerative colitis. *Dig. Dis. Sci.*, 1999, 44: 830-835.
 24. Gürlich R., Maruna P., Owen K.: Cytokines in pathogenesis of serious post-surgical conditions. *Acta Univ. Carol. Med.*, Praha, 2002.
 25. Hatzistilianou, M., Rekleity, A., Athanassiadou, F., DeLutis, M. A., Conti, P., Catriu, D.: Serial procalcitonin responses in infection of children with secondary immunodeficiency. *Clin. Invest Med.*, 2007, 30: E75-E85.
 26. Hedlund, J., Hansson, L. O.: Procalcitonin and C-reactive protein levels in community-acquired pneumonia: correlation with etiology and prognosis. *Infection* 2000, 28: 68-73.
 27. Christ-Crain, M., Opal, S. M.: Clinical review: The role of biomarkers in the diagnosis and management of community-acquired pneumonia. *Crit. Care.*, 2010, 14(1): 203.
 28. Imoto, S., Oomoto, Y., Murata, K., Das, H., Murayama, T., Kajimoto, K., Sugimoto, T., Gomyo, H., Nakagawa, T., Nishimura, R., Koizumi, T.: Kinetics of serum cytokines after allogeneic bone marrow transplantation. *Int. J. Hematol.*, 2000, 72: 92-97.
 29. Jarešová, M., Stríž, I., Čermáková, J., Lácha, J., Sedláček, J., Mudra, K., Hána, I., Vítko, S.: Serum procalcitonin concentrations in transplant patients with acute rejection and bacterial infections. *Immunol. Lett.*, 1999, 69: 355-358.
 30. Kato, M., Kaneko, S., Takagaki, K., Kohayagawa, Y., Watanabe, T., Yoshida, Y., Yamamoto, O.: Procalcitonin as a Biomarker for Toxic Shock Syndrome. *Acta Dermatovenerologica*, 2010, vol. 90: 441-442
 31. Kylanpaa-Back, M. L., Takala, A., Kempainen E., Puolakainen, P., Haapiainen, R., Repo, H.: Procalcitonin strip test in the early detection of severe acute pancreatitis. *Br. J. Surg.*, 2001, 88: 222-227.
 32. Lenartova R.: Prokalcitonin-quantitatívne stanovenie. *Labor aktuell* 2008, 4: 14-16
 33. Limper, M., de Kruif, M. D., Duits, A. J., Brandjes, D. P., van Gorp, E. C.: The diagnostic role of procalcitonin and other biomarkers in discriminating infectious from non-infectious fever. *J. Infect.*, 2010 Jun, 60(6): 409-16.
 34. Linscheid P., Seboek D., Zulewski H., Keller U. Müller B.: Autocrine/Paracrine Role of Inflammation-Mediated Calcitonin Gene-Related Peptide and Adrenomedullin Expression in Human Adipose Tissue. *Endocrinology* 146 (6): 2699-2708
 35. Linscheid, P., Seboek, D., Nylen, E. S., Langer, I., Schlatter, M., Becker, K. L., Keller, U., Müller, B.: *In Vitro and In Vivo Calcitonin I Gene Expression in Parenchymal Cells: A Novel Product of Human Adipose Tissue.* *Endocrinology* 144(12): 5578-5584
 36. Liu, F., Wang, Q., Zeng, F. Y., Zhang, P.: Clinical diagnostic value of procalcitonin detection in local infection and sepsis. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2010 Mar, 30(3): 614-6, 619.
 37. Manian, F. A.: A prospective study of daily measurement of C-reactive protein in serum of adults with neutropenia. *Clin. Infect Dis.*, 1995, 21: 114-121.
 38. Mandi, Y., Frkas, G., Takacs, T., Boda, K., Lonovics, J.: Diagnostic relevance of procalcitonin, IL-6, and sICAM-1 in the prediction of infected necrosis in acute pancreatitis. *Int. J. Pancreatol.* 2000, 28: 41-49.
 39. Maruna, P., Gurlich, R., Mašek, Z.: Procalcitonin an early marker of postoperative sepsis. The comparison with a set of cytokines and soluble receptors. *Intensive Care Med.*, 1998, 22: 139.
 40. Mimos, O., Benoist, J. F., Edouard, A. R., Assicot, M., Bouhoun, C., Samii, K.: Procalcitonin and C-reactive protein during the early posttraumatic systemic inflammatory response syndrome. *Intensive Care Med.*, 1998, 24: 185-188.
 41. Ozkan, H., Celik, O., Hatipoglu, E., Kantarci, F., Kadioglu, P.: Procalcitonin can be used as a marker of premature atherosclerosis in acromegaly. *Pituitary*, 2011 Jul 7.
 42. Penel, N., Foyrrier, C., Clisant, S., Nguyen, M.: Causes of fever and value of C-reactive protein and procalcitonin in differentiating infections from paraneoplastic fever. *Support Care Cancer* 12: 593-598.
 43. Reinhart, K., Meisner, M.: Biomarkers in the critically ill patient: procalcitonin. *Crit. Care Clin.*, 2011 Apr, 27(2): 253-63.
 44. Ruokonen, E., Ilkka, L., Niskanen, M. J., Takala, J.: Procalcitonin and neopterin as indicators of infection in critically ill patients. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2002, 46: 398-404.
 45. Sabbatani, S., Manfredi, R., Marinacci, G., Chiodo, F.: Community-acquired pneumonia and sepsis by multiresistant *Staphylococcus aureus* strain resulting in a severe and long-lasting multiple organ inflammatory involvement. *Eur. J. Inflamm*, 2006, 117-124.
 46. Sauer, M., Tiede, K., Volland, R., Fuchs, D., Zintl, F.: Procalcitonin in comparison to C-reactive protein as markers of the course of sepsis in severely immunocompromised children after bone marrow transplantation. *Clin Paediatr.* 2000, 212: 10-5.
 47. Schwarz, S., Bertram, M., Schwab, S., Andrassy, K., Hacke, W.: Serum procalcitonin levels in bacterial and abacterial meningitis. *Crit. Care Med.*, 2000, 28: 1828-1832.
 48. Schwenger, V., Sis, J., Breitbart, A., Andrassy, K.: CRP levels in autoimmune disease can be specified by measurement of procalcitonin. *Infection*, 1998, 26: 274-276.
 49. Sinha, M., Desai, S., Mantri, S., Kulkarni, A.: Procalcitonin as an adjunctive biomarker in sepsis. *Indian J. Anaesth.*, 2011 May, 55(3): 266-70.

50. Schuttrump, S., Binder, L., Hageman, T., Berkovie, D., Trumper, L., Binder, C.: *Procalcitonin: a useful discriminator between febrile conditions of different origin in hematooncological patients*. 2003. Ann. Hematol, 82: 98–108.
51. Spahr, L., Morard, I., Hadengue, A., Vadas, L., Pugin, J.: *Procalcitonin is not an accurate marker of spontaneous bacterial peritonitis in patients with cirrhosis*. Hepatogastroenterology, 2001, 48: 502–505.
52. Viallon, A., Zeni, F., Pouzet, V., Lambert, C., Quenet, S., Aubert, G., Guyomarch, S., Tardy, B., Bertrand, J. C.: *Serum and ascitic procalcitonin levels in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis-diagnostic value and relationship to pro-inflammatory cytokines*. Intensive Care Med., 2000, 26: 1082–1088.
53. Wagner, F. D., Jonitz, B., Potapov, E., Qedra, N., Wagscheider, K., Weinmann, E., Loebe, M., Hetzer, R.: *Procalcitonin-a donor specific predictor of early graft failure and early graft failure mortality after heart transplantation*. J. Heart Lung Transplant., 2001, 20: 206.

KATECHOLAMÍNY V KLINICKEJ BIOCHÉMII

Eva Ďurovcová¹, Jana Mašlanková²
Miroslava Bilecová-Rabajdová², Anna Birková²
Mária Mareková^{2*}

¹LABMED, a. s., Srbská 4, 040 01 Košice

²Ústav lekárskej a klinickej biochémie UPJŠ LF v Košiciach

Tr. SNP 1, 040 01 Košice

*maria.marekova@upjs.sk

SÚHRN

Stanovenie katecholamínov a ich metabolitov v krvi a moči má význam najmä v klinicko-biochemickej diagnostike nádorov produkujúcich katecholamíny. Prehľadnou formou informujeme o súčasnom stave poznatkov o syntéze, degradácii, analytických možnostiach a klinickom využití stanovenia katecholamínov.

SUMMARY

Determination of catecholamines and their metabolites in blood and urine is of particular relevance in clinical biochemical diagnosis of tumors producing catecholamines. Friendly form we inform about the current state of knowledge in synthesis, degradation, analytical capabilities and determining the clinical use of catecholamines.

ÚVOD

Katecholamíny (KCHA) - dopamín, noradrenalin a adrenalin sú organické zlúčeniny s katecholovým jadrom, t.j. benzénovým jadrom s 2 hydroxylovými skupinami v polohách 3 a 4. Sú súčasťou sympatiko-adrenomedulárneho systému, ktorý sa podieľa na neurohumorálnej regulácii organizmu. Pôsobia ako neurotransmitéry v centrálnom a periférnom sympatikovom nervovom systéme aj ako hormóny produkované chromafínnymi bunkami drene nadobličiek.

Stanovenie KCHA a ich metabolitov v plazme a moči má významnú úlohu najmä v diagnostike KCHA produkujúcich nádorov (Lenders *a kol.*, 2002; Stejskal *a kol.*, 2005). Dôležité informácie poskytujú taktiež pri detegovaní niektorých neurodegeneratívnych a srdcovocievnych ochorení (srdcové zlyhanie) a v diferenciálnej diagnostike hypertenzie, prípadne diabetu (Moraes *a kol.*, 2010).

Posledné dve desaťročia spresnili naše vedomosti o lokalizácii a dynamike metabolizmu KCHA. Tento prehľad má za cieľ informovať o niektorých novších poznatkoch o syntéze, uskladňovaní, uvoľňovaní a de-

gradácii KCHA, ako aj o súčasnom stave analytiky a klinického využitia stanovenia KCHA ich metabolitov.

Syntéza katecholamínov

Katecholamíny - dopamín, noradrenalin a adrenalin (obr. 1 - vid' Príloha č. 2, str. 171) sú syntetizované z tyrozínu v centrálnych a postgangliových sympatikových neurónoch a v chromafínných bunkách drene nadobličiek. Tyrozín, ktorý pochádza z potravy alebo sa tvorí hydroxyláciou fenylalanínu v pečeni, je ďalej hydroxylovaný enzýmom tyrozinhydroxylázou (TH) na L-3,4-dihydroxyfenylalanín (L-DOPA).

Ďalšia biosyntéza prebieha v jednotlivých orgánoch a tkanivách odlišne (tab. 1) V dopaminergných neurónoch pôsobením jediného enzýmu, dekarboxylázy aromatických kyselín (L-aromatic acid decarboxylase - AADC, pôvodne označovaný ako L-DOPA-dekarboxyláza), sa L-DOPA premieňa na dopamín. V noradrenergických neurónoch syntéza pokračuje hydroxyláciou dopamínu na noradrenalin dopamín- β -hydroxylázou (DBH). Metylácia noradrenalinu na adrenalin účinkom fenyletanolamín-N-metyltransferázy (PNMT), prebieha len v centrálnych adrenergických neurónoch a v dreni nadobličiek. Podrobná schéma biosyntézy KCHA presahuje rámec tohto článku a jedna z najnovších je dostupná v práci Mašlanková *a kol.* (2011).

Tab. 1 Prehľad konečných produktov biosyntézy KCHA podľa lokalizácie

| Štruktúra, orgán | Konečný produkt |
|-----------------------------------|-----------------|
| Centrálné dopaminergické neuróny | dopamín |
| Centrálné noradrenergické neuróny | noradrenalin |
| Centrálné adrenergické neuróny | adrenalin |
| Periférne sympatikové zakončenia | noradrenalin |
| Dreň nadobličiek | adrenalin |

Degradácia katecholamínov

Neuronálne aj extra-neuronálne - nadobličkové chromafínné bunky uskladňujú syntetizované KCHA do zásobných vezikúl - chromafínných zrn vo forme komplexov s ATP a neuropeptidom chromogranínom A, pričom tieto zásoby sú veľmi dynamické. KCHA pasívne unikajú zo zásobných vezikúl do cytoplazmy a následne sa až 90% z nich vracia späť cestou monoaminových transportérov. Aj väčšina extracelulárne uvoľňovaných KCHA sa taktiež spätne vychytáva - zo synaptickej štrbiny postgangliových neurónov alebo z extracelulárnej tekutiny chromafínných buniek drene nadobličiek. Za kludových podmienok sa teda podstatná časť metabolizmu KCHA odohráva v cytoplazme buniek, ktoré ich syntetizujú, len menšia časť metabolitov sa tvorí

z KCHA odstraňovaných z cieľových buniek a z cirkulácie (obr. 2 – vid' Príloha č. 2, str. 171).

KCHA sú rýchlo metabolizované katechol-O-metyltransferázou (*COMT*) a monoaminoxidázou (*MAO*) na inaktívne O-metylované a deaminované metabolity. *COMT* sa nachádza v synaptickej štrbine a katalyzuje pridanie metylovej skupiny k benzénovému jadru, obvykle v pozícii 3 (meta), pričom ako donor metylovej skupiny potrebuje S-adenozylmetionín.

Hlavným degradačným enzýmom je intra- a extracelulárne sa vyskytujúca *MAO* vyžadujúca k svojmu účinku kofaktor flavínadenín-dinukleotid (*FAD*). Oxidatívnou deamináciou vznikajú z KCHA nestabilné aldehydové medziprodukty, ktoré sa v ďalšom stupni účinkom reduktáz a dehydrogenáz metabolizujú na stabilnejšie produkty – alkoholy alebo kyseliny (obr. 3 – vid' Príloha č. 2, str. 172). Hlavným deaminačným produktom katecholamínov je DHPG (3,4-dihydroxyfenylglykol).

Sympatikové neuróny obsahujú len *MAO*, preto intra-neuronálna degradácia noradrenalínu vedie k vzniku deaminovaného metabolitu 3,4-dihydroxyfenylglykolu (DHPG), ale netvorí sa O-metylovaný metabolit normetanefrín. Takmer všetok DHPG v plazme pochádza teda z neuronálnych zdrojov. Rovnako aj väčšina ďalšieho metabolitu – 3-metoxy-4-hydroxyfenylglykolu (MHPG) pochádza z intra-neuronálnej O-metylácie DHPG, ktorý je uvoľňovaný zo sympatikových neurónov do extracelulárnej tekutiny. Relatívne malá časť MHPG pochádza z deaminácie normetanefrínu vznikajúceho v extra-neuronálnych tkanivách.

Bunky drene nadobličiek obsahujú oba degradačné enzýmy – *MAO* aj *COMT*, pričom *COMT* sa vyskytuje ako enzým viazaný na bunkovú membránu a má vyššiu afinitu ku KCHA ako rozpustné formy *COMT* iných tkanív, napr. pečene a obličiek. Nadobličky predstavujú najväčší zdroj O-metylovaných metabolitov adrenalinu a noradrenalinu – metanefrínov. Až 93 % cirkulujúceho metanefrínu a 40 % normetanefrínu pochádza z adrenálnych chromafinných buniek.

Voľné metanefríny uvoľňované z drene nadobličky do krvi sa v gastrointestinálnom trakte konjugujú účinkom sulfotransferázy (*SULT1A3*) a vo forme sulfokonjugátov sa vylučujú močom (obr. 4 – vid' Príloha č. 2, str. 173). Konečný produkt degradácie KCHA predstavuje kyselina vanilmandľová (*VMA*), ktorá vzniká v pečeni najmä oxidáciou v krvi cirkulujúceho medziproduktu odbúravania metanefrínov – MHPG účinkom hepatálnych alkohol- a aldehyd dehydrogenáz (Eisenhofer *a kol.*, 2004).

Biologické účinky katecholamínov

KCHA pôsobia na efektorové bunky prostredníctvom viacerých typov špecifických membránových receptorov. Dopamín, prekursor noradrenalinu, predstavuje jeden z najdôležitejších neurotransmitérov v mozgu, kde ovplyvňuje viaceré psychické (nálada, emócie), kognitívne motorické funkcie (McMorris *a kol.*, 2008). Na periférii sprostredkuje vazodilatáciu v renálnom, mezenterálnom, koronárnom a cerebrálnom krvnom riečisku. Aktivácia

dopamínových receptorov DA_2 inhibuje sekréciu prolaktínu a aldosterónu. Noradrenalin je druhým dôležitým neurotransmitterom v CNS, kde pôsobí prevažne excitačne a ovplyvňuje napr. náladu, pozornosť, pocit sýtosti a mnohé ďalšie funkcie. Základnou funkciou na periférii je udržiavanie normálneho krvného tlaku (generalizovaná vazokonstrikcia) prostredníctvom α -adrenergických receptorov na sympatikových postgangliových zakončeníach v cievach. Koncentrácia noradrenalinu v plazme je indikátorom aktivity sympatického nervového systému. Adrenalin je produkovaný predovšetkým v dreni nadobličky a je považovaný za typický stresový hormón. Pôsobí ako neselektívny β - aj α -agonista s mnohými hemodynamickými aj metabolickými účinkami (Tab. 2). Spôsobuje vazokonstrikciu v koži, slizniciach a obličkách a vazodilatáciu v kostrovom svalstve a pečeni. Priame metabolické účinky zahŕňajú najmä stimuláciu pečenej glykogenolýzy a glukoneogenézy, vyplavovanie aminokyselín zo svalov, stimuláciu lipolýzy a následnej ketogenézy v pečeni.

Katecholamíny a ich metabolity v krvi

V krvi cirkulujú nezmenené KCHA a tiež ich metabolity. Väčšina KCHA sa nachádza vo forme biologicky neúčinných konjugátov, predovšetkým sulfokonjugátov. V porovnaní s voľnými, je koncentrácia konjugovaného noradrenalinu asi 1,5-krát a konjugovaného adrenalinu asi 4-krát vyššia.

Noradrenalin

Plazmatické koncentrácie noradrenalinu za kludových podmienok nepresahujú 3 nmol/l (Lenders *a kol.*, 2002). Asi 50–60 % noradrenalinu sa v krvnom obehu voľne viaže na albumín. Odhaduje sa, že iba malá časť noradrenalinu (2 %) má pôvod v dreni nadobličiek. Väčšina plazmatického noradrenalinu pochádza zo sympatikovej inervácie malých artérií a arteriol, ktoré sú hlavnými faktormi ovplyvňujúcimi periférny odpor, a preto zásadne ovplyvňujú krvný tlak. Hladiny noradrenalinu merané v arteriálnej plazme sú pravdepodobne najlepším ukazovateľom sympatikovej nervovej činnosti (Burtis *a kol.*, 2001). Na vyvolanie kardiovaskulárnych alebo metabolických efektov je potrebná suprafyziologická koncentrácia.

Adrenalin

Adrenalin je hormónom v klasickom zmysle slova, ktorý sa tvorí a secernuje z drene nadobličiek vplyvom mnohých záťažových faktorov – stresorov.

Hladiny adrenalinu vo venóznej plazme nepresahujú 0,5 nmol/l a predstavujú asi desatinu hodnôt hladiny noradrenalinu za bazálnych podmienok. Za patologických stavov, ako je infarkt myokardu a stavoch s obehovým šokom môžu stúpať hladiny adrenalinu až 100-násobne.

Dopamín

Dopamín sa v plazme nachádza vo veľmi nízkych koncentráciách, pričom väčšina (asi 99 %) sa nachádza

Tab. 2 Periférne účinky adrenalínu a noradrenalínu

| Receptory | Alfa-1 | Alfa-2 | Beta-1 | Beta-2 |
|----------------------|-------------------------|---------------------------|--|------------------------------|
| | Aktivácia fosfolipázy C | Inhibícia adenylátcyklázy | Aktivácia adenylátcyklázy | Aktivácia adenylátcyklázy |
| Srdce | | | Pozitívny inotrópny, chronotrópny, dromotrópny a batmotrópny efekt | Pozitívny chronotrópny efekt |
| Cievy | Vazokonstrikcia | Vazokonstrikcia | | Vazodilatácia |
| Bronchy | | | | Bronchodilatácia |
| Motilita a tónus GIT | Pokles | Pokles | Pokles | Pokles |
| Maternica | Kontrakcie | | | Relaxácia |
| Trombocyty | Agregácia | Agregácia | | |
| Oči | Mydriáza | | | |
| Tónus močových ciest | Nárast | | | |

vo forme sulfokonjugátov (Burtis a kol., 2001). Pôvod plazmatického dopamínu sa odvodzuje z troch zdrojov: 1. Sympatikové noradrenergne neuróny uvoľňujú dopamín spolu s noradrenalinom; 2. Syntéza v GIT - z tyrozínu prijatého potravou alebo lokálna syntéza v tzv. APUD bunkách - je zdrojom najmä konjugovaného dopamínu; 3. Obličky vychytávajú a dekarboxylujú DOPA z krvi, pričom takto vznikajúci dopamín má lokálne natriuretické účinky (Goldstein a Holmes, 2008).

Metanefríny

V extra-neuronálnych tkanivách a v dreni nadobličiek vznikajú účinkom *COMT* O-metylované metabolity adrenalínu - metanefrín a noradrenalínu - normetanefrín. Voľné metanefríny sa rýchlo odstraňujú z cirkulácie rovnakými extraneuronálnymi monoamínovými transportérmi, aké sú zodpovedné za rýchly klírens KCHA v rámci neurónov. Následne sa metabolizujú účinkom *MAO* na MHPG alebo konjugujú účinkom sulfotransferázy (*SULT1A3*) v gastrointestinálnych tkanivách. V praxi sa využíva stanovenie celkových a v poslednom čase najmä voľných plazmatických metanefrínov. U pacientov s nedostatočnou funkciou obličiek sa plazmatické konjugované metanefríny zvyšujú v dôsledku spomaleného klírensu, kým na voľné metanefríny majú obličky len malý vplyv. V porovnaní s KCHA sú koncentrácie metanefrínov menej ovplyvňované faktormi aktivujúcimi sympatikovo-adrenálny systém (Eisenhofer a kol., 2005).

Katecholamíny a ich metabolity v moči

KCHA sa v moči vyskytujú ako voľné amíny a vo forme konjugátov najmä s kyselinou sírovou. Stanovenie voľných KCHA a ich metabolitov v moči patrí ešte stále k základným biochemickým testom pri podozrení

na feochromocytóm (Grossman, 2006). Vzhľadom na variáciu vo vylučovaní KCHA v priebehu dňa je na vyšetrenie najvhodnejší 24-hodinový moč. Výsledky vyšetrenia sú vyhodnocované ako denná exkrécia alebo sú udávané vo vzťahu k exkrécii kreatinínu, najmä ak nie je dostupný zbieraný 24-hodinový moč, napr. pri vyšetovaní novorodencov, malých detí a pri vyšetovaní dospelých s paroxyzmálnou hypertenziou (Burtis a kol., 2001).

Voľné biogénne amíny

Nemetabolizované katecholamíny (noradrenalin aj adrenalin) sa močom vylučujú v približne rovnakých vzájomných pomeroch, v akých sa nachádzajú v plazme. Močový dopamín sa syntetizuje priamo v obličkách z DOPA a jeho koncentrácia je približne 10-krát väčšia ako noradrenalinu.

Metanefríny

O-metylované metabolity KCHA - metanefrín (MN) a normetanefrín (NMN) sa nachádzajú v moči vo forme voľných amínov a ako konjugáty s kyselinou glukurónovou alebo sírovou. Na rozdiel od adrenalínu a noradrenalínu je exkrécia metanefrínov menej ovplyvňovaná stravou. V praxi sa stanovujú ako celkové metanefríny spektrofotometrickými metódami alebo ako frakcionované metanefríny (MN + NMN) po ich dekonjugácii metódou HPLC (Oeltmann a kol., 2004).

Kyselina vanilmandľová

Kyselina vanilmandľová (VMA) je hlavným metabolitom odbúravania KCHA, ktorý predstavuje asi 60% z celkovej exkrécie degradačných produktov KCHA. Patologické hladiny VMA v plazme a v moči indikujú rovnaké spektrum ochorení ako stanovenia iných KCHA, avšak pre

vyššiu senzitivitu a špecifickosť novších biochemických testov sa využíva najmä v diagnostike neuroblastómov u detí (Strenger *a kol.*, 2007). Na stanovenie VMA v moči boli vyvinuté mnohé fotometrické, chromatografické a elektroforetické metódy. V súčasnej praxi je najbežnejšie používanou metódou HPLC (Burtis *a kol.*, 2001).

Predanalytické faktory ovplyvňujúce stanovenia KCHA

Koncentráciu KCHA v krvi zvyšujú mnohé fyziologické aj nefyziologické stresory. Stresorom môžu byť rôzne somatické alebo psychické faktory, napr. hypoglykémia, hypovolémia, chlad, hypoxia, asfyxia, hemorágia, fyzická námaha, bolesť, strach, napätie, hluk, spánková deprivácia a mnohé ďalšie.

Hladina KCHA počas mentálneho stresu dosiahne maximum v priebehu 3 minút a k ustáleniu ich hladiny dochádza v priebehu 6–8 minút po stimulácii. Stresory psychického charakteru vyvolávajú výraznejšie zvýšenie hladiny adrenalínu ako noradrenalínu, kým somatické stresory, napr. fyzická námaha značne zvyšuje hladinu noradrenalínu aj adrenalínu (Wuorinen *a kol.*, 2008). Fyziologické hladiny plazmatických KCHA ovplyvňuje aj poloha tela (tab. 3). Po zmene polohy z ľahu do stoja sa hladiny KCHA zvyšujú približne trojnásobne (Burtis *a kol.*, 2001).

Tab. 3 Fyziologické hladiny plazmatických katecholamínov v závislosti od polohy tela

| Poloha | Noradrenalin (ng/l) | Adrenalin (ng/l) | Dopamin (ng/l) |
|------------------|---------------------|------------------|----------------|
| v ľahu (30 min) | 110 až 410 | < 50 | < 87 |
| v sede (15 min) | 120 až 680 | < 60 | < 87 |
| v stoji (30 min) | 125 až 700 | < 90 | < 87 |

Hladina KCHA a metanefrínov podlieha aj cirkadiálnym zmenám s maximom medzi 6. až 18. hodinou a nočným minimom, čo odráža zvýšený tonus sympatiku v bdelom a aktívnom stave počas dňa (Scheer *a kol.*, 2010).

Z praktického hľadiska sú významné 3 potenciálne zdroje falošne pozitívnych výsledkov: stresory, potrava a lieky.

Dlho je známy fakt, že biogénne amíny obsiahnuté v mnohých potravinách môžu pozitívne interferovať pri stanoveniach KCHA. Na biogénne amíny sú bohaté najmä banány, ananás, káva, čaj, čokoláda a kakao. Potravou prijaté amíny sú substrátom pre *COMT* a vznikajúce O-metylované metabolity – metanefríny sa konjugujú

u tráviacom trakte s kyselinou sírovou, čo vedie k zvýšeniu najmä ich konjugovaných foriem. Naopak, najmenej sú diétou ovplyvňované voľné metanefríny (De Jong *a kol.*, 2009). Zvýšené koncentrácie KCHA sú obvyklé u obéznych jedincov a pri diéte s nízkym obsahom sodíka sa zvyšujú plazmatické koncentrácie noradrenalínu a adrenalínu (Grossman, 1998). Zvýšenie KCHA a ich metabolitov je pozorované po mnohých liečivách, ktoré:

- zvyšujú uvoľňovanie, znižujú spätné vychytávanie alebo inhibujú odbúravanie endogénnych KCHA (napr. tricyklické antidepresíva, inhibítory *MAO*, beta-blokátory, klonidín, rezerpín, fentanyl, amfetamín, kofeín, kokain, lidokain);
- priamo metabolizujú na endogénne KCHA (napr. α -metyldopa, L-DOPA);
- akútne menia plazmatický objem (napr. diuretiká, rtg kontrastné látky, syntetický antidiuretický hormón DDAVP – Grossman *a kol.*, 2006).

Interferencie týchto látok s analytickými metódami sú veľmi rozdielne, ako je vidieť aj z tabuľky 4 (Eisenhofer, 2003).

Tab. 4. Zdroje analytických interferencií pri stanoveniach KCHA a ich metabolitov

| Látka | Vplyv na analytickú metódu |
|---|--|
| stimulanty-kofeín, nikotín | HPLC: plazmatické a močové KCHA |
| labetalol | spektrofotometria, fluorimetria: močové KCHA + MN |
| solatol | HPLC: plazmatické KCHA |
| paracetamol | HPLC: voľné plazmatické MN |
| buspiron | HLPC: močové MN |
| levodopa, α -metyldopa | HLPC: plazmatické a močové KCHA a ich metabolity |
| sympatikomimetiká (efedrín, amfetamín...) | spektrofotometria, fluorimetria: plazmatické a močové KCHA |
| TCA | všetky: plazmatický a močový NA, NMN a VMA |
| fenoxybenzamin | všetky: plazmatický a močový NA, NMN a VMA |
| inhibítory <i>MAO</i> | všetky: plazmatické aj močové MN |
| blokátory Ca^{2+} kanálov | HLPC: plazmatické KCHA |

Na elimináciu vymenovaných interferujúcich faktorov je potrebné dodržať prípravu pacienta a špecifické podmienky odberu: pred vyšetrením KCHA a ich metabolitov sa odporúča vynechať vyššie vymenované lieky zasahujúce do metabolizmu KCHA, ale aj bron-

chodilatanciá, α 2-agonisty a blokátory Ca-kanálov, vrátane nosných kvapiek a liekov proti prechladnutiu s obsahom fenylefrínu. Najmenej 3 dni pred odberom je potrebné vynechať v potrave kávu, čaj, čokoládu, banány, vanilku, alkohol a taktiež nefajčiť a nevykonávať ťažkú fyzickú prácu.

Odber krvi sa robí ráno nalačno, po 8–12 hodinovom hladovaní, v polohe poležiačky. Venózna kanyla sa zavádza 30 minút pred odberom, aby sa eliminoval stres z odberu. Krv odobratá do EDTA alebo heparínu sa ihneď po odbere umiestňuje do ľadovej drte a je potrebné zabezpečiť chladenie vzorky počas celého rýchleho transportu do laboratória. Moč sa zbiera počas 24 hodín do nepriehľadnej nádoby s obsahom 10 ml koncentrovanej HCl, ktorá zabezpečí pH pod 4,0. Počas celého zberu má byť vzorka skladovaná v chlade a tme.

Analytické aspekty stanovenia KCHA a ich metabolitov

KCHA sú v biologických materiáloch obsahujúcich enzýmy MAO a COMT nestabilné a ľahko oxidovateľné, čo je častou príčinou stanovenia ich falošne nízkych koncentrácií. Na inhibíciu enzýmovej degradácie sa využíva deproteinizácia a pridávanie inhibítorov deaminácie, napr. semikarbazidu (Kuhlenbeck *a kol.*, 2000). V rámci predúpravy vzorky sa používajú menej špecifické extrakcie kvapalina-kvapalina alebo extrakcia kvapalina-pevná látka, ktorá si vyžaduje premývacie procedúry (Talwar *a kol.*, 2002). Nová extrakčná metóda vyvinutá Qiaom *a kol.* (2011) je založená na separácii magnetických nanočastíc a eliminuje nevýhody predchádzajúcich starších spôsobov extrakcie.

Najpoužívanejšou metódou stanovenia KCHA je HPLC, ktorá umožňuje analyzovať extrakt pomocou chromatografie s reverznou fázou, kde stacionárna fáza je nepolárna (modifikovaný silikagél) a mobilná fáza je polárna. Metóda HPLC môže byť upravená na simultánne meranie všetkých metabolitov katecholamínov.

Vysoko účinná kvapalinová chromatografia (HPLC) využíva niekoľko typov detektorov. Lin *a kol.* (2006) publikovali dôkladnú analýzu podmienok pre separáciu KCHA, ktoré využívajú chirálnu separáciu a detekciu pomocou UV detektora. Yoshitake *a kol.* (2007) využívali na separáciu dopamínu, serotonínu, noradrenalinu a ich metabolitov dvojité derivatizáciu, pri ktorej využívali benzylamín a 1,2-difenyletylendiamín na produkciu stálejších derivátov. Tieto deriváty boli jednoduchšie detegovateľné pomocou fluorescenčného detektora. Detekcia založená na meraní fluorescenčného žiarenia je veľmi selektívna a vysoko citlivá pre určité látky. Jej výhodou je, že nie je ovplyvňovaná mobilnou fázou, ako to je u HPLC s elektrochemickým detektorom. Vo fluorescencii sa využívajú excitačné a emisné žiarenia s rozličnou vlnovou dĺžkou, čím sa znižuje pravdepodobnosť detekcie interferujúcich látok po chromatografickej separácii (Wood a Hall, 2000). Na stanovenie KCHA sa využíva natívna fluorescenčná detekcia a fluorescenčná detekcia po derivatizácii katecholamínov s fluorescenčným

čínidlom. KCHA fluoreskujú v UV oblasti čo sa využíva v natívnej fluorescenčnej detekcii. Pri stanovovaní sa ako fluorescenčné činidlá využívajú napr. O-ftalaldehyd (Bowser *a kol.*, 2001), etylendiamín (Hirano *a kol.*, 2005), naftalén-2,3-dikarboxaldehyd (Huang *a kol.*, 2005) a mnoho ďalších.

Na kvantifikáciu KCHA sa najčastejšie používa elektrochemická detekcia pomocou ampérometrickeho (Linert a Jameson, 2000) alebo coulometrickeho merania (Yu *a kol.*, 2003). Výhodou použitia elektrochemických detektorov je možnosť detegovať látky s vhodnými elektrochemickými vlastnosťami pri veľmi nízkych koncentráciách 10^{-9} – 10^{-10} mol/l. Táto metóda je vysoko citlivá aj bez použitia derivatizácií, ktoré sa používajú na dosiahnutie separácie s vyšším rozlíšením. Elektrochemickou oxidáciou sa KCHA ľahšie konvertujú na chinóny a na sekundárne produkty, závislé na pH. Jedným zo sekundárnych produktov je neuromelanín, ktorý zohráva dôležitú úlohu pri rozvoji Parkinsonovej choroby (Drukarch *a kol.*, 2000; Linert *a kol.*, 2000). HPLC s elektrochemickou detekciou je vhodnou metódou na stanovovanie katecholamínov pre jej celkovú citlivosť, presnosť, opakovateľnosť a rýchlosť analýzy (Vicente-Torres *a kol.*, 2002; Grossman, 2006).

Citlivejším detektorom ako fluorescenčný sa javí chemiluminiscenčný detektor (Adcock *a kol.*, 2005; Nalewajko *a kol.*, 2007). Na stanovenie katecholamínov sa využíva peroxy-oxalátová (Tsunoda *a kol.*, 2005) a elektro-generovaná chemiluminiscencia (Fährnich *a kol.*, 2001). Chemiluminiscenčná detekcia sa využíva najmä v spojení s chromatografiou, kapilárnou elektroforézou alebo imunometódami.

Veľmi populárnou detekciou sa v posledných rokoch stáva hmotnostná spektrofotometria – MS (Hows *a kol.*, 2004; Tornkvist *a kol.*, 2004; Uutela *a kol.*, 2009). Táto metóda sa využíva na detekciu látok s nízkou koncentraciou, ako sú napríklad monoamíny a ich metabolity s ešte nižšou koncentraciou. Citlivosť MS bola rozhodujúcim faktorom pri výbere detektora na stanovenie monoamínov v dialyzáte po značení dietylom (Ji *a kol.*, 2008).

Procopiu *a kol.* (2009) testovali novú enzýmovú imunoanalytickú metódu (EIA) na stanovovanie voľných metanefrínov v plazme. Stanovenie voľných metanefrínov v plazme malo v diagnostike feochromocytómu vyššiu citlivosť a špecifitu ako stanovenie močových metanefrínov (SN 91 % versus 83 %, SP 100 % versus 95 %). Aj keď mnohé štúdie potvrdili diagnostickú efektivitu stanovenia voľných plazmatických a frakcionovaných močových metanefrínov v diagnostike KCHA produkujúcich nádorov, analytická náročnosť HPLC niekedy brzdí jej široké zavedenie do rutínnej medicínskej praxe. Stanovenia metanefrínov na princípe značených imunochemických metód môže byť riešením pre pracoviská, ktoré nedisponujú náročnou technikou.

Klinický význam stanovenia katecholamínov

Poznanie lokalizácie a metabolizmu systémov produkujúcich KCHA je základom pre pochopenie ich

fyziologickej funkcie aj úlohy pri vzniku patologických stavov. Hlavné využitie stanovenia katecholamínov v klinickej praxi predstavuje diagnostika nádorov produkujúcich KCHA.

Feochromocytóm je neuroendokrinný nádor vznikajúci z chromafinných buniek embryonálnej neurálnej lišty, ktorý sa väčšinou vyskytuje v dreni nadobličky. Extra-adrenálne lokalizované nádory nazývané paragangliómy sa nachádzajú v miestach výskytu sympatikových nervových tkanív (brušná, hrudná dutina, krk). Ochorenie sa vyskytuje sporadicky alebo ako súčasť genetických syndrémov (familiárne), napr. syndrómu mnohonásobnej endokrinnéj neoplázie (MEN) typu 2, ochorenia von Hippel-Lindau a neurofibromatózy typu I. V minulosti bol feochromocytóm v klinike označovaný ako „nádor desiatok“: 10 % nádorov je extra-medulárnych, 10 % bilaterálnych, 10 % malígnych, 10 % asymptomatických a 10 % familiárnych. V súčasnosti vďaka pokroku v diagnostických metódach a najmä v genetike sa tieto čísla zmenili: výskyt extra-adrenálnych nádorov je asi 20 %, pričom viac ako 30 % z nich je malígnych, takmer 25 % nádorov je familiárnych a u niektorých špecifických mutácií je malígny priebeh ešte častejší (Adler *a kol.*, 2008). V súvislosti s rozšíreným používaním zobrazovacích vyšetrení brucha narastá počet náhodne diagnostikovaných nadobličkových nádorov, tzv. incidentalómov, z ktorých asi 5 % tvoria feochromocytómy. Napriek vzácnemu výskytu (incidencia 8–10/1 000 000) predstavuje feochromocytóm závažné ochorenie, ktoré je pri rýchlom stanovení diagnózy a intervencii liečiteľné.

Nádory secernujú prevažne zmes adrenalínu a noradrenalínu, niektoré len noradrenalín. Klinické prejavy varujú od asymptomatických foriem až po formy s veľmi pestrou symptomatológiou, ktorá závisí od spektra a množstva vylučovaných KCHA (Stejskal *a kol.*, 2005). Typickým príznakom je arteriálna hypertenzia, ktorá môže byť trvalá alebo paroxyzmálna (Galetta *a kol.*, 2010). Častejší výskyt trvalej hypertenzie bol pozorovaný u pacientov s nádorom produkujúcim prevažne noradrenalín, kým pacienti s prevažujúcou sekréciou adrenalínu majú sklon k paroxyzmálnym vzostupom krvného tlaku sprevádzanému bolesťami hlavy, potením, tachykardiou, tremorom, bledosťou a panickou úzkosťou (Manger *a kol.*, 2006). Metabolické prejavy zahŕňajú hyperglykémiu, laktátovú acidózu a chudnutie.

Laboratórna diagnóza feochromocytómu je založená na stanovovaní katecholamínov a ich metabolitov v krvi a moči. Po nej nasleduje lokalizácia nádoru pomocou zobrazovacích vyšetrení anatomických (CT, MRI) aj funkčných (^{123}I -MIBG a ^{131}I -MIBG scintigrafia, ^{18}F -FDG PET) (Grosman, *a kol.* 2006; Makaiová *a kol.* 2011).

Keďže feochromocytómy secernujú heterogénnu zmes KCHA a ich metabolitov, navyše často intermitentne a v nízkych množstvách, v klinickej praxi sa používa širšia paleta testov, aby sa zvýšila pravdepodobnosť diagnostikovania nádoru. Koncentrácie plazmatických a močových KCHA môžu byť normálne u asymptomatických pacientov, v obdobiach medzi záchvatmi

paroxyzmálnej hypertenzie a pri skriningu u pacientov s hereditárnou predispozíciou alebo u tzv. incidentalómov. Naopak, nie každý pozitívny test indikuje prítomnosť feochromocytómu. V diagnostike sa preto na lepšie odlišenie správne a falošne pozitívnych výsledkov využívajú viac ako klasické referenčné intervaly rôzne rozhodovacie intervaly, či *cut off* hodnoty – tab. 5 (Lenders, *a kol.*, 2002).

Tab. 5. Pravdepodobnosť feochromocytómu pri rôznych *cut off* hodnotách KCHA

| KCHA (HPLC) | Prítomnosť nádoru | | |
|--------------------------------|-------------------|-----------|---------------|
| | nepravdepodobná | možná | pravdepodobná |
| U-noradrenalin (nmol/24 hod) | < 500 | 500–1180 | >1180 |
| U-adrenalin (nmol/24 hod) | < 100 | 100–170 | >170 |
| U-normetanefrin (nmol/24 hod) | < 3000 | 3000–6550 | >6550 |
| U-metanefrin (nmol/24 hod) | < 1000 | 1000–2880 | >2880 |
| VMA* ($\mu\text{mol}/24$ hod) | < 40 | 40–55 | >55 |
| P-noradrenalin (nmol/l) | < 3,00 | 3,00–7,70 | >7,70 |
| P-adrenalin (nmol/l) | < 0,45 | 0,45–1,20 | >1,20 |
| P-normetanefrin (nmol/l) | < 0,60 | 0,60–1,40 | >1,40 |
| P-metanefrin (nmol/l) | < 0,30 | 0,30–0,42 | >0,42 |

Vysvetlivky: P – plazmatický, U – močový

* – spektrofotometrická metóda

Pribúdajúce dôkazy z posledných rokov potvrdili, že stanovenie voľných metanefrinov v plazme alebo frakcionovaných metanefrinov v moči (tab. 6) je najcitlivejším biochemickým testom na vylúčenie či potvrdenie feochromocytómu (Sawka *a kol.*, 2003; Unger *a kol.*, 2006; Grouzman *a kol.*, 2010). Aj 1. medzinárodné sympóziu o feochromocytóme v roku 2005 odporúčalo pre diagnostiku feochromocytómu stanovenie voľných plazmatických metanefrinov alebo frakcionovaných močových metanefrinov, prípadne obe ako testy prvej voľby pri podozrení na feochromocytóm (Pacak *a kol.*, 2005).

Tab. 6. Senzitivita a špecificita biochemických testov pri diagnostike feochromocytómu

| Parameter | Senzitivita % | Špecificita % |
|--------------------|---------------|---------------|
| P-voľné MN | 99 | 89 |
| P-KCHA | 84 | 81 |
| U-frakcionované MN | 97 | 69 |
| U-celkové MN | 77 | 93 |
| U-KCHA | 86 | 88 |
| U-VMA | 64 | 93 |

Upravené podľa Lendersa *a kol.*, 2002

O výhodách či nevýhodách stanovenia metanefrínov v plazme či v moči (tab. 7) sa vedú dlhé roky diskusie, no zdá sa, že v porovnaní so stanoveniami v moči majú plazmatické MN nasledovné výhody:

Voľné metanefríny v plazme pochádzajú z kontinuálneho metabolizmu KCHA v nádore, na rozdiel od endogénnych KCHA, ktoré sa secernujú epizodicky.

Falošná pozitivita v dôsledku stimulácie sympatiko-adrenálneho systému farmakami alebo stresormi sa u voľných MN vyskytuje oveľa zriedkavejšie ako u ostatných KCHA.

Močové MN (celkové alebo frakcionované) predstavujú väčšinou konjugované metabolity produkované v orgánoch GIT (nie v samotnom nádore) a môžu byť zvýšené vplyvom príjmu potravy bohatej na biogénne amíny (Lenders *a kol.*, 2002; Unger *a kol.*, 2006).

Paraganglióm je označenie pre extraadrenálne lokalizovaný feochromocytóm. Len malá časť paragangliómov je hormonálne aktívnych, pričom väčšinou produkujú zmes noradrenalínu a adrenalínu. Niektoré nádory vylučujú len noradrenalín v dôsledku zníženej alebo chýbajúcej expresie enzýmu PNMT, ktorý konvertuje noradrenalín na adrenalín. Zriedkavo tumory produkujú výlučne dopamín v dôsledku deficitu enzýmu AADC premieňajúceho dopamín na noradrenalín. Pacienti s dopamín produkujúcimi paragangliómami majú často normálny krvný tlak alebo dokonca sklon k hypotenzii. Diagnostika týchto atypických paragangliómov je založená na stanovení dopamínu v plazme a moči alebo na špecifickejšom stanovení jeho O-metylovaného metabolitu - metoxytyramínu v plazme. Metoxytyramín poskytuje lepšiu informáciu o nádore ako močový dopamín, ktorý sa tvorí najmä v obličkách dekarboxyláciou v krvi cirkulujúceho DOPA (Eisenhofer *a kol.*, 2005).

Neuroblastóm je nádor vznikajúci z nezrelých buniek paravertebrálneho sympatického reťazca a predstavuje najčastejší extrakraniálny nádor u detí. V dôsledku zvýšenej expresie tyrozin-hydroxylázy produkujú neuroblastómy často zvýšené množstvá kyseliny homovanilovej (HVA), ktorá je konečným metabolitom dopamínu. Patologický

Tab. 7. Faktory ovplyvňujúce výber testu pri diagnostike feochromocytóme

| U-frakcionované metanefríny | P- voľné metanefríny |
|--|--|
| Metóda široko dostupná, v praxi overená | Novšia, menej dostupná metóda |
| Merané koncentrácie 200–2000 nmol/l | Koncentrácie 0,1–0,5 nmol/l – problematickejšie stanovenie |
| Zber moču: • nenáročný pre personál • nepohodlný pre pacienta • nevhodný pre deti (referenčné intervaly!) • problémy s neúplným zberom | Odber krvi: • vyžaduje čas a skúsený personál • relatívne menej zatažujúci pacienta • lepšia interpretácia výsledkov u detí • je možné lepšie štandardizovať a kontrolovať |
| Falošná pozitivita u pacientov s CKD | CKD neovplyvňuje výrazne koncentrácie MN |
| Stanovenie po dekonjugácii odráža viac konjugované ako voľné metabolity produkované v GIT | Stanovenie odráža voľné metabolity produkované nádorom |
| Ťažko kontrolovateľný vplyv spôsobu života na stimuláciu sympatiko-adrenálneho systému | Malý vplyv diéty a stresorov |

pomer VMA:HVA má diagnostický význam, preto sa v diagnostike využívajú najmä HPLC metódy, ktoré sú schopné rozlíšiť tieto zlúčeniny napriek ich štruktúrálnej podobnosti (Li *a kol.*, 2010).

Katecholamíny v patogeneze neurodegeneratívnych ochorení

Pomerne dobre je preskúmaná úloha KCHA u neurodegeneratívnych ochorení postihujúcich centrálnu a periférnu neuronálnu systémy, kde KCHA zohrávajú úlohu endogénneho neurotoxínu. Príkladom je Parkinsonova choroba, prejavujúca sa stratou dopamín produkujúcich neurónov v centrálnom nigrostriatálnom systéme. Za jednu z možných príčin neurotoxicity sa považuje neenzýmová autooxidácia KCHA na reaktívne chinóny, spojená s tvorbou cytotoxických voľných radikálov a tiež tvorba vysoko reaktívnych aldehydových metabolitov katalyzovaná MAO (Eisenhofer *a kol.*, 2004). Hoci DOPAL a DOPEGAL sú veľmi reaktívne metabolity, za normálnych okolností je ich toxicita minimalizovaná rýchlou konverziou na deaminované kyseliny účinkom aldehyddehydrogenázy alebo na aldózy účinkom aldehydreduktázy (Burke, 2004).

V posledných rokoch sa skúmala aj antioxidačná aktivita katecholamínov. Jodko *a kol.* (2010) vo svojej práci experimentálne potvrdili úlohu katecholamínov ako „scavengerov“ voľných radikálov, ale skutočný mechanizmus tohto pôsobenia stále nie je známy.

Katecholamíny v tumorigenéze ovariálnych nádorov

Všetky hlavné katecholamíny sú prítomné vo vaječníkoch cicavcov. Ako súčasť sympatikovej inervácie ovplyvňujú mnohé fyziologické funkcie, napr. steroidogézu, vývoj folikulov, ovuláciu a funkciu žltého telieska. Prisdudzuje sa im tiež účasť pri niektorých patologických stavoch, napr. pri vzniku syndrómu polycystických ovárií (Sverrisdottir a kol., 2008). Predpokladá sa, že okrem tejto úlohy sa môžu katecholamíny uplatňovať aj pri šírení nádorov. Novšie štúdie naznačujú, že katecholamíny môžu zvyšovať schopnosť invázie nádorových buniek, napr. ovplyvňovaním ich pohyblivosti a zvyšovaním expresie extracelulárnych metaloproteináz, ktoré napomáhajú šíreniu nádorových buniek (Lutgendorf a kol., 2003). Stimulácia nádorových buniek katecholamínmi môže zvyšovať expresiu vaskulárneho endotelového rastového faktora (VEGF, prodporný faktor angiogenézy), ktorý je mediátorom šírenia nádorov v krvnom riečisku (Sood a kol., 2006). Podobne bolo pozorované KCHA indukované zvýšenie IL-6 v sére pacientov s ovariálnym karcinómom. IL-6 napomáha proliferácii a migrácii nádorových buniek a je zodpovedný za rezistenciu na chemoterapiu (Nilsson a kol., 2007).

ZÁVER

Stanovenie katecholamínov v krvi a v moči je dôležitou neinvazívnou metódou na sledovanie aktivity sympatikoadrenálneho systému a je súčasťou diagnostického a monitorovacieho algoritmu najmä nádorov produkujúcich katecholamíny. Súčasná analytická možnosť umožňuje kvantitatívne a separované stanovenie jednotlivých KCHA a ich metabolitov v biologických tekutinách.

Adekvátna príprava pacienta je nevyhnutná pre vylúčenie hlavných predanalytických faktorov ovplyvňujúcich vyšetrenie, pričom stanovenie voľných metanefrínov v plazme sa zdá byť testom, ktorý je najmenej ovplyvňovaný diétnymi vplyvmi a najviac korešponduje s aktivitou feochromocytómu.

LITERATÚRA

1. Adcock, J. L., Barnett, N. W., Costin, J. W., Francis, P. S., Lewis, S. W.: *Determination of selected neurotransmitter metabolites using monolithic column chromatography coupled with chemiluminescence detection*. 2005, Talanta, 67 (3), 585–589.
2. Adler, J. T., Meyer-Rochow, G. Y.; Chen, H., Benn, D. E., Robinson, B. G., Soppel, R. S., Sidhu, S. B.: *Pheochromocytoma: Current approaches and future directions*. 2008, The Oncologist, 13, 779–793.
3. Bowser, M. T., Kennedy, R. T.: *In vivo monitoring of amine neurotransmitters using microdialysis with on-line capillary electrophoresis*. 2001, Electrophoresis, 22 (17), 3668–3676.

4. Burke, W. J., Li, S. W., Chung, H. D., Ruggiero, D. A., Kristal, B. S., Johnson, E. M., Lampe, P., Kumar, V. B., Franko, M., Williams, E. A., Zahm, D. S.: *Neurotoxicity of MAO Metabolites of Catecholamine Neurotransmitters: Role in Neurodegenerative Disease*. 2004, Neurotoxicology, 25 (1), 101–115.
5. Burtis, C. A., Ashwood, E. R.: *Fundamentals of clinical chemistry*. 2001, 5th Edition, W. B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, ISBN 0-7216-8634-6.
6. De Jong, W. H., Eisenhofer, G., Post, W. J., Muskiet, F. A., de Vries, E. G., Kema, I. P.: *Dietary influences on plasma and urinary metanephrines: implications for diagnosis of catecholamine-producing tumors*. 2009, J. Clin. Endocrinol. Metab., 94 (8), 2841–9.
7. Drukarch, B., van Muiswinkel, F. L.: *Drug treatment of Parkinson's disease*. Time for phase II, 2000, Biochem. Pharmacol., 59 (9), 1023–31
8. Eisenhofer, G., Kopin, I. J., Goldstein, D. S.: *Biochemical diagnosis of pheochromocytoma: how to distinguish true from false positive test results*. 2003, J. Clin. Endocrinol. Metab., 88, 2656–2666.
9. Eisenhofer, G., Kopin, I. J., Goldstein, D. S.: *Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine*. Pharmacol. Rev., 2004, 56 (3), 331–349.
10. Eisenhofer, G., Huysman F., Pacak, K., MacClellan, M. W., Sweep, F. C. G. J., Lenders, J. W. M.: *Plasma metanephrines in renal failure*. 2005, Kidney International, 67, 668–677.
11. Eisenhofer, G., Walther, M., Keiser, H. R., Lenders, J. W. M., Friberg, P., Pacak, K.: *Plasma metanephrines: a novel and cost-effective test for pheochromocytoma*. 2000, Braz. J. Med. Biol. Res., 33, 1157–1169.
12. Fähnrich, K. A., Pravda, M., Guibault, G. G.: *Recent applications of electrogenerated chemiluminescence in chemical analysis*. 2001, Talanta, 54 (4), 531–559.
13. Galetta, F., Franzoni, F., Bernini, G., Poupak, F., Carpi, A., Cini, G., Tocchini, L., Antonelli, A., Santor, G.: *Cardiovascular complications in patients with pheochromocytoma*. 2010, Biomedicine & Pharmacotherapy, 64, 505–509.
14. Goldstein, D. S., Holmes, C.: *Neuronal source of plasma dopamine*. 2008, Clin. Chem., 54 (11), 1864–71.
15. Grossman, A., Pacak, K., Sawka, A., Lenders, J. W., Harlander, D., Peaston, R. T., Reznick, R., Sisson, J., Eisenhofer, G.: *Biochemical diagnosis and localization of pheochromocytoma: can we reach a consensus?* 2006, Ann. N. Y. Acad. Sci., 1073, 332–347.
16. Grouzmann, E., Drouard-Troalen, L., Baudin, E., Ploquin, E. F., Muller, B.: *Diagnostic accuracy free and total metanephrines in plasma and fractionated metanephrines in urine of patients with pheochromocytoma*. 2010, Eur. J. Endocrinol., 162, 951–960.
17. Hirano, Y., Tsunoda, M., Funatsu, T., Imai, K.: *Rapid assay for catechol-O-methyltransferase activity by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection*. 2005, J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci., 819 (1), 41–46.

18. Hows, M.E.P., Lacroix, L., Heidbreder, Ch., Organ, A. J., Shah, A. J.: *High-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric assay for the simultaneous measurement of dopamine, norepinephrine, 5-hydroxytryptamine and cocaine in biological samples*. 2004, Journal of Neuroscience Methods, 138 (1-2), 123-132.
19. Huang, J., Li, T.: *Highly efficient chromatographic resolution of alpha, alpha'-dihydroxybiaryls*. 2005, Org. Lett., 7 (26), 5821-3.
20. Ji, C.J., Li, W.L., Ren, X.D., El-Kattan, A.F., Kozak, R., Fountain, S., Lepsy, C.: *Diethylation labeling combined with UPLC/MS/MS for simultaneous determination of a panel of monoamine neurotransmitters in rat prefrontal cortex microdialysates*. 2008, Analytical Chemistry, 80, 9195.
21. Jodko, K., Litwinienko, G.: *Oxidative stress in the neurodegenerative diseases-potential antioxidant activity of catecholamines*. 2010, Postepy. Biochem., 56 (3), 248-59.
22. Jung, M. C., Shi, G. Y., Borland, L., Michael, A. C., Weber, S. G.: *Simultaneous determination of biogenic monoamines in rat brain dialysates using capillary high-performance liquid chromatography with photoluminescence following electron transfer*. 2006, Anal. Chem., 78, 1755.
23. Kühlenbeck, D.L., O'Neil, T.P., Mack, C.E., Hoke, S.H., Wehmeyer, K.R.: 2000, J. Chromatogr. B., 738, 319.
24. Lenders, J. W., Pacak, K., Eisenhofer, G.: *New advances in the biochemical diagnosis of pheochromocytoma: moving beyond catecholamines*. 2002, Ann. N. Y. Acad. Sci., 970, 29-40.
25. Lin, C.E., Cheng, H.T., Fang, I.J., Liu, Y.C., Kuo, C.M., Lin, W.Y., Lin, C.H.: 2006, Electrophoresis, 27, 3443.
26. Li, Q., Batchelor-McAuley, C., Compton, R. G.: *Electrooxidative decarboxylation of vanilmandelic acid: voltammetric differentiation between the structurally related compounds homovanilic acid and vanilmandelic acid*. 2010, J. Phys. Chem. B., 114 (29), 9713-9719.
27. Linert, W., Jameson, G.N.: *Redox reactions of neurotransmitters possibly involved in the progression of Parkinson's Disease*. 2000, J. Inorg. Biochem., 79 (1-4), 319-326.
28. Lutgendorf, S. K.: *Individual differences and immune function: Implications for cancer*. 2003, Brain Behavior and Immunity, 17 (1), 106-108.
29. Makaiová, I., Tomeková, J., Kováčová, S., Veselý, J., Kaušitz, J.: *Možnosti metód nukleárnej medicíny v diagnostike neuroendokrinných nádorov*. 2011, Onkológia 6(4), 200-204.
30. Manger, W.M.: *An overview of pheochromocytoma: history, current concepts, vagaries, and diagnostic challenges*. 2006, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1073, 1-20.
31. Mašlanková, J., Stupák, M., Mihálik, J., Mareková, M.: *Katecholamíny - fyziológia a patológia*. Ateroskleróza, 2011, XV (1-2), 117-126.
32. Moraes, F. C., Golinelli, D.L.C., Mascaro, L.H., Machado, S.A.S.: *Determination of epinephrine in urine using multi-walled carbon nanotube modified with cobalt phthalocyanine in a paraffin composite electrode*. 2010, Sensors and Actuators B: Chemical, 148 (2), 492-497.
34. McMorris, T., Collard, K., Corbett, J., Dicks, M., Swain, J.P.: *A test of the catecholamines hypothesis for an acute exercise-cognition interaction*. Pharmacol. Biochem. Behav., 2008, 89 (1), 106-115.
35. Nalewajko, E., Wiszowata, A., Kojlo, A.: *Determination of catecholamines by flow injection analysis and high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection*. 2007, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 43 (5), 1673-1681.
36. Nilsson, M. B., Armaiz-Pena, G., Takahashi, R., Lin, Y. G., Trevino, J., Jennings, N., Arevalo, J., Lutgendorf, S. K., Gallick, G. E., Sanguino, A.M., Lopez-Berestein, G., Cole, S. W., Sood, A.K.: *Stress hormones regulate interleukin-6 expression by human ovarian carcinoma cells through a Src-dependent mechanism*. 2007, J. Biol. Chem., 282 (41), 29919-29926.
37. Oeltmann, T., carson, R., Shannon, J.R., Ketch, T., Robertson, D.: *Assesment of O-methylated catecholamine levels in plasma and urine for diagnosis of automatic disorders*. 2004, Automatic Neuroscience, 116, (1-2), 1-10.
38. Pacak, K., Eisenhofer, G., Ahlman, H., Bornstein, S.R., Gimenez-Roqueplo, A.P., Grossman, A.B., Kimura, N., Mannelli, M., Mc Nicol, A.M., Tischler, A.S.: *Pheochromocytoma: recommendations for clinical practice from the First International Symposium*. 2005, dostupné on-line: www.nature.com/clinicalpractice, doi:10.1038/ncpendmet0396
39. Procopiou, M., Finney, H., Akker, S.A., Chew, S.L., Drake, W.M., Burrin, J., Grossman, A.B.: *Evaluation of an enzyme immunoassay for plasma-free metanephrines in the diagnosis of catecholamine-secreting tumors*. 2009, European Journal of Endocrinology, 161, 131-140.
40. Qiao, T., Wu, Y., Jin, J., Gao, W., Xie, Q., Wang, S., Zhang, Y., Deng, H.: *Conjugation of catecholamines on magnetic nanoparticles coated with sulfonated chitosan*. 2011, Colloids and surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects, 380, 169-174.
41. Sawka, A. M., Jaeschke, R., Singh, R. J., Young, W. F.: *A comparison of biochemical tests for pheochromocytoma: measurement of fractionated plasma metanephrines compared with the combination of 24-hour urinary metanephrines and catecholamines*. 2003, J. Clin. Endocrinol. Metab., 88 (2), 553-558.
42. Scheer, F.A.J.L., Hu, K., Evoniuk, H., Kelly, E.E., Malhotra, A., Hilton, M.F., Shea, A.S.: *Impact of the human circadian system, exercise, and their interaction on cardiovascular function*. Proc. Natl. Acad. Sci USA., 2010, 107 (47), 20541-20546.
43. Sood, A. K., Thaker, P.H., Jennings, N., Kamat, A.A., Han, L.Y., Pena, G.A., Lopez-Berestein, G., Lutgendorf, S.K., Cole, S.W.: *Tumor cell β adrenergic receptor dependence for chronic stress effects on ovarian cancer growth*, 2006, Brain Behavior and Immunity, 20 (3), 66-67.
44. Stejskal D., Lačňák B, Václavík J., Zuber R.: *Volné plazmatické metanepfríny a jejich využití v diagnostice fe-*

- ochromocytomu*. 2005, *Klin. Biochem. Metab.*, 13 (34), 4, 201–206.
45. Strenger, V., Kerbl, R., Dornbush, H. J., Ladenstein, R., Ambros, P. F., Ambros, I. M., Urban, C.: *Diagnostic and prognostic impact of urinary catecholamines in neuroblastoma patients*. 2007, *Pediatr. Blood Cancer*, 48 (5), 504–509.
46. Sverrisdottir Y. B., Mogren, T., Kataoka, J., Janson, P. O., Stener-Victorin, E.: *Is polycystic ovary syndrome associated with high sympathetic nerve activity and size at birth?* 2008, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 294, E576–E581.
47. Talwar, D., Williamson, C., McLaughlin, A., Gill, A., ÓReilly, D. St. J.: *Extraction and separation of urinary catecholamines as their diphenyl boronate complexes using C18 solid phase extraction sorbent and high-performance liquid chromatography*. 2002, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 769 (2), 341–349.
48. Tsunoda, M.: *Recent advances in methods for the analysis of catecholamines and their metabolites*. 2006, *Anal. Bioanal. Chem.*, 386, 506.
49. Törnkvist, A., Sjöberg, P. J. R., Markides, K. E., Berquist, J.: *Analysis of catecholamines and related substances using porous graphitic carbon as separation media in liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. 2004, *Article Journal of Chromatography B.*, 2004, 801 (2), 323–329.
50. Unger, N., Pitt, Ch., Schmitd, I. L., Walz, M. K., Schmidt, K. W., Philipp, T., Mann, K., Petersenn, S.: *Diagnostic value of various biochemical parameters for diagnosis of pheochromocytoma in patients with adrenal mass*. 2006, *Eur. J. Endocrinol.*, 154, 409–417.
51. Uutela, P., Karhu, L., Piepponen, P., Kaenmaki, M., Ke-tola, R. A., Kostianen, R.: *Discovery of dopamine glucuronide in rat and mouse brain microdialysis samples using liquid chromatography tandem mass spectrometry*. 2009, *Analytical Chemistry*, 81, 427.
52. Vicente-Torres, M. A., Loyzaga, P. G., Carricondo, F., Bartolomé, M. V.: *Simultaneous HPLC quantification of monoamines and metabolites in the blood-free rat cochlea*. 2002, *Journal of Neuroscience Methods*, 119 (1), 31–36.
53. Yoshitake, M., Nohta, H., Ogata, S., Todoroki, K., Yoshida, H., Yoshitake, T., Yamaguchi, M.: *Liquid chromatography method for detecting native fluorescent bioamines in urine using post-column derivatization and intramolecular FRET detection*, 2007, *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 858(1–2), 307–312.
54. Yu, P. H., Cauglin, C., Wempe, K. L., Gubisne-Haberle, D.: *A novel sensitive high-performance liquid chromatography/electrochemical procedure for measuring formaldehyde produced from oxidative deamination of methylamine and in biological samples*. 2003, *Anal. Biochem.*, 318 (2), 285–290.
55. Zhao, X. E., Suo, Y. R.: *Simultaneous determination of monoamine and amino acid neurotransmitters in rat end-brain tissues by pre-column derivatization with high-performance liquid chromatographic fluorescence detection and mass spectrometric identification*. 2008, *Talanta*, 76, 690.
56. Weng, Q. F., Xu, G. W., Yuan, K. L., Tang, P.: *Determination of monoamines in urine by capillary electrophoresis with field-amplified sample stacking and amperometric detection*. 2006, *J. Chromatogr. B.*, 835, 55.
57. Wood, A. T., Hall, M. R.: *Reversed-phase high-performance liquid chromatography of catecholamines and indoleamines using a simple gradient solvent system and native fluorescence detection*. 2000, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, 744 (1), 221–225.
58. Wuorinen, E., Burant, C., Borer, K. T.: *No effect of catecholamines on appetite as a result of varied exercise intensity*. 2010, *Appetite*, 51, 350–412.

KRYOGLOBULINÉMIE – VYUŽÍVAME SPRÁVNE SÚČASNÉ MOŽNOSTI LABORA- TÓRNEJ DIAGNOSTIKY?

Eva Ďurovcová^{1,3}, Ján Lazúr^{1,2}

¹Laboratórna diagnostika LABMED, a. s. Košice

²Hematologická ambulancia IV. internej kliniky UNLP Košice

³Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie
LF UPJŠ Košice

SÚHRN

Kryoglobulíny sú imunoglobulínové komplexy, ktoré *in vivo* aj *in vitro* reverzibilne precipitujú pri teplote nižšej ako 37 °C. Kryoglobulinemický syndrom charakterizuje prítomnosť sérového kryoglobulínu a rozmanitých klinických manifestácií. Väčšina kryoglobulínov je tvorená zmiešanými protilátkovo-antigénovými imunokomplexmi, ktoré sa často vyskytujú pri autoimúnnnych a infekčných ochoreniach.

Frekvencia požiadaviek na vyšetrenie a typizáciu kryoglobulínov významne stúpla najmä v súvislosti s výskytom zmiešanej kryoglobulinémie typu II pri chronickej hepatitíde C. Diagnóza kryoglobulinémie vyžaduje diferenciálno-diagnostickú rozhladenosť klinika, dodržanie špecifických teplotných podmienok pri odbere, transporte aj analýze vzoriek, ako aj spracovanie a hodnotenie skúseným laboratórnym personálom. V práci predkladáme súhrn predanalytických a analytických podmienok, ktorých by mohli prispieť k optimalizácii a štandardizácii vyšetrenia.

Kľúčové slová: kryoglobulíny, kryoglobulinemický syndróm, predanalytické podmienky, analýza kryoglobulínov

SUMMARY

Cryoglobulins are immunoglobulin complexes which reversible precipitate at the temperature lower than 37 °C *in vivo* and *in vitro*. Cryoglobulinemic syndrome is characterized by the presence of the serum cryoglobulin and different clinical manifestations as well. The majority of cryoglobulins are mixed antigen-antibody immune complexes that occur with high incidence in autoimmune and infectious disorders.

The prescription frequency of cryoglobulins determination and characterisation has increased significantly mainly in connection with incidence of the mixed cryoglobulinemia type II in the chronic viral hepatitis C. The diagnosis of cryoglobulinemia needs high level of clinical suspicion, using standard procedures to ensure specific thermal conditions during sampling, transport, serum separation and analysis of samples, which are finally evaluated by experienced laboratory personnel.

We present summary of the different pre-analytical and analytical points to be considered in order to optimize and to standardize the steps necessary to the realization of this analysis.

Key words: cryoglobulins, cryoglobulinemic syndrome, preanalytical conditions, analysis of cryoglobulins

ÚVOD

Vznik precipitátu („extraordinary hyperproteinemia“) v chladenom sére pacientky s plazmocelulárnym myelómom prvýkrát pozorovali v roku 1933 Wintrobe a Buell. O 30 rokov neskôr popísali Meltzer a Franklin charakteristický klinický syndróm združený s kryoglobulinémiou, ktorý zahŕňal purpuru, artralgiu a slabosť (1). V roku 1974 navrhol Brouet klasifikáciu kryoglobulínov na základe proteínového zloženia kryoprecipitátu, ktorá sa v rôznych modifikáciách používa doteraz (2). Posledné dve desaťročia priniesli explóziu nových poznatkov o patomechanizmoch vzniku kryoglobulinemického syndrómu. Boli identifikované takmer všetky ochorenia sprevádzané výskytom kryoglobulinémie.

Stredobodom záujmu sa stali najmä zmiešané kryoglobulinémie, a to pre kauzálnu súvislosť s chronickou vírusovou hepatitídou C (VHC), u ktorej predstavujú jednu z hlavných extrahepatálnych manifestácií ochorenia. Vďaka pretrvávajúcej klonálnej expanzii B-lymfocytov je zmiešaná kryoglobulinémia v súčasnosti považovaná za lymfoproliferatívne ochorenie, ktoré u časti pacientov môže prejsť do maligných B-lymfocytových ochorení (3).

Zvýšený záujem o vyšetrenie kryoglobulínov predstavuje pre laboratórných pracovníkov výzvu, ktorá sa začína prejavovať úsilím o štandardizáciu vyšetrenia (4-5).

Definícia kryoglobulínov

Kryoglobulíny sú multimolekulové komplexy zložené z jedného alebo viacerých tried imunoglobulínov, ktoré *in vivo* aj *in vitro* reverzibilne precipitujú pri teplote nižšej ako 37 °C a pri zohriatí séra sa opäť rozpúšťajú. Súčasťou komplexov môžu byť aj iné proteíny, najčastejšie zložky komplementu alebo vírusové, či bakteriálne antigény. Okrem imunoglobulínov bola precipitácia pri zníženej teplote pozorovaná aj u iných plazmatických bielkovín, napr. fibrinogénu, fibronektínu alebo albumínu [6]. Kryoglobulíny sprevádzajú najmä lymfoidné neoplázie a chronické zápalové ochorenia buď autoimunitného alebo infekčného pôvodu. U jednotlivých pacientov majú kryoglobulíny individuálnu teplotnú krivku so špecifickou kinetikou precipitácie. Medzi teplotou precipitácie a klinickými prejavmi existuje niekedy korelácia, pričom vyššia teplota je spojená s intenzívnejšími kožnými prejavmi po expozícii chladu (7-8).

Rozdelenie kryoglobulinémii

Na základe klonálneho pôvodu imunoglobulínov v kryoprecipitáte a klinických syndrómov sa kryoglo-

Tab. 1. Delenie kryoglobulinémii a ochorenia spojené s ich výskytom

| Typ | Výskyt % | Klonálne zloženie Ig v kryoprecipitáte | Ochorenia |
|-----|----------|--|---|
| I | 10-15 | jediný monoklonový Ig (IgM, IgG, IgA, FLC) | <i>Lymfoproliferatívne ochorenia:</i> myelóm, WM |
| IIa | 50-60 | monoklonové Ig (IgM, IgG, IgA) + polyklonové I IgG | <i>Vírusové - HCV!!!</i> <i>autoimúnne - Sjögren's sy, RA</i> <i>lymfoproliferatívne - CLL, NHL</i> |
| IIb | | oligoklonové Ig (IgM, IgG, IgA) + polyklonové IgG | |
| III | 30-40 | polyklonové IgM + polyklonové IgG | <i>autoimúnne - SLE, biliárna cirhóza, RA, m. Crohn</i> <i>vírusové - HBV, CMV, HIV, EBV</i> <i>iné - bakteriálne, mykotické a parazitárne infekcie</i> |

WM - Waldenströmova makroglobulinémia, RA - reumatoidná artritída, CLL - chronická lymfocytová leukémia, NHL - nonHodgkinov lymphóm, HCV - vírus hepatitídy C, HBV - vírus hepatitídy B, CMV - cytomegalovírus, HIV - vírus ľudskej imunodeficiencie, EBV - Epstein-Barrovej vírus, FLC - voľné ľahké reťazce

bulinémie rozdeľujú na **jednoduché monoklonové** (typ I) a **zmiešané** (typy II a III) - Tab 1 (2), (9).

Typ I tvorí 10-15 % všetkých kryoglobulinémii a vyskytuje sa pri lymfoidných neopláziách produkujúcich monoklonové imunoglobulíny, t.j. Waldenströmovej makroglobulinémii a plazmocelulárnom myelóme (10). Kryoprecipitát je zložený z jediného monoklonového Ig. Najčastejším typom je IgM a IgG, IgA či ľahké reťazce sú popisované raritne (11) Tento typ kryoglobulínov pri vyšetrení obvykle precipituje do 24 hodín a jeho koncentrácia môže presiahnuť 5 g/l.

Typy II a III sú tvorené imunokomplexami zloženými z viacerých tried imunoglobulínov. Zmiešanú kryoglobulinémiu II typu charakterizuje výskyt monoklonového imunoglobulínu, najčastejšie IgM typu kappa, ktorý reaguje s Fc aj F(ab') fragmentami polyklonových IgG (11). Zmiešaná kryoglobulinémia typu III má obe imunoglobulinové súčasti kryoprecipitátu (najčastejšie IgM aj IgG) v polyklonovej forme. Detekovateľný precipitát sa vytvára pomalšie, niekedy až po 5-7 dňoch. Použitie citlivejších analytických metód (imunoblotting, dvojrozmerná elektroforéza na polyakrylamidovom géli) umožnilo identifikáciu aj ďalšieho sérologického subtypu zmiešanej kryoglobulinémie s výskytom oligoklonových IgM, ktorý je pravdepodobne medzistupňom pri prechode typu III do typu II. Táto zmena je pozorovaná najmä v priebehu aktívnych VHC (12-13).

Oba typy zmiešanej KGL sa vyskytujú pri autoimunitných ochoreniach a chronických infekčných najmä vírusových ochoreniach. Až v 80-90 % je príčinou zmiešanej KGL chronická VHC, pričom táto spojitosť sa intenzívne skúmala od roku 1990, kedy bol izolovaný vírus hepatitídy C (14-16). Prevalencia zmiešanej kryoglobulinémie u pacientov s VHC varíruje v rôznych geografických oblastiach, vysoká je najmä v oblasti

Stredozemného mora (10), (17). Medzi menej časté vyvolávajúce infekčné faktory patria vírus hepatitídy B, HIV, cytomegalovírus, arbovírusy vyvolávajúce tropickú horúčku Chikungunya (18-20).

Kryoglobulinémie bez identifikovateľnej sprevádzajúcej choroby sa nazývajú. esenciálne zmiešané kryoglobulinémie. Po objavení kauzálnej súvislosti s chronickou VHC sa táto skupina výrazne zúžila (7).

Klinické prejavy

Klinické manifestácie kryoglobulinemického syndrómu sú prítomné len u 5-20 % pacientov s laboratórne dokázanou kryoglobulinémiou (10), (21). Bývajú variabilné, často nešpecifické a bez klinického podozrenia sa môžu ľahko prehliadnuť.

Prejavy kryoglobulinémie typu I sú zvyčajne lokálne, vyplývajú z **hyperviskozity séra a následnej reologickej poruchy**. Najčastejšie sa objavujú na miestach vystavených chladu v podobe akrocyanózy, Raynaudovho syndrómu, chladovej urtiky a gangrény prstov.

Prejavy zmiešanej kryoglobulinémie typu II aj III sú viac systémové. Vznikajú ako následok špecifickej **imunokomplexovej vaskulitídy** postihujúcej najmä malé a stredne veľké cievy v rôznych tkanivách, s predilekčným postihnutím kože. Typickým histologickým nálezom kryoglobulinemickej vaskulitídy sú depozity imunokomplexov (IgM+IgG) spolu so zložkami komplementu a lyzovanými neutrofilmi v stene kapilár aj v ich okolí, ktoré môže sprevádzať zápalový lymfocytárny infiltrát (10).

Najčastejšie klinické manifestácie zmiešanej kryoglobulinémie zahŕňajú najmä kožu, periférne nervy, kĺby a obličky (2), (10), (15-16), (22-23) - **tab 2**. Klinický priebeh kryoglobulinemického syndrómu je veľmi variabilný, so spontánnymi exarebáciami a re-

misiami. Pacient môže mať len niektorý alebo všetky prejavy ochorenia súčasne alebo postupne v priebehu ochorenia (16). Koncentrácia kryoglobulínu nekoreluje s klinickými prejavmi pravdepodobne pre veľkú heterogenitu v chemickom zložení, termických vlastnostiach a schopnosti kryoglobulínu aktivovať komplement (24).

Tab. 2. Frekvencia klinických prejavov u kryoglobulinémie

| Prejav (výskyt v %) | Typ kryoglobulinémie | |
|----------------------|----------------------|---------|
| | všetky | miešaná |
| Purpura | 55-67 | 34-90 |
| Raynaud's syndróm | 25-50 | 24-37 |
| Periférna neuropatia | 15-55 | 20-89 |
| Edémy | 24 | neudané |
| Bolesti kĺbov | 35-50 | 20-73 |
| Kožné ulcerácie | 5-40 | 30-40 |
| Nefropatia | 25 | 15-35 |
| Hepatopatia | 60 | 70-90 |
| Sjögren's/sicca sy | 7-35 | 15-40 |
| slabosť | neudané | 70-90 |

Laboratórna diagnostika

Napriek technologickému pokroku v laboratórnej medicíne vyšetrenie kryoglobulínov nezaznamenalo výraznejšie zmeny. Analýza je náročná na čas a objem séra, laboratórny personál pri malej frekvencii vyšetrení nemá dodatočné skúsenosti s interpretáciou výsledkov. Kryoglobulíny sa v sére vyskytujú väčšinou v nízkych koncentráciách (100–300 mg/l) a ich izolácia bez kontaminácie ostatnými sérovými bielkovinami je často problematická. Keďže neexistuje žiaden medzinárodne akceptovaný štandardný postup týkajúci sa odberu vzorky ani samotnej analýzy, používajú sa rôzne analytické prístupy – od kvalitatívneho hodnotenia či semikvantitatívneho vyjadrenia pomocou kryokritu, cez typizáciu zloženia kryoprecipitátu najčastejšie pomocou imunofixácie až po kvantifikáciu bielkovinových zložiek v precipitáte (5), (25–27).

Indikáciou pre vyšetrenie by mali byť najmä nasledujúce klinické situácie:

1. Lymfoproliferatívne ochorenia s precitlivosťou na chlad alebo s prejavmi hyperviskozity
2. Ortostatická kožná purpura
3. Chladová urtika
4. Ulcerácie a nekrózy končatín

5. Ťažký Raynaudov syndróm
6. Periférna neuropatia
7. Diferenciálna diagnóza biopticky zistenej MPGN
8. Monitorovanie efektu liečby – kvantifikácia môže pomôcť pri terapeutických rozhodnutiach

Odber biologického materiálu:

Analýza kryoglobulínov sa tradične vykonáva v sére, avšak na vylúčenie kryofibrinogenémie je možné vyšetriť aj plazmu. Venózna krv sa odoberá nalačno do predhriatych skúmaviek (37–39 °C) bez antikoagulancií a separačných gélov. Spravidla je potrebný väčší objem krvi (10–20 ml), nedostatočný objem vzorky môže podhodnotiť výsledok pri nízkych koncentráciách kryoglobulínu (8). Teplotný režim pri odbere, transporte, zrážaní krvi aj pri separácii séra centrifugáciou je kľúčovým faktorom ovplyvňujúcim správnosť analýzy. Nedodržanie teploty môže byť príčinou negatívneho výsledku najmä u kryoglobulínov, ktoré sa vyskytujú v nižších koncentráciách a majú sklon ku kryoprecipitácii pri teplote blízkej 37 °C [28]. Ak nie je možné zabezpečiť teplotné podmienky pri odbere a transporte, vhodnou alternatívou je odber priamo v laboratóriu.

Tvorba krvného koagula prebieha 2 hodiny pri 37 °C v termostate. Nasleduje centrifugácia pri 37 °C, 3 500 otáčkach/min počas 10 minút. Ak laboratórium nedisponuje vyhrievanou centrifúgou, možno nechať sedimentovať krvné koagulum pri 37 °C a sérum oddeliť bez centrifugácie. Lipemické sérum sfažuje vizuálne hodnotenie kryoprecipitácie.

U pacientov s antikoagulačnou liečbou a pacientov heparinizovaných sfažuje interpretáciu precipitácia, ktorá vzniká aj ako následok tvorby komplexov medzi medzi fibrínom a fibrinogénom alebo heparínom a fibronektínom (8). Na urýchlenie koagulácie je možné pridať do odberovej skúmavky trombín alebo protamínsulfát (inhibícia účinku heparínu).

Kryoprecipitácia

Kritické faktory chladovej inkubácie sú teplota, trvanie a východiskový objem séra. Inkubácia prebieha pri 2–4 °C minimálne 3 dni, pričom doba potrebná na vytvorenie kryoprecipitátu varíruje od niekoľkých hodín (pri type I) až po niekoľko dní (typ II a III). Na zachytenie zmiešaných KGL sa odporúča 7–10 dňová inkubácia (4). Koncentrácie kryoglobulínu varírujú v extrémnych prípadoch od desiatok mg po desiatky gramov na liter, preto aj objem séra potrebný na úplnú typizáciu môže byť rôzny, spravidla však postačuje 4–5 ml séra. V rámci štandardizácie analýzy a porovnateľnosti výsledkov pri opakovaných vyšetreniach je vhodné, aby laboratórium používalo rovnaký východiskový objem séra. Z praktického hľadiska je vhodné použiť 2 alikvoty inkubované v chlade, z ktorých jeden hlavný alikvot (4–5 ml) sa použije na kvantifikáciu a typizáciu kryoprecipitátu a v druhom sa vykoná test rozpustnosti pri 37 °C. Tretí alikvot séra uchovávaný pri 37 °C slúži ako porovnávací a na doplnkové analýzy v sére (spravidla stačí 1 ml).

Identifikácia kryoprecipitátu je vizuálna, pričom sa denne porovnáva vzhľad séra s porovnávacím alikvotom. Kryoprecipitácia sa líši od vzorky k vzorke v závislosti na type, koncentrácii a teplotných vlastnostiach kryoglobulínu. Vo väčšine prípadov má kryoglobulín vzhľad precipitátu, ojedinele kryštálov či vločiek na dne skúmavky. Niekedy sa prítomnosť kryoglobulínu prejaví len zvýšeným zákalom/turbiditou séra alebo vznikom gélu, ktorý je veľmi ťažko izolovať od séra. Pridanie destilovanej vody k séru v pomere 1:1 pred chladovou inkubáciou môže uľahčiť tvorbu precipitátu a jeho ďalšiu typizáciu (29).

Semikvantívne hodnotenie kryoglobulínu pomocou kryokritu sa vykonáva po centrifugácii hematokritovej trubičky, pričom centrifugácia by mala byť tiež štandardizovaná (15 min pri 3 500 otáčok/min a 4 °C). Keďže kryokritom sa vyjadruje nepurifikovaný precipitát, jeho hodnota nemusí odrážať aktivitu ochorenia (8). Vysoké hodnoty kryokritu sú časté u pacientov s plazmocelulárnym myelómom alebo Waldenströmovou makroglobulinémiou.

Premývanie kryoprecipitátu je krokom, ktorý výrazne ovplyvňuje výsledok analýzy. Odporúča sa opakované (najmenej 3×) šetrné premývanie ľadovým fyziologickým roztokom alebo fosfátovým pufrom (do 4 °C), s krátkou centrifugáciou pri 4 °C po každom premytí. Opakované premývanie vzorky odstráni z precipitátu nešpecificky viazané bielkoviny, avšak na druhej strane každé premytie precipitátu vedie k jeho stratám (7). Nedokonalé premytie a kontaminácia precipitátu sérovými bielkovinami sa prejaví na ELFO frakciou albumínu. Premytý kryoprecipitát sa nakoniec rozpustí pri 37 °C v definovanom objeme fyziologického roztoku - Tab 3.

Tab. 3. Rozpúšťanie kryoprecipitátu v závislosti od jeho množstva

| Kvantita kryoprecipitátu (kryokrit) | Objem NaCl [μl] |
|-------------------------------------|-----------------|
| minimálna (<2%) | 200 |
| mierna (2-5%) | 300 |
| významná (5-10%) | 500 |
| extrémna (> 10%) | 1000 |

Kvantifikácia kryoglobulínu

V minulosti navrhované skriningové imunoturbidimetrické alebo nefelometrické metódy na sledovanie tvorby kryoglobulínu sa v praxi neujali. Obmedzený význam majú najmä pri podozrení na kryoglobulinémiu typu III, pri ktorých je kvantita precipitátu často pod hranicou vizuálneho rozlíšenia (8). Pre kvantifikáciu celkových bielkovín v kryoprecipitáte sú vhodné metódy určené na stanovenia v moči alebo likvori. Z analytického hľadiska je významná skutočnosť, že metóda by mala byť kalibrovaná pomocou ľudského IgG, pretože štandardná kalibrácia týchto metód pomocou hovädzieho albumínu významne podhodnocuje koncentráciu imunoglobulínov v kryoprecipitáte (4). Súčasné nefelometrické metódy dovoľujú kvantifikovať jednotlivé imunoglobulíny. Prepočet koncentrácií na g/l alebo mg/l by mal zohľadniť objem séra použitý na získanie precipitátu a objem rozpusteného precipitátu. Interpretácia musí zohľadniť nadhodnotenie výsledku v dôsledku prítomnosti iných bielkovín v precipitáte (napr. albumín, zložky komplementu C1q, C3, C4, fibronektín a ďalšie), ktoré najmä u kryoglobulinémie typu III môžu tvoriť až jednu tretinu koncentrácie.

Hoci viaceré štúdie potvrdili prítomnosť detegovateľného kryoprecipitátu aj u zdravých, nie sú doposiaľ určené referenčné hodnoty pre kvantitu kryoglobulínu (8), (24), (26). *Cut off* hodnota sa v závislosti od použitej metódy pohybuje od 2 mg/l po 20 mg/l (4), (30).

Imunotypizácia kryoglobulínov

Imunofixácia je vsúčasnosti metódou voľby. Umožňuje určiť klonalitu a typ imunoglobulínov tvoriacich kryoprecipitát. Senzitivita imunofixácie je približne 100 mg/l, čo je minimálna koncentrácia imunoglobulínov v rozpustenom kryoprecipitáte potrebná pre jeho úspešnú typizáciu. Pred analýzou potrebné biologický materiál vytemperovať na 37 °C, môže sa pridať depolymerizačne pôsobiaci β-merkaptóetanol. Určenie typu kryoglobulinémie je založené na dôkaze prítomnosti monoklonových, alebo polyklonových imunoglobulínov. Znamky oligoklonality pri kryoglobulinémii typu IIb sa darí pozorovať len pri vyšších koncentráciách.

Kapilárna zónová elektroforéza, ak ňou pracoviisko disponuje, poskytuje výhodu vyššej senzitivity a možnosti vyšetrenia veľkého počtu vzoriek.

Klasifikácia KGL môže vyžadovať doplnujúce vyšetrenia v sére:

1. Elektroforéza bielkovín s imunofixáciou na dôkaz a typizáciu monoklonového gradientu v sére, ktorý je konzistentný s kryoglobulinémiou typu I alebo II
2. Imunofixácia v sére často nedokáže monoklonový proteín pre jeho nízku koncentráciu, kým v kryoprecipitáte áno (efekt koncentrovania proteínov)
3. Kvantitatívne stanovenie imunoglobulínov
4. Voľné ľahké reťazce v sére na diferenciáciu monoklonovej gamapatie
5. Reumatoidný faktor - zvýšené hodnoty sa vyskytujú pri kryoglobulinémii typu II a III
6. C3, C4 zložky komplementu - pre KGL typu II sú typické nízke hladiny C4 a znížené alebo normálne C3
7. Základný panel autoprotílátok na vylúčenie reumatologických ochorení (ANA, ANCA, ASCA)
8. Vyšetrenia na hepatitídu C (kvalita alebo kvantita vírusovej RNA metódou PCR) - tvorí 80-90 % príčin zmiešanej kryoglobulinémie

ZÁVER

Dôkaz a typizácia kryoglobulinémie je časovo aj personálne náročné vyšetrenie, ktoré v súčasnosti realizujú len niektoré klinické laboratória spolupracujúce s najmä s hematologickými, onkologickými, reumatologickými, ale aj nefrologickými a infekčnými pracoviskami. Ak má byť táto náročná procedúra diagnostickým prínosom, musí existovať spolupráca medzi klinikom a laboratórnym personálom v oblasti indikácie vyšetrenia a správnej techniky odberu. Typizácia kryoglobulínu vyžaduje komplexné zhodnotenie vyšetrení v sére aj rozpustenom kryoprecipitáte. Okrem kryoglobulinémie typu I, sprevádzajúcej lymfoproliferatívne ochorenia je v súčasnosti najčastejšie diagnostikovaná zmiešaná kryoglobulinémia u pacientov s chronickou hepatitídou C. Rutinné laboratórne metódy umožňujú kvantifikáciu a typizáciu kryoglobulínu, aj keď ich použitie je obmedzené pri nízkych hladinách kryoglobulínov, najmä typu III. Monitorovanie aktivity ochorenia alebo efektu liečby pomocou vyšetrenia kryoglobulínov je možné za predpokladu, že vyšetrenia budú realizované štandardizovanými postupmi odberu, spracovania a analýzy, ktorých cieľom je zabezpečiť reprodukovateľnosť výsledkov a eliminovať stratu kryoprecipitátu počas spracovania.

LITERATÚRA

1. Meltzer, M., Franklin, E. C.: *Cryoglobulinemia: a study of twenty-nine patients. IgG and IgM cryoglobulins and factors affecting cryoprecipitability.* Am. J. Med., 1966, 40: 828–836.
2. Brouet, J. C., Clauvel, J. P., Danon, F., Klein, M., Seligmann, M.: *Biologic and clinical significance of cryoglobulins. A report of 86 cases.* Am. J. Med., 1974, 57: 775–88.
3. De Rosa, G., Gobbo, M. L., De Renzo, F. et al.: *High prevalence of hepatitis V virus infection in patients with B-cell lymphoproliferative disorders in Italy.* Am. J. Hematol., 1997, 55: 77–82.
4. Oliver, M., Coton, T., Ragot, C., Chianéa, D., Moalic, J. L., Debonne, J. M.: *Cryoglobuline: recherche, typage et quantification. Étude chez le sujet sain et chez des patients atteints d'une hépatite C chronique I.* Ann. Biol. Clin., 2005, 63: 59–65.
5. Szymanowicz, A., Doche, Ch. Coulhon, M. P. et al.: *Détection, caractérisation et interprétation des cryoglobulines, recommandation du groupe de travail "Cryoglobuline" du Collège National de Biochimie des Hôpitaux.* Spectra Biologie, 2007, 161: 47–58.
6. Saadoun, D., Elalamy, I., Ghillani-Dalbin, P., Sene, D., Delluc, A., Cacoub, P.: *Cryofibrinogenemia: new insights into clinical and pathogenic features.* Am. J. Med., 2009, 122: 122.
7. Trendelenburg, M., Schifferli, J. A.: *Cryoglobulins are not essential.* Ann. Rheum. Dis., 1998, 57: 3–5.
8. Kallemuchikkal, U., Gorevic, P. D.: *Evaluation of cryoglobulins.* Arch. Pathol. Lab. Med., 1999, 123: 119–125.
9. Le Carrer, D.: *Cryoglobulinémies: proposition d'un protocole d'exploration biologique. Actualisation de leur classification.* Les feuillets de biologie, 1998, 221: 55–65.
10. Dammacco, F., Sansonno, D., Piccolli, C., Tucci, F. A., Racanelli, V.: *Cryoglobulins: an overview.* Eur J Clin Invest, 2001, 31: 628–638.
11. Sansonno, D., Carbone, A., De Re, V., Dammacco, F.: *Hepatitis C virus infection, cryoglobulinaemia, and beyond.* Rheumatology, 2007, 46:572-578.
12. Tissot, J. D., Schifferli, J. A., Hochstraser, D. F. et al.: *Two-dimensional polyakrylamide gel electrophoresis analysis of cryoglobulins and identification of an IgM-associated peptide.* J. Immunol. Methods, 1994, 173: 63–75.
13. Sene, D., Ghillani-Dalbin, P., Thibault, V. et al.: *Long-term course of mixed cryoglobulinemia in patients infected with hepatitis C virus.* J. Rheumatol., 2004, 31: 199–206.
14. Ferri, C., Greco, F., Longombardo, G. et al.: *Association between hepatitis C virus and mixed cryoglobulinemia.* Clin. Exp. Rheumatol, 1991, 9: 621.
15. Dispenzieri, A., Gorevic, P. D.: *Cryoglobulinemia.* Hematol. Oncol. Clin. North. Am., 1999, 13: 1315–1349.
16. Bryce, A. H., Kyle, R. A., Dispenzieri, A., Gertz, M. A.: *Natural History and therapy of 66 patients with mixed cryoglobulinemia.* Am. J. Hematol., 2006, 81: 511–518.
17. Stefanova-Petrova, D., Tzvetanska, A. H., Naumova, E. J. et al.: *Chronic hepatitis C virus infection: Prevalence of extrahepatic manifestation and association with cryoglobulinemia in Bulgarian patients.* World J. Gastroenterol., 2007, 13: 6518–6528.
18. Ferri, C., Zignego, A. L., Pileri, S. A.: *Cryoglobulins.* J. Clin. Pathol., 2002, 55: 4–13.
19. Dimitrakopoulos, A. N., Kordossis, T., Hatzakis, A., Moutsopoulos, H. M.: *Prevalence and clinical significance of circulating cryoglobulins in HIV-positive patients with and without co-infection with hepatitis C-virus.* J. Med. Virol., 2003, 69:339-343.
20. Oliver, M., Grandadam, M., Marimoutou, C. et al.: *Persisting mixed cryoglobulinemia in Chikungunya infection,* PLoS. Negl. Trop. Dis., 2009, 3:e374, dostupné on-line na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2629124/>.
21. Lunel, C., Musset, L., Cacoub, P. et al.: *Cryoglobulinemia in chronic liver disease: role of hepatitis C virus and liver damage.* Gastroenterology, 1994, 106, p. 1291–1300.
22. Cacoub, P., Fabiani, F. L., Muset, L. et al.: *Mixed cryoglobulinemia in chronic hepatitis C virus.* Am. J. Med., 1994, 96: 124–132.
23. Rhiu, V., Cohen, P., André, M. H. et al.: *Characteristics and outcome of 49 patients with symptomatic cryoglobulinaemia.* Rheumatology, 2002, 41: 290–300.
24. Shihabi, Z. K.: *Cryoglobulins: an important but neglected clinical test.* Ann. Clin. Lab. Sci., 2006, 36: 395–408.
25. Vermeersch, P., Gijbels, K., Mariën, G. et al.: *A critical appraisal of current practice in the detection, analysis, and reporting of cryoglobulins.* Clin. Chem., 2008, 54: 39–43.
26. Vermeersch, P., Gijbels, K., Knockaert, D. et al.: *Establishment of reference values for immunoglobulins in the precipitate.* Clin. Immunology, 2008, 129: 360–364.

27. Sargur, R., White, P., Egner, W.: *Cryoglobulin evaluation: best practice?* Ann. Clin. Biochem., 2010, 47: 8–16.
28. Bakker, A. J., Slomp, J., de Vries, T. *et al.*: *Adequate sampling in cryoglobulinaemia: Recommended warmly.* Clin. Chem. Lab. Med., 2003, 41: 85–89.
29. Robert, D., Barelli, S., Crettaz, D. *et al.*: *Clinical proteomics: Study of a cryogel.* Proteomics, 2006, 6: 3958–3960.
30. Romaszko, J. P., Tridon, A., Jouanel, E., Subtil, E., Dibet, P., Betail, G.: *Detection et analyse des cryoglobulines: etude comparative d'une population de malade et d'une population de temoins sains.* Pathol. Biol., 1993., 41: 525–529.

Adresa pre korešpondenciu:

MUDr. Eva Ďurovcová
Laboratórna diagnostika LABMED, a. s.
Rastislavova 43
040 01 Košice
e-mail: eva.durovcova@labmed.sk

**ABSTRAKTY
LABKVALITA**

ACTIVE ROLE OF EPMA IN HEALTHCARE PROMOTION: PATIENT IN THE FOCUS OF PREDICTIVE, PREVENTIVE AND PERSONALISED MEDICINE

Olga Golubnitschaja^{1, 2}, Vincenzo Costigliola¹

¹The European Association for Predictive, Preventive and Personalised Medicine, www.epmanet.eu, Brussels, Belgium

²Department of Radiology, University of Bonn, Germany

Key words: frame-programme; common strategic framework; predictive, preventive, and personalised medicine; cost-effective healthcare; EU-Commission; EPMA World Congress – vision 2020.

In 2010 the EU-Commission has triggered consultations with the leading experts who are actively developing innovative bio/medical technologies and promoting the field of personalised medicine. From April till June 2010, the series of workshops was signed and organised by the EU-Commission as the “Vision 2020” in Brussels aiming to elaborate the items which will be

European Commission Research Health Events

Events



European Perspectives in Personalised Medicine


Square-Brussels Meeting Centre, Brussels, Mont des Arts,
1000 Brussels, Belgium 12-13 May 2011

European Commission's DG Research and Innovation is organizing the conference European Perspectives in Personalised Medicine, in Brussels on 12 -13 May 2011.

The conference will take stock of the recent achievements in health related research leading to personalised medicine and will aim at identification and prioritisation of future actions needed at the European level, bringing together European and national – level policy makers, industrial and academic researchers, patients, clinicians and other stakeholders. The conference programme is based on the conclusions of a series of workshops on personalised medicine organised in 2010. The summary workshop reports can be consulted [here](#).

The Conference will take place at **Square-Brussels Meeting Centre**, Mont des Arts, **1000 Brussels, Belgium**

The programme of the conference will allow a large space for discussion and networking.

Conference programme : [here](#) 

Conference sessions include:

- The basics of personalised medicine
- Biomarkers, Clinical trials, diagnostics and treatments
- Uptake in healthcare

Commissioner for Research and Innovation **Máire Geoghegan-Quinn**, and Commissioner for Health and Consumers, **John Dalli** will participate.

You can register [here](#)

Figure 1. European event of the global meaning: “European Perspectives in Personalised Medicine” is the workshop organised by the EU-Commission in order to finalise the priorities and items for personalised medicine in the new Common Strategic Framework

fundamental to develop personalised medicine for us – European citizens in the new frame-programme Common Strategic Framework during the next 10–15 years beginning with 2013. Upon the invitation by the EU-Commission, several EPMA-experts have been involved in the creation of the items. Summarizing protocols of these consultations have been published on the website of the EU-Commission.

Now it is time to approve the elaborated programme for personalised medicine in the new frame-programme. The finalising meeting “*European Perspectives in Personalised Medicine*” was open to all and took place in Brussels on May 12–13th 2011 – see the announcement by the EU-Commission in Fig. 1.

The following topics were discussed:

- The role of “omics” research and technologies in the development of personalised medicine – opportunities for clinical utility
- Biomarkers in personalised medicine: key challenges in identification, validation and qualification of safety and efficacy biomarkers
- Clinical research and trials in personalised medicine – needs and considerations
- The regulatory framework and personalised medicine: approval process towards the market and patients
- Post-approval process: cost-benefit approaches and uptake in healthcare systems
- Implementing personalised medicine: practitioner and patient perspectives, availability, awareness, resources and needs.

In order to discuss the final items, the EU-Commission has nominated representatives of the main stakeholders and leading professional groups. Among them, three of EPMA-associated experts have been invited to comment on and to contribute to the corresponding topics:

- Prof. Dr. Romano Danesi, The National EPMA-Representatives in Italy,
- Prof. Dr. Chales Swanton, The National EPMA-BOARD in UK,
- Prof. Dr. Olga Golubnitschaja, Editor-in-Chief & Secretary-General of EPMA.

The audience has appreciated the contribution by the EPMA-Representatives. The key challenges, needs, topics and corresponding items promoted by EPMA for specialised calls (budgets) in the new programme, that have been taken into the final protocols by the EU-Commission, are summarised below.

INNOVATIVE EDUCATIONAL PROGRAMMES FOR PROFESSIONALS AND POPULATION IN PREDICTIVE, PREVENTIVE AND PERSONALISED MEDICINE

A. Professionals

As Springer has very recently informed us, in Europe there are currently two international scientific journals specialised in personalised medicine, namely The EPMA J. (EPMA/Springer) and Personalized Medicine (UK, published by “Future Medicine Ltd.”). When compared to the number of journals dedicated



Figure 2. Book-series “Advances in Predictive, Preventive and Personalised Medicine” in preparation by EPMA/Springer to be released in the years 2012–2015 as the didactic material for specialised educational programmes

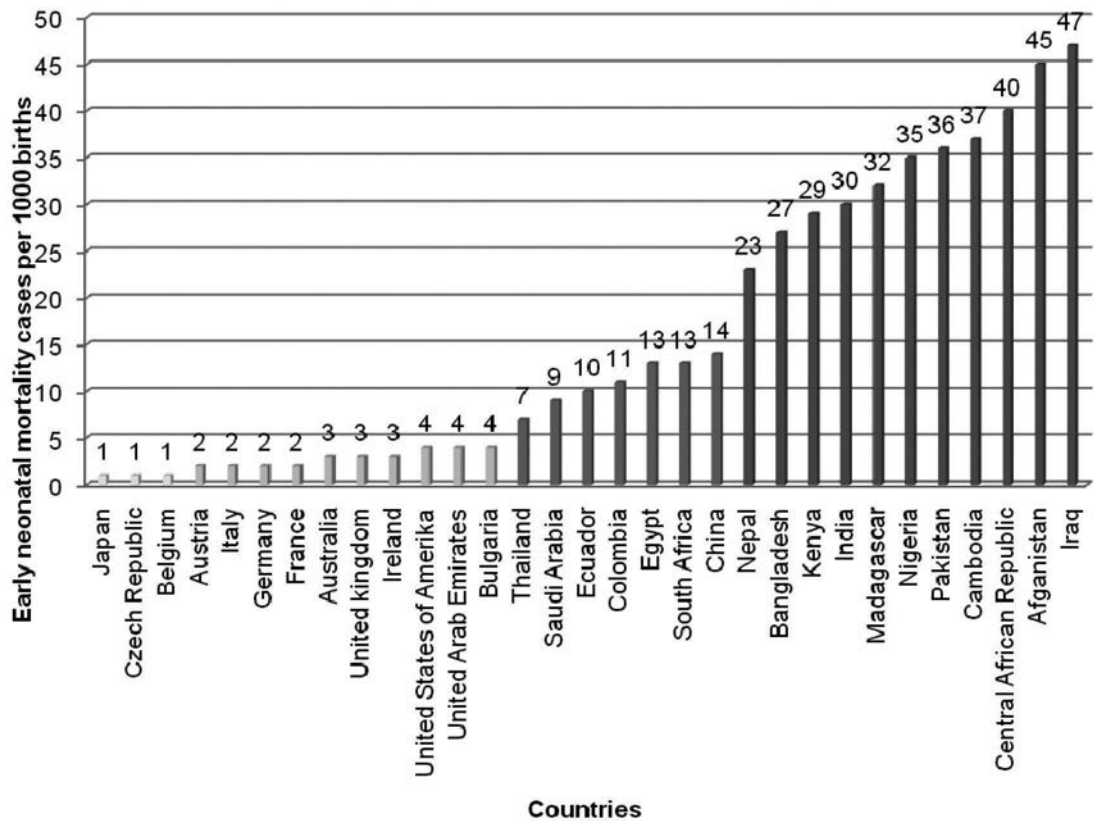


Figure 3. Global estimates for different countries by the World Health Organisation in 2004: newborn mortality cases per 1000 births – see the website: http://whqlibdoc.who.int/publications/2007/9789241596145_eng.pdf

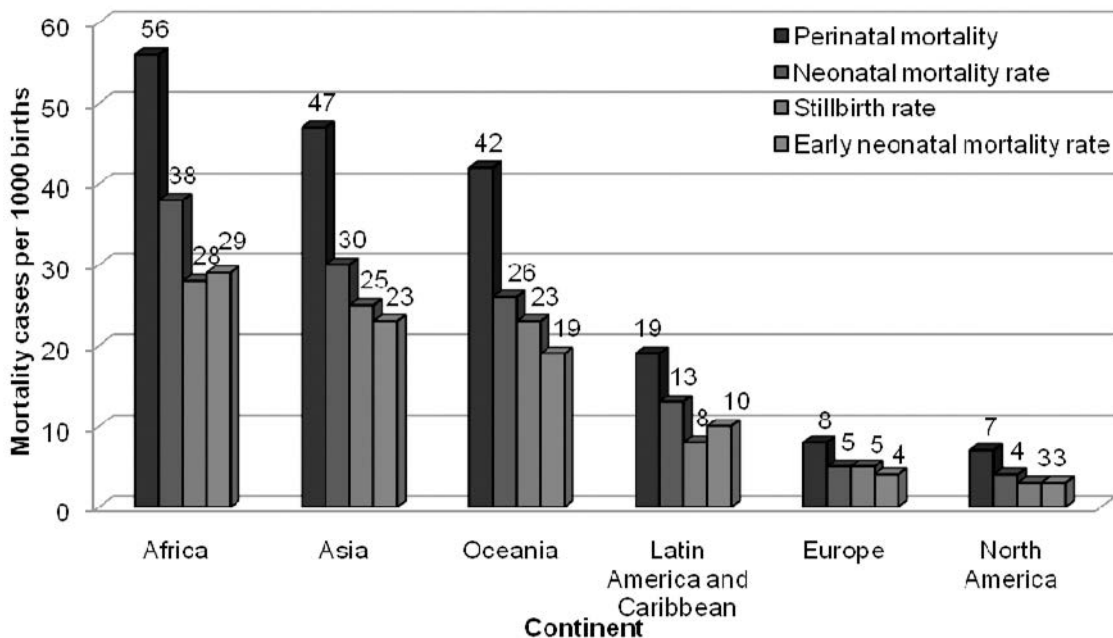


Figure 4. Global estimates for newborn mortality cases per 1000 births categorised as perinatal, neonatal, stillbirth and early neonatal mortality as published by the World Health Organisation in 2004 – see the website: http://whqlibdoc.who.int/publications/2007/9789241596145_eng.pdf

to “omics”-technologies or medical imaging and single pathologies, this represents a very small body of literature. What are the reasons behind this?

The members of the Editorial BOARD of The EPMA J. working weekly with the manuscripts and the peer-review procedure of the journal know very well, how difficult this task is. Different professional groups in personalised medicine have realised that they speak “different professional languages” less understandable for others. Consequently, great discoveries made by one professional group, are frequently underestimated or even not valued at all by the others resulting in delays to the implementation of novel developments in personalised medicine across diverse areas. Therefore, in healthcare we need to develop a new culture among experts in order to promote the multidisciplinary field of personalised medicine. Our message is - the innovative PPPM-related educational programmes for professionals should be prioritised in the Common Strategic Framework.

In order to promote innovative educational programmes, in collaboration with Springer, EPMA has developed worldwide pioneer initiatives creating the didactic materials for the field as follows:

- The EPMA Journal that regularly updates both needs and achievements in the field of PPPM in application to major and rare pathologies.
- The book-series “Advances in Predictive, Preventive & Personalised Medicine” (Book-series Editor: Olga Golubnitschaja; the book-series release is starting in 2011 with the following volumes:
 - “Healthcare Overview: innovative national and international programmes dedicated to predictive, preventive & personalised medicine”, Volume Editor: Vincenzo Costigliola, Brussels, Belgium;
 - “PPPM in Diabetes mellitus”, Volume Editor: Mahmood Mozaffari, Augusta, USA;
 - “PPPM in Neurodegenerative diseases”, Volume Editor: Silvia Mandel, Haifa, Israel;
 - “Drug delivery systems: Advanced technologies potentially applicable in personalised medicine”, Volume Editor: Jorge Coelho, Coimbra, Portugal.

This important initiative should be obligatory supported and well used at the European level and worldwide.

B. Population

Advanced personalisation in medicine is achievable solely in the case of participative medicine that meets the demands of patient advocacy groups focussed on individually created medical approaches. The reader will find a number of positive examples in this journal-issue concordant with this statement. Hence, the prevalence of birth asphyxia (the most frequent pathology in newborns) registered for children born to educated mothers is several times lower compared with those born to uneducated/illiterate mothers [O. Golubnitschaja *et al.*, Birth asphyxia as the major complication in newborns:

Moving towards improved individual outcomes by prediction, targeted prevention and tailored medical care. EPMA J. 2011; 2(2)]. It is evident that strong restrictions in the amount of education lead to dramatic deficits and costs that have repercussions in several branches of the society resulting in increased pressure within healthcare systems [O. Golubnitschaja & V. Costigliola, *Common origin but individual outcomes: time for new guidelines in personalized healthcare.* Personalized Medicine. 2010 7(5): 561–568]. Our message is – new guidelines are essential to regulate the field in favour of educational measures for preventive programmes and advanced healthcare systems.

INDIVIDUALISED TREATMENT: WHEN IS THE APPROPRIATE START-POINT?

Current preventive and personalised strategies, consider an extremely limited spectrum of pathologies. Besides individual genetic background/predispositions of parents and history of pregnancy, the quality of birth is crucial for every newborn and decisive for plenty of potential pathologies to be developed early or later in life. These facts are currently ignored, and both the prenatal and postnatal diagnoses are performed on a very limited scale (see Figures 3 and 4).

The obvious lack of innovative diagnostic and individualised treatment approaches applied in reproductive medicine, neonatology and paediatrics has led to a spectrum of long-term consequences in society including negative social, ethical and economic impacts. Our message is – the task of individual prediction and well-timed targeted prevention of the life-long chronic pathologies in post-natal period should be given the extraordinary priority in advanced healthcare and related innovative programmes. New European guidelines should be elaborated emphasising advanced diagnostics approaches for reproductive medicine, healthcare of children and youth.

PREDICTING THE ONSET OF CHRONIC DISEASES AND CREATING TAILORED TREATMENTS – THE COST-EFFECTIVE MEDICINE OF THE FUTURE

As a consequence of the accumulating clinical data and knowledge about the epidemiology and pathological mechanisms of the most frequent causes of morbidity and mortality, we are currently reconsidering our view of the origins and progression of cardio-vascular, oncologic and neurodegenerative diseases. The majority of these pathologies are of chronic nature: they progress from precursor lesions over one or even several decades of life until a diagnosis is made that is often too late for effective therapeutic intervention. An excellent example is the epidemic scale of diabetes mellitus type 2 wit-

nessed in the European Union. In most industrialised countries and countries with large populations, the permanently growing cohort of diabetics creates a serious healthcare problem and dramatic health economic burden. Estimates for diabetes prevalence in the years 2030 is half a billion patients worldwide – see Fig. 4.

Moreover, the contemporary onset of the dominant diabetes type 2 is already observed in subpopulations of teenagers. Severe complications secondary to early onset of diabetes mellitus, such as retinopathy, nephropathy, silent ischemia, dementia, and cancer, soon can lead to collapsing healthcare systems.

Our message is – new European guidelines should create the robust juristic and economic platform for advanced medical services utilising the cost-effective models of risk assessment followed by tailored treatments focussed on the precursor stages of chronic disease.

DELIVERING PERSONALISED TREATMENTS IN THE EUROPEAN UNION

It is increasingly recognised that personalised medicine is essential to identify those patients most likely to benefit from novel therapeutic approaches and importantly, identify those patients likely to derive harm from a new intervention. The identification of predictive biomarkers of response to conventional and novel therapeutics is of paramount importance to minimise serious adverse events associated with treatment and maximise the proportion of patients who will derive therapeutic benefit. For the new Common Strategic Framework

it is recognised that new approaches to clinical trial design and tissue biobanking procedures, combined with international academic, industry and clinical partnerships will be essential to deliver developments in personalised treatments necessary to enhance the safer and more effective delivery of novel therapeutics. As part of this, the importance of developing coordinated clinical electronic patient record and “-omics” systems for biomarker discovery, suitable for rapid implementation into clinical practice, is recognised as a key area for development within the new European initiative by the Common Strategic Framework.

FUTURE PERSPECTIVES

An optimistic versus Pessimistic Prognosis depends on diagnostic, preventive and treatment approaches that healthcare systems will preferably adopt in the near future. It has been predicted that in approximately 2030 the prevalence of diabetes mellitus will reach half a billion affected people worldwide, who may be additionally burdened with a spectrum of secondary complications (cancer, cardiovascular and neurodegenerative diseases). During the same period, neurodegenerative pathologies (Alzheimer’s and Parkinson’s diseases, glaucoma, macular degeneration, etc.) could reach more than 30% of the global disease burden. Without innovation in healthcare such developments will pose a serious threat to health economies and may lead to collapsing healthcare system.

By contrast, the effective utilisation of advanced early/predictive diagnostics together with preventive

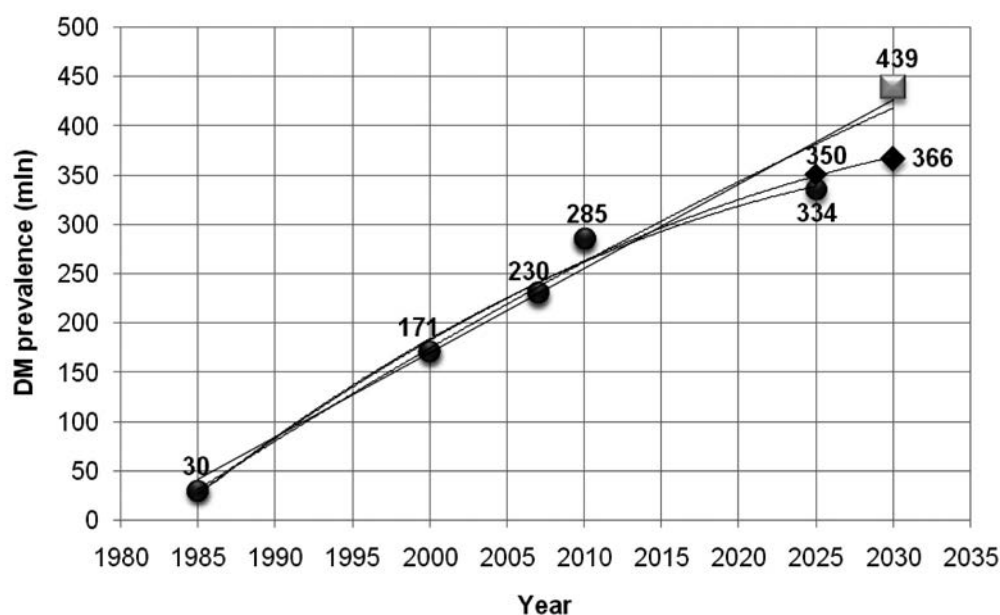


Figure 5. Worldwide prevalence of diabetes mellitus with getting more pessimistic prognosis for the next 3 decades: current literature updates

and personalised medical approaches could enable a significant portion of the population to reach their senior years in vibrant psychosocial health, with excellent physical and mental wellbeing, participating actively in society. Global research and implementation programmes in bio/medicine, communication among scientific societies, healthcare providers, policy-makers, educators and patient organisations together with a consolidation of professional groups in the branch of personalised medicine, will play a decisive role in driving the situation in favour of one of the two scenarios – an optimistic or pessimistic prognosis. The new framework aims at promotion the optimistic scenario in Europe and worldwide.

The strategic developments have been, further, discussed at the EPMA-World Congress 2011 in Bonn, Germany For the first time in the history of medical congresses, on September 15 till 18th 2011, representatives and delegations from more than 40 countries worldwide came together, in order to summarise current achievements, discuss problems, create future strategies and celebrate our consolidation in the innovative field of preventive, predictive and personalised medicine (Figure 5).

The forum was defined as an aureate brainstorming, since no one from the main stakeholders in the field was missing: global organisations, academia, international scientific associations, patient organisations, industry, patenting institutions, healthcare providers, policy makers, founding bodies, publishers, educators, regulating authorities, politicians, ministries of innovation, education and health, investors. All contributors stressed the idea that preventive, predictive and personalised medicine is an extremely multidisciplinary field looking for innovation in science, healthcare and economy of personalised medicine. Consequently, the overall successful concept as well as optimal approaches for its practical realisation can be hardly created by individual professional groups but also unlikely by single nations. Congress-contributors have been requested to elaborate a summary of corresponding specialised sessions in a form of expert recommendations. In January 2012, the collective congress report will be sent to the national ministries of innovation, education and health as well as to the field-related global organisation for their reconsiderations of current strategies in the field and improvement of healthcare at national and European levels and in global scale.

The next milestone – The EPMA-World Congress 2013 – will update the achievements and demonstrate the efficacy of currently running and additionally triggered programmes in the field of predictive, preventive, personalise and participative medicine.

AKREDITÁCIA A KVALITA V MEDICÍNSKOM LABORATÓRIU

**Balla J., Kužmová A., Hrehorovský M.
Pošefková I., Palková J., Karahutová R.**

Analyticko-diagnostické laboratórium a ambulancie
Prešov

SUMMARY

Recently the accreditation process has become a subject of widespread interest in Slovakia. Accreditation is a mechanism to ensure high quality laboratory services to patients and physicians by defining mandatory and best practices in laboratory medicine. Slovak national accreditation service (SNAS) sends representatives to medical laboratories to assess and periodically audit at planned intervals their compliance to the requirements in accordance with the standards ISO/IEC 17025 and/or ISO/IEC 15189. According to their quality policies accredited laboratories must maintain quality monitoring, tracking of outcomes, awareness of client satisfaction and to ensuring quality in the whole testing process – from blood collection to reporting of test results. They run internal quality control programmes to maintain the accuracy and precision of the results daily. They subscribe to and regularly participate on external quality assessment schemes such as the Labquality, SEKK, Randox and Bio-Rad as well. There are circumstances in which laboratories need to introduce new methods, applications, standards or modify their methods within their scope of accreditation. Such a laboratory requires to be allowed for changes, e.g. flexibility concerning object/matrix/sample or with respect to parameters/components/analytes. If a laboratory wishes to be accredited under the flexible scope, then it must demonstrate that it has a credible managerial system which assures that all tests carried out are under the control and in accordance with the requirements of accreditation. Laboratory must justify that it has the technical competence and depth of experience to support a flexible scope. The laboratory must submit the relevant data in the form of a validation and/or verification reports to make it available for review upon request at any time to accreditation body. Laboratory must ensure that such modifications to methodology do not incorporate new measurement principles. Medical laboratories assist physicians and patients through rapid and reliable analysis of clinical specimens and provide advice on the appropriateness, interpretation and limitations of the tests performed. For many years a common belief persisted that the quality of the medical laboratory is only directly related to the quality and reliability of the equipment and reagents they use, and the companies that supply them. The role of personnel, qualification and

know-how was not enough recognized. But the quality in laboratory medicine is the result of a true team effort. Training and continuing education of staff is of utmost interest and the continual professional development is sound investment for the medical laboratory.

ÚVOD

Zdravotná starostlivosť je služba založená na etických princípoch, ktorá je zameraná na zlepšovanie kvality zdravia a kvality života. Zdravotnícka starostlivosť musí rešpektovať nielen zákony, nariadenia a normy, ale aj individualitu každého pacienta na ktorého sa kvalita zdravotníckej starostlivosti orientuje. Zdravotná starostlivosť, ktorá napĺňa znaky vysokej kvality, uspokojuje špecifické požiadavky pacientov pri najvyššej možnej úrovni vedomostí a dostupných zdrojov poskytovateľov, maximalizuje prospech pre pacienta a minimalizuje riziko poškodenia zdravia a blaha pacienta. Kvalita zdravotníckej starostlivosti nie je ľahko definovateľnou charakteristikou. **Pacienti** vnímajú kvalitu zdravotnej starostlivosti prirodzeným individuálnym (emocionálnym) spôsobom, pri ktorom, rovnako ako samotná liečba, zohrávajú u nich významnú úlohu aj rôzne subjektívne faktory a okolnosti. **Zdravotné poisťovne** sa zaujímajú o kvalitu z pohľadu financií a chcú dosiahnuť najlepšiu zdravotnícku starostlivosť za čo najmenej peňazí. **Poskytovatelia** zdravotnej starostlivosti, medzi ktorých radíme aj **medicínske laboratóriá**, sa zaujímajú o vytvorenie čo najlepších podmienok pre kvalitu po odbornej stránke. Zavedenie kvality do zdravotníckej starostlivosti sa preto javí náročné a dlhodobé. Úspešná implementácia programov kvality sa buduje na princípe sústavného zlepšovania zdravotnej starostlivosti a úzko súvisí s inštitucionálnou podporou vládnych, vedeckých a odborných organizácií zdravotníckym zariadeniam a poskytovateľom zdravotnej starostlivosti.

„Kvalita sa spája s ľuďmi, nie s vecami. Predtým ako budete schopní zlepšiť kvalitu musíte zmeniť prístup ľudí k ich práci na každej úrovni procesu.“

Phillip Crosby

KVALITA V LABORATÓRNEJ MEDICÍNE

Na účely diagnostiky, liečby a prevencie poskytuje laboratórna medicína 70–80 % informácií o pacientovi, pričom náklady na laboratórnu diagnostiku predstavujú zhruba 3–5 % všetkých nákladov na zdravotnú starostlivosť. Klinické laboratóriá sa usilujú zlepšiť kvalitu laboratórných skúšok, redukovať diagnostické chyby, znížiť čas vyšetrenia a zvýšiť vzájomnú porovnateľnosť výsledkov. Mobilita pacientov, ktorú umožňuje voľný pohyb osôb v európskych krajinách, znamená súčasne aj transfer zdravotníckej dokumentácie medzi rôznymi zdravotníckymi zariadeniami. Správna interpretácia la-

boratórných nálezov, hlavne u dlhodobo liečených alebo sledovaných pacientov, vyžaduje, aby laboratórne výsledky boli zhodné, navzájom porovnateľné a kompatibilné.

Základnou úlohou medicínskych laboratórií je analýza telových tekutín a vyšetrenie ostatných biologických materiálov. Hlavným cieľom klinických laboratórií je vykonávať tieto merania na čo najvyššej možnej úrovni kvality s použitím čo najnižších možných nákladov pri súčasnom dodržiavaní etických pravidiel a zabezpečení bezpečnosti pacientov a pracovníkov laboratórií. Tieto protichodné požiadavky môžu medicínske laboratóriá riešiť aplikáciou systémov manažérstva kvality založených na báze národných alebo medzinárodných štandardov. Tieto štandardy stanovujú požiadavky na predanalytickú, analytickú a postanalytickú fázu laboratórneho vyšetrenia. Implementácia systémov manažérstva kvality sa v klinických laboratóriách považuje v súčasnosti za najvhodnejší spôsob trvalého zlepšovania kvality. Medicínske laboratóriá, ktoré chcú preukázať svoju spôsobilosť trvalo zlepšovať kvalitu poskytovaných služieb musia mať zavedený taký systém kvality, ktorý prešiel akreditačným procesom a bol posúdený nezávislou treťou stranou (externou inštitúciou spôsobilou vykonať akreditačný akt). Využitím moderných systémov riadenia kvality môžu laboratóriá súčasne dosiahnuť aj lepšie uznanie svojich služieb a kvality vydávaných výsledkov.

Laboratórna diagnostika je najregulovanejšia oblasť zdravotnej starostlivosti. Na zavedenie systému kvality do praxe svojich pracovísk používajú klinické laboratóriá vo svete buď národné normy alebo medzinárodne platné a uznávané normatívne dokumenty ISO alebo kombináciu oboch. Medzinárodná federácia pre klinickú chémiu a laboratórnu medicínu (IFCC) a Európska federácia pre klinickú chémiu a laboratórnu medicínu (EFCC) orientujú svoje strategické odporúčania a stanoviská v oblasti kvality na akreditáciu založenú na štandardoch ISO.

GLOBALIZÁCIA A KVALITA V MEDICÍNSKÝCH LABORATÓRIÁCH

Zdravotnícke, medicínske alebo klinické laboratórium je laboratórium, ktoré vykonáva skúšky (analýzy) klinických vzoriek s cieľom získať informácie o zdraví pacientov vzťahujúce sa k diagnostike, liečbe a prevencii chorôb. Pre bezpečnosť a ochranu zdravia pacientov je rozhodujúca dôveryhodnosť zdravotníckych laboratórií, ktorá umožňuje lekárom a pacientom spoliehať sa na služby poskytované týmito laboratóriami. Globalizácia zdravotníckych služieb vyžaduje, aby sa požiadavky na kvalitu služieb poskytovaných v klinických laboratóriách v SR zosúladiť s požiadavkami, ktoré platia v členských krajinách EÚ. V kontexte evolúcie zdravotníckych systémov jednotlivých štátov EÚ a ruka v ruku s technologickým pokrokom v laboratórnej medicíne prebieha v medicínskych laboratóriách od polovice 90-tych rokov proces masívneho zavádzania systémov manažérstva

kvality a systémov zabezpečenia kvality. Medicínske laboratóriá, ktoré chcú poskytovať kvalitnú zdravotnú starostlivosť preukázateľným spôsobom, musia pracovať na základe uznávaných medzinárodných štandardov. Musia vypracovať, zaviesť a udržiavať taký systém manažérstva kvality, ktorý je vhodný na príslušnú oblasť použitia. Požiadavky na kvalitu musia zodpovedať typu medicínskeho laboratória, rozsahu a objemu skúšobných činností, ktoré sa v laboratóriu vykonávajú. Spôsobilosť medicínskeho laboratória vykonávať špecifikované činnosti spoľahlivo a dôveryhodne osvedčuje tretia, nezávislá strana (autorita), akreditáciou. To, že sa posudzovanie a hodnotenie všetkých činností vykonáva nezávisle a nestranne, sa považuje za hlavný faktor dôveryhodnosti a spoľahlivosti akreditácie. Akreditácia je pre medicínske laboratóriá dobrovoľná, nie je podmienená žiadnymi obmedzujúcimi podmienkami ani diferencovanými finančnými požiadavkami.

Aj keď proces akreditácie medicínskych laboratórií v Slovenskej republike naberá na popularite, podiel akreditovaných klinických laboratórií je stále nízky. Mnohé laboratórne pracoviská sa akreditačného procesu stráňajú a z rôznych dôvodov ho odmietajú. Akreditácia klinického laboratória sa však stáva dôležitou súčasťou tzv. indikátorov kvality, ktoré slúžia nielen na zostavovanie rebríčkov kvality klinických laboratórií v Slovenskej republike, ale mali by byť viac zohľadnené aj v zmluvách uzatváraných so zdravotnými poisťovňami.

„Akreditácia v medicínskych laboratóriách je dobrovoľná, nie je podmienená žiadnymi obmedzujúcimi podmienkami a môže o ňu požiadať každé klinické laboratórium v SR.“
<http://www.snas.sk>

AKREDITÁCIA A CERTIFIKÁCIA V SR

Medzi certifikáciou a akreditáciou je výrazný rozdiel. Certifikácia je potvrdenie od neutrálnej a nezávislej organizácie, že výrobok alebo služba spĺňajú požiadavky normy. Akreditácia je postup, ktorým poverená inštitúcia (akreditačný orgán) oficiálne uzná subjekt spôsobilým vykonávať špecifické činnosti. Medzinárodne slovo „norma“ sa používa na označenie normatívneho dokumentu. Cieľom akreditácie je vybudovanie dôvery v spoľahlivosť a zodpovednosť organizácie ako predpoklad vzájomného uznávania výsledkov posudzovania zhody (správy o skúškach, správy o prehliadkach, certifikáty).

Dôležitú úlohu v národnom systéme posudzovania spôsobilosti a zhody plní v Slovenskej republike Slovenská národná akreditačná služba (ďalej len SNAS). SNAS ako národný akreditačný orgán uznávaný vládou Slovenskej republiky oficiálne potvrdzuje spôsobilosť vykonávať deklarované činnosti nestranne, nezávisle a na požadovanej odbornej úrovni a udeľuje medicínskym laboratóriám osvedčenia o akreditácii, ktoré sú uznávané v Slovenskej republike i v zahraničí. O akreditáciu v rámci SNAS môže požiadať každá fyzická alebo

právnická osoba, pričom SNAS uplatňuje pri svojej činnosti nediskriminačný prístup založený na princípe vzájomnej dohody medzi žiadateľom o akreditáciu a akreditačným orgánom. Rovnaké podmienky platia pre malé neštátne laboratóriá rovnako ako pre veľké laboratóriá univerzitných nemocníc. Prijaté opatrenia nepripúšťajú závislosť orgánov SNAS a akreditovaných subjektov na komerčných alebo iných finančných záujmoch vedúcich k nežiaducemu ovplyvneniu ich rozhodnutí a konania.

AKREDITÁCIA V MEDICÍNSKÝCH LABORATÓRIÁCH

Pri akreditácii klinických laboratórií na území Slovenskej republiky usilujúcich sa o potvrdenie spôsobilosti/kompetentnosti na výkon laboratórnych diagnostických testov, SNAS vo všeobecnosti posudzuje plnenie ustanovení normy ISO/IEC 17025: 2005 a riadi sa príslušnými Metodickými smernicami na akreditáciu. Klinické laboratóriá, ktoré poskytujú služby v oblasti skúšania na medicínske účely, ak o to požiadajú, sú posudzované na plnenie požiadaviek normy ISO/IEC 17025: 2005 Všeobecné požiadavky na kompetentnosť skúšobných a kalibračných laboratórií (General requirements for the competence of testing and calibration laboratories), a/ alebo ISO 15189: 2007 Medicínske laboratóriá – Špecifické požiadavky na kvalitu a kompetentnosť (Medical laboratories – Particular requirements for quality and competence). ISO 17025: 2005 je základom pre akreditáciu skúšobných laboratórií a je široko používaná na celom svete nielen v priemysle ale aj v medicíne. ISO 15189:2007 zahŕňa všetky kritériá charakteristické pre klinické laboratóriá. Výber normy je na žiadateľovi o akreditáciu. SNAS akredituje aj laboratóriá, ktoré vyvíjajú a validujú alebo modifikujú a validujú metódy pre potreby skúšania a kalibrácie pričom sa riadi ustanoveniami normy ISO/IEC 17025: 2005 a/alebo ISO 15189: 2007. Bez ohľadu na to, ktorú normu si medicínske laboratórium na akreditáciu vyberie, musí spĺňať predpísané normatívne požiadavky. Zavedenie a budovanie systému manažérstva kvality v medicínskom laboratóriu je zložitý proces. Existujú dve cesty ako vybudovať systém kvality. Klinické laboratórium môže zadať túto úlohu externej poradenskej organizácii alebo si môže vybudovať systém kvality vlastnými silami. Jednotlivé zložky systému kvality musia byť aktuálne, relevantné a záväzné. Musí byť zabezpečené, aby sa všetok personál aktívne zúčastňoval procesov s prvkov systému kvality, aby bol nápomocný pri zavádzaní nových postupov a pri modifikácii jestvujúcich, aby dokladoval všetky odchýlky od prijatej normy a aby o tom informoval manažment laboratória. Medicínske laboratóriá sa musia pred udelením akreditácie v každej oblasti zo špecifikácie činností o ktorých akreditáciu žiadajú, pravidelne zúčastňovať medzilaboratórnych porovnávacích skúšok, tzv. externého hodnotenia kvality, a dosahovať v ňom uspokojivé výsledky.

DRUHY AKREDITÁCIE V MEDICÍNSKYCH LABORATÓRIÁCH

V rámci akreditácií sú laboratória rozdelené na laboratória s takzvaným fixným rozsahom, označované ako laboratória typu 1 a laboratória s flexibilným rozsahom, ktorými sú laboratória 2. a 3. typu. Fixný rozsah akreditácie znamená presné zadefinovanie rozsahu, na aké konkrétne činnosti je laboratórium akreditované. Mimo týchto činností sa laboratórium nemôže odkazovať na svoj akreditovaný status. Flexibilný rozsah akreditácie umožňuje laboratóriám prebrať zodpovednosť za riadenie celého rozsahu akreditácie alebo jeho časti, vrátane výkonu zmien a rozšírení o nové činnosti, v rámci povolennej a zadefinovanej flexibility. Rozsah akreditácie nie je zadefinovaný tak konkrétne, ako v prípade fixného rozsahu a môže sa po vykonaní jasne definovaných krokov a splnení náležitých požiadaviek definovaných akreditačným orgánom a laboratóriom, upraviť alebo rozšíriť bez predchádzajúceho posúdenia zo strany akreditačného orgánu. Princíp flexibility u laboratória 2. typu možno využívať v rámci skúšaných materiálov, matric, prostredí, typov meradiel, kalibrovaných typov meradiel, skúšaných parametrov, ukazovateľov, meracích rozsahov a postupov používaných na skúšanie, meranie alebo kalibráciu. Medzinárodná federácia pre klinickú chémiu a laboratórnu medicínu (IFCC) vo svojom oficiálnom stanovisku deklaruje flexibilný rozsah akreditácie ako preferovanú formu akreditácie a odporúča touto formou akreditovať väčšinu vykonávaných skúšok (testov).

„Nikdy, nikdy ale nikdy sa nevzdávajúte.“

Winston Churchill

MEDICÍNSKE LABORATÓRIÁ A BIZNIS

Dnešné medicínske laboratórium nie je iba o produkcii výsledkov. S nástupom globalizácie, kde kapitál, ľudia a myšlienky môžu cestovať okolo sveta bez väčších prekážok, dochádza k tzv. hyperkonkurencii. K tomu, aby sa laboratórium zaradilo medzi úspešné firmy musí sa odlišiť od svojej konkurencie niečím novým a originálnym. Musí ponúknuť „pridanú hodnotu“, ktorou môže byť kvalita. Musí vziať na seba dobrovoľne zodpovednosť a siahnuť na nové progresívne riešenia. Čeliť rastúcej konkurencii na trhu je ťažké, ale dá sa aj tak, že namiesto toho, aby sa medicínske laboratórium snažilo získať nejakú trvalú konkurenčnú výhodu, sústreďuje sa radšej na série kratších období s konkurenčnými výhodami. Laboratórium môže mať napríklad počas dvoch desaťročí niekoľko dobrých a niekoľko zlých rokov, ale dôležité je, aby si udržalo pozíciu na trhu. Dobré medicínske laboratórium, to nie je len dostupnosť ekonomických zdrojov, to je predovšetkým bohatstvo obsiahnuté v poznatkoch ľudí, kvalifikovaných odborníkov z laboratórnej medicíny. Sú to predovšetkým ľudia, ktorí sa neboja konfrontácie s novými spôsobmi

myslenia. Skutočne tvorivé výsledky klinické laboratórium nemôže dosiahnuť bez dostatočnej prípravy, tvrdej práce, podpory a kúska šťastia. Lenže ani surová genialita jednoducho nestačí a vyžaduje si u každého pracovníka dlhé roky usilovnej práce, aby sa patrične rozvinula.

LITERATÚRA

1. Balla, J.: *Akreditácia by mala mať vplyv na zmluvy*. Zdravotnícke noviny č. 32, 12, 2011.
2. Balla, J., Kužmová, A., Hrehorovský, M., Pošefková, I., Palková, J., Karahutová, R.: *Akreditácia flexibilného rozsahu v klinickom laboratóriu*. Laboratórna diagnostika, 1–2, 8, 2010.
3. Balla, J., Kováč, G., Blažiček, P., Farkaš, M., Varmusová, E., Homzová, K., Balla, B.: *Kritériá analytickej kvality. Požiadavky na národné štandardy akosti v laboratórnej medicíne*. Laboratórna diagnostika, 2–3, 45–60, 2003.
4. Kovac, G., Porubenova, A., Blazicek, P., Balla, J., Farkas, M.: *Quality standards in the Slovak republic*. In: *SwissMedLab and 8thAlpsAdria Congress*, October 2004 Final Program, 20, Lucerne, Switzerland.
5. EA-2/05. *The Scope of Accreditation and Consideration of Methods and Criteria for the Assessment of the Scope in Testing*. European co-operation for Accreditation. August 2001, Rev 2.
6. Spitzenberger, F., Edelhäuser R.: *Accreditation of Medical Laboratories in Europe: Statutory Framework, Current Situation and Perspectives*. *Transfus. Med. Hemother* 2006; 33: 384–392.
7. Wim Huisman I, A., Horvath R., Burnett, D., Blaton, V., Czikkely, R., Jansen, R. T. P., Kallner, A., Kenny, D., Mesko, P., Plebani, M., Queraltó, J., Schumann, G., Sprongl, L., Vitkus, D., Wallinder, H., Zerah S.: *Accreditation of medical laboratories in the European Union*. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2007; 45(2): 268–275, 2007.
8. Armbruster, D., Miller, R. R.: *The Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine (JCTLM): A Global Approach to Promote the Standardisation of Clinical Laboratory Test Results*. *Clin. Biochem. Rev.*, Vol. 28, August 2007.
9. Bersch, C.: *The "globalization" of the medical lab*. March 2009, www.mlo-online.com
10. ILAC-G18: *Guideline for the Formulation of Scopes of Accreditation for Laboratories*. ILAC-G18: 04/2010.
11. Burnett, D.: *ISO 15189: 2003 - a practical tool for the management of quality in the medical laboratory*. *Jugoslav Med. Biochem.*, 24: 193–200, 2005.
12. Žel, J., Mazzara, M., Savini, C., Cordeil, S., Camloh, M., Štebih, D., Cankar, K., Gruden, K., Morisset, D., Van den Eede, G.: *Method Validation and Quality Management in the Flexible Scope of Accreditation: An Example of Laboratories Testing for Genetically Modified Organisms*. *Food Anal. Methods* (2008) 1: 61–72.
13. MSA-1/06. *Validácia skúšobných metód. Všeobecné zásady a požiadavky. Validation of test methods. General principles and requirements*. Bratislava, august 2009.

14. **Gligič, L.:** *Status of development and implementation of medical laboratories accreditation in Serbia.* JMB 27: 144–147, 2008.
15. **LAB39.** *UKAS Guidance on the Implementation and Management of Flexible Scopes of Accreditation within Laboratories.* United Kingdom Accreditation Service, 2004.
16. **Jansen, R. T. P., Kenny, D., Blaton, V., Burnett, D., Huisman, W., Plebani, M., Queraltó, J. M., Zérah, S., van Lieshout, J.:** *Usefulness of EC4 Essential Criteria for Quality Systems of Medical Laboratories as Guideline to the ISO 15189 and ISO 17025 Documents.* Clin. Chem. Lab. Med., 2000; 38(10): 1057–1064.
17. **Bell, R. E.:** *Medical laboratory accreditation and quality control in Alberta: I. Laboratory accreditation.* C.M.A. Journal/November 21, 1970/Vol. 103.

INDIKÁTORY PRE KVALITU POLITIKY V ZDRAVOTNÍCTVE

**Jana Barlová¹, Ján Lepej², Viera Coraničová³
Katarína Lepejová⁴, Marko Kapalla⁵**

¹Interné oddelenie, I. súkromná nemocnica, Košice-Šaca

²Inštitút nukleárnej a molekulárnej medicíny, Košice

³Oddelenie klinickej biochémie, Vranovská nemocnica, n.o.,
Vranov nad Topľou

⁴Roche Slovensko s.r.o., Bratislava

⁵European Association for Predictive, Preventive
and Personalised Medicine (EPMA), Brussels, Belgium

Tento príspevok si dáva za cieľ podnietiť diskusiu a zdôrazniť to, čo by sme mali ako odborníci, pracujúci v zdravotníctve, ale aj ako občania a potenciálni pacienti, sledovať v oblasti politiky, týkajúcej sa zdravotnej starostlivosti, aby sme mohli včas zaznamenať a poukázať na nesprávne smerovanie od kvality poskytnutej zdravotnej starostlivosti pre konkrétneho pacienta, resp. občana, smerom k obchodovaniu s maximálnym ziskom, a to takmer za akúkoľvek cenu.

S pojmom „kvalita“ i praktickou stránkou tohto pojmu je denne konfrontovaný nielen pacient, ale aj každý zdravotnícky pracovník - laboratórneho nevynímajúc. Samotný pojem „indikátor kvality v zdravotníctve“, nie je legislatívne zakotvený, preto sme sa snažili nájsť aspoň definíciu „kvality v zdravotníctve“, ktorá by bola legislatívne definovaná. Musíme konštatovať, že jedine §9 (Systém kvality), zákona č. 578/2004 o poskytovateľoch zdravotnej starostlivosti, zdravotníckych pracovníkoch, stavovských organizáciách v zdravotníctve a o zmene a doplnení niektorých zákonov, zachytáva niektoré aspekty kvality zdravotnej starostlivosti z pohľadu zavádzania systému kvality. Kvalitu v laboratórnej medicíne, resp. laboratórnej diagnostike súčasná legislatíva Slovenskej republiky presne nedefinuje.

Podľa Medzinárodnej organizácie pre štandardizáciu (International Organisation for Standardisation, <http://www.iso.org>) je pojem „kvalita“ definovaný ako súhrn takých vlastností predmetu (služby), ktoré zabezpečujú plnú funkčnosť predmetu (služby) podľa deklarovaných, resp. zamýšľaných potrieb. Ak túto definíciu aplikujeme na zdravotnú starostlivosť, ako službu, potom musíme prísť k záveru, že to, čo nám v systéme chýba, sú práve tie „deklarované, resp. zamýšľané potreby“. Inak povedané, **chýbajú nám jednoznačne stanovené vízie**, kam sa má systém zdravotnej starostlivosti uberať a akú pridanú hodnotu by mal priniesť v porovnaní s terajším stavom, ktorý nie je možné hodnotiť ako optimálny.

Na druhej strane, kvalita politiky v zdravotníctve je determinovaná jednak kvalitou platných legislatívnych opatrení, ich dodržiavaním zo strany všetkých zainteresovaných strán.

Tab. 1. Príklady indikátorov pre hodnotenie kvality politiky v zdravotníctve. Pre každý indikátor je samozrejme potrebné na základe odborných diskusií doplniť spôsob objektívnej kvantifikácie, požadovaný trend, cieľový stav, resp. víziu, či smer, ktorým by sa mala kvalita z pohľadu daného indikátora uberať, ako aj hodnotenie reálneho trendu

| Potenciálne indikátory pre hodnotenie kvality politiky v zdravotníctve |
|---|
| Edukácia obyvateľstva v oblasti zdravia |
| Podpora zdravia |
| Kontinuálny dostatok kvalifikovaných pracovníkov |
| Investície do modernizácie poskytovania zdravotnej starostlivosti |
| Náklady na poskytovanú zdravotnú starostlivosť |
| Ekonomická udržateľnosť systému zdravotnej starostlivosti |
| Existencia legislatívy určujúcej štandardy a požiadavky |
| Konkurencia a spolupráca pri poskytovaní zdravotnej starostlivosti |
| Ochrana práv pacienta |
| Ochrana práv všetkých pracovníkov v zdravotníctve |
| Pravidelnosť aktualizácie zákonov, týkajúcich sa poskytovania zdravotnej starostlivosti, vrátane permanentnej aktualizácie katalógu výkonov |
| Podiel „zdravej“ a „chorej populácie“ |
| Počet pacientov na 1 lekára |
| Dostupnosť zdravotnej starostlivosti |
| Počet poškodených pacientov zlým zásahom zo strany zdravotníckeho personálu |
| Podiel akreditovaných a certifikovaných poskytovateľov zdravotnej starostlivosti |
| Prehľadne definované vízie a plánovaný rozvoj |
| Účasť odborníkov na vypracovávaní plánov rozvoja |
| Kvantifikovateľná spokojnosť pacienta |
| Kvantifikovateľná spokojnosť pracovníkov v zdravotníctve |
| Využívanie informačných technológií |
| Podpora rozvoja a modernizácie |
| Počet nových technológií zavedených do praxe |
| Počet poskytovateľov zdravotnej starostlivosti, ktorí sú v konflikte záujmov |
| Pomer investícií do rozvoja a zvyšovania kvality voči generovanému zisku |
| ďalšie indikátory |

sovaných subjektov a v neposlednom rade aj reálnymi plánmi na jej kontinuálne zvyšovanie, vychádzajúc z vízií ďalšieho rozvoja vedy a technológií, ktoré priamo, alebo sprostredkované súvisia so zdravím človeka.

V tabuľke 1 uvádzame príklady indikátorov, na základe ktorých by, podľa nášho názoru, bolo možné hodnotiť kvalitu politiky v oblasti zdravotnej starostlivosti. V princípe sa dajú tieto indikátory rozdeliť do niekoľkých kategórií, a to: legislatívne indikátory, odborné indikátory, edukačné indikátory, publikačné indikátory, indikátory rozvoja v oblasti zdravotnej starostlivosti, ekonomické indikátory, indikátory technologickej vyspelosti, sociálne indikátory, etické indikátory a ďalšie.

Cieľom takýchto indikátorov pre kvalitu politiky by malo byť kontinuálne a nestranné hodnotenie stavu v zdravotníctve, bez ohľadu na to, kto je v danom čase vo vláde, či v parlamente. Na to je samozrejme potrebné, aby dané indikátory boli objektívne zhodnotiteľné, všeobecne dostupné, pravidelne aktualizované a zároveň musíme mať jasnú víziu toho, kam chceme, aby naše zdravotníctvo smerovalo. Túto víziu je potrebné prezentovať na širšom fóre odborníkov zo všetkých odborov nielen medicíny, ale aj ostatných vied, ktoré medicínu dopĺňajú, resp. poskytujú nevyhnutné odborné skúsenosti.

Ak máme aj v budúcnosti používať pojem „kvalita“ v spojení s pojmom „politika“, „zdravie“ a „pacient“, resp. občan, potom musíme zdôrazniť nutnosť nielen doplnenia chýbajúcej legislatívy, týkajúcej sa kvality v oblasti zdravotnej starostlivosti všeobecne, ale aj vážne sa zaoberať témou kvality samotnej politiky v oblasti zdravotníctva a s tým spojenými indikátormi.

HODNOTENIE ZDRAVOTNÍCKYCH TECHNOLOGIÍ A LABORÁTORNA DIAGNOSTIKA

Ján Bielik

Fakulta zdravotníctva,
Trenčianska Univerzita A. Dubčeka v Trenčíne
Slovenská agentúra pre hodnotenie
zdravotníckych technológií, n.o.

Ciel: Laboratórna diagnostika dokáže u mnohých ochorení urýchliť i spresniť diagnózu. Tlak na presnejšiu a rýchlejšiu diagnostiku sa premieta pomerne často aj do tzv. nadužívania laboratórných vyšetrení, pričom od určitej hranice nemajú v podstate ďalšie vyšetrenia podstatný vplyv na výsledný diagnostický efekt. Zdanlivo vedľajším, ale čoraz významnejším efektom uvedeného nadužívania príslušných laboratórných vyšetrení je sprievodná finančná záťaž systému zdravotnej starostlivosti. Cieľom práce bolo vytvorenie a realizácie pilotného projektu hodnotenia klinického prínosu laboratórných vyšetrení ochorení štítnej žľazy aj z pohľadu nákladovej efektivity.

Metódy: Laboratórna diagnostika patrí medzi zdravotnícke technológie a na jej kvalitu sa používajú metódy hodnotenie zdravotníckych technológií. V tomto prípade bola použitá metóda analýzy endokrinologických pracovísk v určitom regióne (samosprávnom kraji), ktorá sa týkala ordinácie a realizácie laboratórných vyšetrení ochorení štítnej žľazy v r. 2010. Následne sa prepočítal pri každom druhu vyšetrenia priemerný počet vyšetrení na 1 pacienta za 1 mesiac a potom aj priemerný počet všetkých vyšetrení na 1 pacienta za 1 mesiac. Výsledky: Získané výsledky budú, vzhľadom na časové prebiehanie analýzy, interpretované až priamo na konferencii.

Záver: Rozdiel medzi maximom počtu vyšetrení jedného druhu vyšetrenia a všetkých vyšetrení, pri reflektovaní počtu hospitalizácií ako nepriamej známky kvality poskytovanej zdravotnej starostlivosti, vyjadruje mieru pravdepodobne dostatočného klinického prínosu a efektívnej nákladovosti.

IQC V REÁLNEM ČASE - FIREMNÍ MIDDLEWARE JAKO JEDEN Z NÁSTROJŮ K ZAJIŠTĚNÍ KVALITY MANAGEMENTU DAT A BEZPEČÍ PACIENTŮ

Miroslav Bischof

BeckmanCoulter Česká republika s.r.o.

Firemní middleware REMISOL ADVANCE obsahuje i rozšířený modul pro správu a management výsledků IQC v reálném čase ze všech napojených analyzátorů včetně biochemických, imunochemických, hematologických, imunologických a jiných analyzátorů. SW zajišťuje správu dat z jednoho či více míst včetně vzdáleného zabezpečeného přístupu. Základní výčet funkcí a hodnocení dat podle kritérií: Westgardovy pravidla pro jednu hladinu (1 - 2S, 1 - 3S, 2 - 2S, 3 - 1S, 4 - 1S, 10X, 12X) a pro více hladin (2 - 2S, (2 ze3) 2S, R - 4S, 3 - 1S, 4 - 1S, 10X, 12X), pravidla založena na rozmezí (mimo rozmezí, varovná, chybová rozmezí) v souladu s Rili-bák, management šarží kontrolních materiálů, hodnocení založené na patientských datech (klouzavý průměr, EWMA, Xb), grafická vyjádření (LeveyJennings, Stewart, klouzavý průměr, distribuční grafy), graficképrolínání výsledků pro jednoduché porovnání (současné znázornění více hladin nebo více analyzátorů), detailní statistika podle zvolených časových úseků.

Na základě výsledků IQC se aktivují speciální funkce jako zobrazení specifických předdefinovaných varovných hlášek, zastavení automatické validace parametrů, zastavení programování analyzátorů a další.

SW zpracovává data z více zdrojů: SW REMSIOL ADVANCE (kontrolní a/nebo patientská data), manuální vklad dat (pro nenapojené analyzátorů), data z jednotlivých QC modulů laboratoře (umožňuje migraci dat do nového systému) a ze souborů CSVpoužívající specifický formát.

To vše zajišťuje efektivní rozhodování a IQC v reálném čase a zvyšuje kvalitu a bezpečnost patientských dat.

KLÚČOVÁ ÚLOHA AMBULANCIE V UDRŽIAVANÍ KVALITY PREDANALYTICKEJ FÁZY - VPLYVY NA PREDANALYTIKU

Blažiček Pavel

Alpha Medical Bratislava a SZU Bratislava

Moderné technológie v laboratóriu, nové systémy riadenia akosti (interná kontrola, externá kontrola kvality) umožňujú analyzovať vzorky krvi s veľkou presnosťou. Ak však vznikne chyba, akreditované laboratória musia mať mechanizmus nájsť presnú príčinu vzniknutej chyby, túto chybu presne identifikovať a urobiť nápravné opatrenia, aby sa predišlo chybám v budúcnosti. Napriek tomuto môžu však vzniknúť závažné chyby za ktoré laboratórium nemôže a pacient môže byť ohrozený. Uvediem príklad prečo som túto prednášku vlastne aj pripravil. U pacienta sme namerali vysoké aktivity transamináz (viacej ako 2 μ kat/l). Vzhľadom nato, že máme možnosť v LIS-e pozrieť si históriu pacienta som zistil, že v predchádzajúcich 6 odberoch nemal ani raz transaminázy zvýšené. Bolo vyslovené podozrenie na hepatitídu a preto sme ihneď urobili HCV, HBsAg, HAV - všetko bolo negatívne. Pacient nebral žiadne lieky a ani nutričné doplnky, len priznal sa, že nedávno začal piť čaj, ktorý mu odporučil a predal čínsky lekár vo Viedni. Odporučil som mu ihneď prestať piť tento čaj a o desať dní nemal transaminázy zvýšené. Treba na toto myslieť, lebo veľa ľudí cestuje po svete a často do Thajska, Číny, Kórei a na „blších trhoch“ si nakúpia rôzne čajové zmesi na omladenie, na zlepšenie potencie, proste „na všetko“. Treba si uvedomiť, že bylinné výrobky zdravej výživy a doplnky nie sú bezpečnejšie ako lieky len preto, že sa vyskytujú v prírode, a pochádzajú z rastlín. Koniec koncov, mnohé rastliny sú jedovaté! Dávka a spôsob užívania tiež hrajú dôležitú úlohu v bezpečnosti daného prípravku. Čaje, tinktúry a extrakty majú rôzne koncentrácie účinnej látky. Iné množstvo môže byť obsiahnuté v šálke čaju, iné je v niekoľkých čajových lyžičkách tinktúry, alebo dokonca aj v usušenej bylinke. Napríklad, mäťový čaj všeobecne považovaný za bezpečný a veľmi chutný je v poriadku, ale piť mäťový olej, ktorý je oveľa koncentrovanejší môže byť toxický pri nesprávnom použití. Ja chcem upozorniť na chyby, ktoré sa môžu vyskytnúť a majú vplyv na biochemické parametre. Často počujeme, no v labáku zase urobili nejakú chybu a nemusí to tak byť. Praktický lekár by si mal uvedomiť aj to, že niektoré bylinky, alebo zdravá zelenina potencujú účinok liekov. Napr. veľmi zdravý cesnak môže u niektorých pacientov, ktorí užívajú warfarín pozmeniť hemokoagulačné parametre. Treba na toto myslieť a nezabudnúť sa na toto opýtať

pacienta. Toto je kľúčová úloha ambulancie a nemalo by sa na to zabudnúť. Laboratórium v tomto prípade môže „iba“ edukovať spolupracujúcich zdravotníckych pracovníkov. (Dobré laboratórium to robí!)

Aj keď bylinné produkty a doplnky sú inzerované ako prirodzené, nie sú prirodzené pre ľudské telo a práve používanie alternatívnych liekov môže významne zmeniť laboratórne výsledky. Mala by existovať užšia spolupráca - komunikácia medzi lekármi poskytujúcimi starostlivosť a atestovanými klinickými biochemikmi pri interpretácii takýchto výsledkov. Vďaka aplikácii medicíny založenej na dôkazoch, vďaka vytvoreniu manažmentu predchádzania chybám, hlavne edukácii zdravotníckeho personálu, ale i pacientov, zainteresovanosti pracovníkov a hlavne dôslednému využívaniu spätnej väzby, by mohlo dôjsť k zlepšeniu situácie aj v dosiaľ problémových oblastiach pred a post analytickej fázy na úroveň, ktorú sme už dosiahli v analytike. Lekári by sa mali vždy opýtať pacientov o užívaní potravinových doplnkov pri začatí alebo ukončení liečby nielen pri predpisovaní liekov, ale aj v prípade neočakávanej reakcie.

KEY ROLE OF PRACTICES IN SUPPORTING THE QUALITY OF PREANALYTICAL PHASE – PREANALYTICAL FACTORS INFLUENCING QUALITY

Modern technology in the laboratory, new systems of quality control (internal control, external quality control) allow to analyze blood samples with high precision. However, if there is an error, an accredited laboratory must have a mechanism to find the exact cause of the error, this error accurately identify and take corrective action to prevent errors in the future. Despite this, however, may occur significant errors in the laboratory and the patient may not be threatened. Here is an example of why I have this lecture really well prepared. The patient we measured had high transaminases (more than 2 μ kat/l). Given that we have the opportunity in e-LIS to look at the history of the patient, I found that in the previous six withdrawals had never once elevated transaminases. Was suspected hepatitis, so we immediately did HCV, HBsAg, HAV - everything was negative. The patient took no medications or nutritional supplements, only confessed that he recently started to drink tea, which he recommended and sold the Chinese doctor in Vienna. I immediately recommended him to stop drinking this tea and ten days hadn't elevated transaminases. It is this thinking, because many people travel the world and often in Thailand, China, Korea and the "flea market" to buy various mixtures of tea to rejuvenate, to improve the potency, simply "to everything." It should be noted that herbal health products and supplements are safer than drugs simply because they occur naturally and come from plants. After all, many plants are poisonous! Dosage and method of use also play an important role in the safety of the product. Teas, tinctures and extracts

have different concentrations of active ingredient. Other quantities may be contained in a cup of tea, other in a few teaspoons of tincture, or even dried herbs. For example, peppermint tea is generally considered safe and very tasty and it is okay to drink it, but peppermint oil, which is much more concentrated can be toxic if used incorrectly. I want to draw attention to errors that can occur and affect the biochemical parameters. We often hear there is a mistake occurred in the laboratory, however, it might not be true. Practitioner should be aware also that some herbs, vegetables or healthy potentiate the effect of drugs. For example, very healthy garlic in some patients taking warfarin alter coagulation parameters. It is this thinking and do not forget to ask the patient. This is the key role of the ambulance and not to forget it. Laboratory in this case, "only" educate medical co-workers. (Good Laboratory does!) Although herbal products and supplements are advertised as natural products, there are not natural to the human body and the right use of alternative medicines may significantly alter laboratory results. There should be closer cooperation – communication between the doctors providing care and attested clinical biochemist in interpreting these results. With the application of evidence-based medicine, by creating a management prevent errors, especially education of health professionals but also patients, staff involvement and in particular the consistent use of feedback could lead to improvements in the previously problematic areas before and post-analytical phase to a level we have already achieved in the assay. Physicians should always ask patients about use of dietary supplements when starting or stopping only when prescribing drugs, but also in the case of an unexpected reaction.

PROTEOMIKA MOČU - BLIŽŠIE KU KLINICKEJ PRAXI?

Eva Ďurovcová^{1, 2}, Anna Birková²

¹Laboratórna diagnostika LABMED, a.s., Košice
²Ústav lekárskej a klinickej biochémie a LABMED, a.s.
LF UPJŠ, Košice

SÚHRN

Úlohou klinickej proteomiky je identifikovať vhodné biomarkery pre včasnú diagnostiku, určenie prognózy a monitorovanie liečby ochorení. Pre ľahkú dostupnosť, neinvazívnosť odberu a obsah bielkovín obličkového aj mimoobličkového pôvodu je moč vhodným materiálom pre proteomické štúdie. Technologický pokrok najmä v oblasti hmotovej spektrometrie a bioinformatiky viedol v uplynulom desaťročí k aplikácii močovej proteomiky do rôznych oblastí základného biomedicínskeho aj klinického výskumu. Skúmajú sa solubilné aj exozomálne močové proteíny, pričom sa využívajú viaceré prístupy (discovery, targeted proteomics). Štúdium močového proteómu poskytuje cenné informácie o fyziológii a patofyziológii obličiek (dysfunkcii až patológii rôznych častí nefrónu) a umožňuje objavovať biomarkery obličkových aj mimoobličkových ochorení. V uplynulom desaťročí bolo publikovaných množstvo štúdií, ktoré identifikovali viaceré sľubné biomarkery akútneho zlyhania obličiek, diabetickej nefropatie, posttransplantačných komplikácií, karcinómu prostaty a močového mechúra a mnohých ďalších patologických stavov. Len málo z nich však prešlo validáciou vo veľkých klinických štúdiách a našlo využitie v klinickej praxi. Je potrebné vyriešiť problémy standardizácie v oblasti predanalytickej, analytickej a postanalytickej. Napriek nevyriešeným otázkam majú poznatky z močovej proteomiky potenciál zásadne zlepšiť klinický manažment najmä u pacientov v renálnymi ochoreniami a možno budú schopné aj redukovať finančné náklady na ich zdravotnú starostlivosť.

KONKURENCIA VERZUS ETIKA V LABORATÓRNEJ DIAGNOSTIKE - PRE A PROTI KVALITE

**Michal Farkaš^{1, 2}, Beata Hvozdovičová²
Treichová Monika^{1, 3}**

¹Slovenska komora iných zdravotníckych pracovníkov

²BIOIM Trebišov s.r.o., Trebišov

³LUMOTER s.r.o., Spišská Nová Ves

Cieľom prednášky je definovať postavenie klinického laboratória vo vzťahu k tým, ktorí tieto vyšetrenia požadujú a ordinujú na žiadanku, podobne ako liek na recept. Preto u laboratórneho vyšetrenia, rovnako ako u lieku, očakávajú vysokú kvalitu, spoľahlivosť a rýchlosť. Neexistuje laboratórne vyšetrenie, ktoré by bolo súčasne maximálne spoľahlivé, rýchle a lacné. Racionalizácia, integrácia, konsolidácia klinických laboratórií determinuje maximálnu efektivitu zdrojov a vyúsťuje v bezpečnosť pacienta, majúca na zreteli personalizáciu a regionalizáciu laboratórných vyšetrení. Bezpečnosť pacienta vyžaduje dôslednú znalosť a kontrolu nielen analytickej ale i preanalytickej a postanalytickej fázy laboratórných vyšetrení. Je všeobecne akceptované, že približne 70 % medicínskych rozhodnutí je urobených na základe laboratórných vyšetrení. Laboratórne vyšetrenia pomáhajú vylúčiť alebo potvrdiť diagnostickú úvahu a na ich základe upravuje ošetrojúci lekár ďalší vyšetrovací a liečebný postup. Vedľa anamnézy a fyzikálneho vyšetrenia sú laboratórne metódy najvýznamnejším diagnostickým nástrojom ošetrojúceho lekára a preto musí mať o nich aj patričné teoretické znalosti a v neposlednom rade i praktické zručnosti ako ich v klinickej praxi racionálne využívať. Autori upozorňujú na spôsob zabezpečovania kvality laboratórných vyšetrení s dôrazom na bezpečnosť pacienta v jednotlivých fázach laboratórneho procesu. Veľký dôraz kladú na

preanalytiku, ktorá je významnou súčasťou laboratórneho procesu a preto ju musíme rešpektovať i v bežnej praxi. Znehodnotený biologický materiál by sme v laboratóriu nemali vyšetrovať, ale mali by sme ho odmietnuť, vzhľadom na prípravu, odber, skladovanie a transport. Rešpektujeme regionálny princíp zdravotníctva vo vzťahu k laboratórnym vyšetreniam, pretože významne ovplyvňuje bezpečnosť pacienta. Excelentný výkon zdravotníckeho pracovníka v laboratórnej diagnostike zahŕňa odborný, etický a morálny aspekt osobnosti a je základom ekonomickej a medicínskej efektivity a kvality poskytovania zdravotnej starostlivosti v laboratórnej diagnostike, ktorá by sa mala zameriavať na manažment rizika tak, aby poskytovaná zdravotná starostlivosť bola pre pacienta bezpečná, prospešná a v duchu EBM. Ukazuje sa teda, že akreditácia a audit by mohli byť kľúčovým nástrojom manažmentu rizika a riadenia kvality. Avšak samy o sebe nie sú schopné vyriešiť problémy s kvalitou. Akreditácia má sama svoj kľúčový problém - kvalitu auditu/audítora. Isté optimalizované riešenie sa ponúka vytvorením Inštitútu kvality v zdravotníctve opakovane prezentovaným SKIZP, ktorého úlohou by malo byť: orientovať proces akreditácie na zaistenie kvality procesov a efektivitu cieľov, nie na zisk certifikátov. Autori v prednáške prezentujú spôsob realizácie laboratórných vyšetrení vo svojom regióne a poukazujú v konkrétnych kazuistikách na dôsledky nesprávnej manipulácie s biologickým materiálom, ak sa nedodržiava regionálny princíp a ignoruje sa dostupnosť kvalitného laboratória v regióne zo strany niektorých lekárov bez vedomia pacienta často i v rámci tzv. bártrového obchodu. Pritom etický kódex zdravotníckeho pracovníka hovorí, že je nepripustné, používať nedôstojné praktiky smerujúce k rozšíreniu počtu pacientov, a zároveň je zakázané takéto aktivity iniciovať prostredníctvom druhých osôb. Tieto skutočnosti by si mali uvedomiť aj tzv. medicínski reprezentanti, ktorí navštevujú prirodzené regióny s cieľom získavať tzv. klientov pre svoje vzdialené pracovisko bez nadväznosti na regionálnu nemocnicu resp. regionálne pracovisko laboratórnej medicíny.

MÁME JASNO V POŽIADAVKÁCH NA KVALITU V PREDANALYTICKEJ FÁZE?

Drahoslav Gábor, Iveta Dobiasová, Eva Gáborová

Oddelenie klinickej biochémie
FNsP F.D.Roosevelta, Banská Bystrica

Cesta od vzniku požiadavky na laboratórne vyšetrenie po reakciu lekára na výsledok sa dá rozdeliť na celý rad úkonov, ktoré musia na seba tesne nadväzovať a byť vykonané tak kvalitne, aby neovplyvnili kvalitu celého procesu laboratórneho vyšetrenia. Celý proces sa zvykne rozdeľovať podľa miesta realizácie na fázu predanalytickú, analytickú a fázu postanalytickú. V dnešnej dobe je absolútna väčšina laboratórných vyšetrení výsledkom tímovej práce, pri ktorej okrem samotného pacienta a pracovníkov laboratória majú veľmi dôležitú úlohu aj pracovníci podieľajúci sa na predanalytickej a postanalytickej fáze laboratórneho vyšetrenia. Kvalitu výsledného produktu, laboratórneho výsledku, v jednotlivých fázach jeho vzniku ovplyvňujú rôzne faktory. Tak zložitý proces je a bude vždy ovplyvňovaný faktormi, ktoré môžu jeho výslednú kvalitu znížiť. V publikovaných štúdiách sa uvádzajú chyby – nehody v jednotlivých krokoch celého procesu aj s percentuálnym výskytom v jednotlivých fázach procesu.

Technický pokrok, automatizácia laboratórnej práce, spracúvanie dát informačnými systémami v posledných troch desaťročiach umožnili významné zníženie počtu pozorovaných nezhôd vo fáze analytickej. V predanalytickej i fáze postanalytickej však stále pretrvávajú pomerne vysoký podiel nezhôd, čo môže mať nežiadúci vplyv na zdravotný stav pacienta, ale aj ekonomiku celého procesu a v neposlednom rade aj na renomé zúčastneného laboratórneho pracoviska.

Logicky je tématika predanalytickej fázy zaradovaná v posledných rokoch na všetkých významných podujatiach laboratórných odborov celosvetových, európskych a opakovane sa k nej vraciame aj na podujatiach SSKB.

Autori prednášky sa pokúsili o súhrn doterajších poznatkov z oblasti úskalí predanalytickej fázy. Vychádzajú z 35 ročných skúseností práce lekára na oddelení klinickej biochémie a poznatkov o aktuálnej situácii na vlastnom pracovisku, ako aj z informácií získaných prácou vo funkcii hlavného odborníka Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky pre KLB sa pokúsia predložiť návrh na spôsob definovania požiadaviek na kvalitu predanalytickej fázy v práci pracovísk, ktoré vykonávajú klinicko-biochemické vyšetrenia, ako aj tých ktorí túto kvalitu spoluovplyvňujú.

CIRCULATING NUCLEIC ACIDS IN PREDICTIVE MEDICINE

Peter B. Gahan

Anatomy & Human Sciences King's College London, U.K.
Correspondence to: [pgahan\(at\)aol.com](mailto:pgahan@aol.com)

ABSTRACT

Low levels of DNA and RNA are constantly present in circulating blood, urine and saliva. The concentration in plasma and serum from healthy individuals ranges from 1.8 ng to about 35.0 ng DNA and some 2.5 ng RNA per ml blood. This may increase in pathological situations reaching as high 3,000 ng per ml in the case of some cancers. There are at least ten sources of the released nucleic acids of which only two are derived from living cells, the surface DNA of leucocytes and virtosomes (inter-cellular messengers). In many cases the DNA fragments are derived by apoptosis. RNA may also be released via exosomes and virtosomes.

Increases in the levels of specific DNAs and RNAs have been shown to occur as possible early markers of a range of disorders including trauma, stroke, myocardial infarct, cancer (e.g. lung, colorectal, liver, prostate, breast and oesophageal carcinomas), diabetes, transplant rejection, pre-eclampsia and foetal disorders (e.g. rhesus factors, achondroplasia, thalassaemia "trisomy 13 and 21). The identification of trisomy 21 has undergone trials in clinical practice in the UK, USA and France.

The specific marker DNA or RNA is identified by nucleic acid isolation, mainly from peripheral blood, and augmentation by various forms of PCR prior to either gel electrophoresis or mass spectrometry or sequencing. Monitoring of treatment may also be achieved with successful treatment resulting in the return of the DNA levels to normal. Accurate prognosis has also been predicted for some malignancies, trauma and stroke.

PERSONALIZOVANÁ GENOMIKA V 21. STOROČÍ - POTENCIÁL A REALITA V SR

Imrich Hikkel

Oddelenie lekárskej genetiky, Národný onkologický ústav
Bratislava

Jednou z hlavných možností, ktoré súčasné obdobie genetiky sľubuje je nádej na dosiahnutie vysokej úrovne personalizovanej zdravotnej starostlivosti na podklade analýzy genómu a individuálneho genetického profilu jednotlivca. Cesta k týmto novým možnostiam začala v roku 2003 po dokončení sekvenačnej analýzy prvého ľudského genómu. Za uplynulých osem rokov sme svedkami obrovského pokroku v nových metódach sekvenačnej analýzy, ktorou sa posúvame bližšie k možnostiam využitia analýzy genómu v každodennej medicínskej praxi. Predpokladá sa, že do roku 2014 by sa mohla dosiahnuť meta analýzy genómu 100 ľudí za 10 dní v cene 1000 dolárov za genóm.

Možnosť rutinného využitia genomiky má potenciál ovplyvniť lekársku prax vo viacerých oblastiach zdravotnej starostlivosti ako je oblasť prediktívnej analýzy genetických predispozícií pre rozvoj dedičných a získaných ochorení, oblasť farmakogenetiky a mnoho iných. Pochopenie genómu v týchto intenciách dáva možnosť poskytovať nielen liečbu, ale aj celkovú zdravotnú starostlivosť podľa optimálnych potrieb každého jednotlivca. Možnosť dosiahnutia rýchlej a lacnej analýzy genómu je však stále len začiatok cesty k pochopeniu vzťahov jednotlivých génov a polymorfizmov vo vzťahu k jednotlivým ochoreniam a účinnosti liečby. Ľudský genóm sa skladá z hruba 25 000 génov lokalizovaných na 46 chromozómoch v prostredí 3 miliárd bázových párov a z približne 10 miliónov jednonukleotidových polymorfizmov (SNP - Single Nucleotide Polymorphism), ktoré zabezpečujú variabilitu medzi jednotlivými alelami génu. Každý jednotlivec má teda jedinečnú kombináciu polymorfizmov, ktoré budú ovplyvňovať možnosť predispozície na jednotlivé ochorenia ako aj efekt liečby. Je teda dôležité mapovať jednotlivé genetické varianty a spolu s klinikou zisťovať genotypovo-fenotypové korelácie. V súčasnosti je veľká pozornosť venovaná štúdiu asociácií SNP profilov k rôznym ochoreniam. V roku 2002 bol spustený medzinárodný "HapMaP" (Haplotype Mapping Project) projekt, ktorého cieľom je identifikovať, katalogizovať a zverejňovať jednotlivé varianty.

Rozvoj genomiky otvára aj množstvo ďalších otázok, na ktoré treba zodpovedne diskutovať, ako sú aspekty zachovania súkromia, uchovávanía a ochrany osobných genetických údajov, ochrana pred potenciálnou genetickou diskrimináciou, psychologické aspekty spojené s poznaním predispozície k ochoreniu a to najmä v prípade neexistujúcej vhodnej liečby a mnoho ďalších. Miera prospernosti personalizovanej genomiky pre ľudskú spoločnosť a jednotlivca tak bude závisieť nielen od rozvoja znalostí genomiky, ale aj od hľadania správneho postoja k otázkam v sociálnej, edukačnej a právnej rovine.

RACIONÁLNA A EFEKTÍVNA DIAGNOSTIKA - ZÁKLAD ADEKVÁTNEJ LIEČBY.

Miroslava Jurčáková

Union zdravotná poisťovňa, a.s., Bajkalská 29/A
Bratislava

Union zdravotná poisťovňa, a.s. v snahe o zavedenie inovatívnych, transparentných a objektívnych úhradových mechanizmov pripravila projekt LIENKA /Laboratórne Indikácie a Efektívne Nastavenie Kritérií ich Akceptácie/. Ide o pilotný projekt, založený na inovatívnom systéme zvýšenia efektivity laboratórnej diagnostiky a optimalizácie SVLZ nákladov riadeným procesom. Model štandardizácie diagnostických postupov a transparentne nastavených kritérií úhrady výkonov SVLZ je predpokladom zabezpečenia kvalitnej zdravotníckej starostlivosti, efektívneho, hospodárneho a účelného vynakladania prostriedkov verejného zdravotného poistenia.

Cieľom projektu je nájsť prijateľný kompromis medzi ponukou širokého portfólia diagnostických zo strany laboratórií, relevantnou diagnostickou výťažnosťou pre indikujúceho lekára a jednoznačným benefitom pre pacienta.

V stručnosti ide o optimálne a efektívne nastavenie diagnostických postupov tak, aby poskytli klinickému lekárovi relevantné informácie pre stanovenie diagnózy, stupňa a prognózy choroby, monitorovanie liečby a pre detekciu komplikácií. S tým súvisí koncepcia cielej, účinnej a personalizovanej diagnostiky, ktorá umožní indikáciu adekvátnej therapeutickej modality. Konsenzom odborných spoločností zastupujúcich jednotlivé odbornosti laboratórnej medicíny a zdravotných poisťovní bude jasne definovaný algoritmus indikácií laboratórnych vyšetrení vzhľadom ku klinickej diagnóze a stanovené presné pravidlá a modely úhrady finančne náročných analýz. Takýmto spôsobom bude garantovaná dostupnosť kvalitnej diagnostiky pre všetkých poistencov s prihliadnutím na vývoj a disponibilitu zdrojov verejného zdravotného poistenia. Príprava projektu - projektu predchádzala dôkladná analýza typov vykazovaných výkonov ich počtov a schém. Jednotlivé výkony laboratórnej diagnostiky boli zosumarizované a priradené k adekvátnym odborom laboratórnej medicíny. Postupne prebiehal monitoring prostredia poskytovateľov laboratórnej diagnostiky formou externých revízií kontrol, pracovných stretnutí a konzultácií s odbornými garantmi.

Analyzovali sa jednotlivé sekvencie diagnostických postupov a implementácia nových technológií, porovnávala sa výška nákladov pri aplikácii rozličných diagnostických metód pri dosiahnutí porovnateľných výsledkov. Vyhodnotené boli rôzne schémy vykazovania identických vyšetrení u rôznych poskytovateľov zdravotnej starostlivosti. Na základe toho boli identifikované oblasti v laboratórnej diagnostike, kde je možné v pr-

vom slede aplikovať modely štandardizovaných úhrad formou priradenia špeciálneho kódu s presne definovanou výškou úhrady a nastaviť optimálne diagnostické algoritmy. Ďalej sa zhotovili portfóliá poskytovateľov laboratórnej diagnostiky podľa regionálnej distribúcie a vyhodnotila sa kvalita na základe presne definovaných indikátorov kvality (účasť v systéme externej kontroly kvality, IQA, LIS, preprava biologického materiálu, spektrum vyšetrení, miera využívania manuálnej práce a pod.). Výsledkom je podrobná mapa jednotlivých laboratórií a ich rozdelenie do kategórií A, B, C, D s diferencovanou cenou bodu.

Union zdravotná poisťovňa, a. s. iniciovala stretnutie zástupcov Všeobecnej zdravotnej poisťovne aj Dôvery zdravotnej poisťovne, a. s. s cieľom riešiť situáciu v prostredí laboratórnej diagnostiky kooperatívne.

Rozsah projektových aktivít - model štandardných postupov bude postupne aplikovaný v jednotlivých odboroch laboratórnej medicíny:

- klinická biochémia
- hematológia a transfuziológia
- mikrobiológia
- genetika
- patologická anatómia
- klinická imunológia a alergológia
- rádiológia
- fyziatria, balneológia a liečebná rehabilitácia

Benefity projektu - projekt je postavený tak, aby z neho profitovali všetky zúčastnené strany čiže pacient, ošetrojúci lekár, laboratórium, zdravotná poisťovňa. Poistenec bude mať záruku rovnakých vyšetrení pri konkrétnej diagnóze bez ohľadu na to, akého má lekára resp. z akého je regiónu a na základe cielenej diagnostiky dostane adekvátnu terapiu. Transparentné nastavenie frekvencie indikácií laboratórnych vyšetrení zaručia ochranu pacienta pred neopodstatnenou diagnostikou (duplicitné analýzy, traumatizujúce intervenčné vyšetrenia, nadmerné ožarovanie a pod.). Pre ošetrojúceho (indikujúceho) lekára budú definované princípy racionálnej indikácie. Jasne nastavené pravidlá úhrady laboratórnej diagnostiky z prostriedkov verejného zdravotného poistenia budú prínosom pre laboratóriá a to jednak usmernením opodstatnených indikácií laboratórnych vyšetrení pri konkrétnej diagnóze zo strany lekárov, jednak definovaním základných línií postupu vyšetrení indikovaných odborným personálom priamo v laboratóriu v rámci diferenciálnej diagnostiky (imunohistochemia, mikrobiológia, imunológia, a pod.). Zdravotná poisťovňa vynaloží prostriedky z verejného zdravotného poistenia hospodárne, účelne, efektívne a solidárne pre všetkých svojich poistencov.

Príklady už realizovaných projektových aktivít

- unifikovaná úhrada cytologického skríningu
- akceptovateľné indikácie onkomarkerov
- štandardizované diagnostické schémy pred indikáciou finančne náročnej biologickej terapie

- modely rozsahu úhrad genetickej diagnostiky
- algoritmy hematologických vyšetrení a genetických analýz v hematológii

Aktivity súvisiace s projektom LIENKA:

- workshopy s účasťou zástupcov odborných spoločností v rámci laboratórnej medicíny a zástupcov zdravotných poisťovní
- aktualizácia existujúcich štandardných diagnostických postupov, príprava a návrhy nových v jednotlivých odboroch laboratórnej medicíny
- vypracovanie modelu množstevných limitov pri vybraných laboratórnych analýzach
- implementácia pravidiel racionálnej indikácie a regulácie frekvencie indikácií finančne náročných laboratórnych vyšetrení do zmluvných podmienok
- aplikácia nového modelu aktívneho prístupu k poistencom interakciou lekár/laboratórium/zdravotná poisťovňa/poistenec
- aplikácia modelových diagnostických algoritmov pre vybrané choroby s prvotným záchytným v jednotlivých odboroch
- pravidelné aktualizácie guideline na základe dynamického rozvoja laboratórnej diagnostiky
- princípy racionálnej medziodborovej a zahraničnej spolupráce v diagnostickom procese
- monitorovanie akreditácie a účasti v systéme externej kontroly kvality
- definovanie základnej sady validovaných ukazovateľov kvality a výkonnosti laboratórií
- permanentné analýzy výšky nákladov SVLZ pri aplikácii nových diagnostických metód
- konzultácie v jednotlivých zariadeniach laboratórnej diagnostiky cielene zamerané na dodržiavanie všeobecne záväzných právnych predpisov a dohodnutých postupov
- vypracovanie návrhov metodiky revíznej činnosti v odboroch patologická anatómia, genetika, klinická biochémia, klinická mikrobiológia, hematológia a transfuziológia, imunológia, rádiológia a FBRL
- návrhy riešenia problematiky implementácie POCT do klinickej praxe - definície kritérií zabezpečenia štandardizácie a efektivity diagnostiky POCT
- identifikácia a sumarizácia laboratórnych analýz vykazovaných pod kódmi „podobných vyšetrení“
- návrhy modifikácie interpretačných schém laboratórnych vyšetrení - zvýšenie zainteresovanosti poistenca v diagnosticko-preventívnom procese systematickými intervenciami zo strany poisťovne - preventívne a skríningové programy
- prezentácia výstupov a informácií súvisiacich s procesom realizácie projektu na webovej stránke Union zdravotnej poisťovne, a. s. a v médiách.

LABORATÓRNA DIAGNOSTIKA ALERGIE NA PRÍSTROJI IMMULITE SPOLOČNOSTI SIEMENS ANALYTIKA A KLINIKA

Anna Keleová

Synlab SK, s.r.o., Bratislava

Klinicky nežiadúce reakcie imunitného systému na vonkajšie podnety – alergény, nazývame precitlivosť, hypersenzitivita a alergia.

Toto civilizačné ochorenie dnes vo vyspelých krajinách postihuje tretinu populácie, na Slovensku asi 1,5 miliona ľudí. Príčina narastajúceho počtu alergií je multifaktoriálna: zmeny životného štýlu a prostredia, stres, stravovanie, genetika, zmeny podnebia. Najčastejším alergickým ochorením je alergická alebo senná nádcha ktorú je mediovaná I.typom alergickej reakcie včasným, sprostredkovaným IgE.

Základom diagnostiky alergie I.typu je zistenie alergénu na ktorý organizmus neprimerane reaguje alergickými prejavmi a po senzibilizácii vytvára proti nemu špecifické IgE protilátky (šIgE). Klinicky sa využívajú sa kožné prick testy a in vitro vyšetrenia špecifických IgE zo séra.

Na kvantitatívne stanovenie šIgE fi Siemens ponúka luminometer Immulite, ktorý pracuje na princípe enzýmom enhansovanej chemiluminiscencie aj na našom pracovisku. Medzi originálne riešenia patrí napr. alergén v tekutej fáze, čo poskytuje výbornu väzobnú kapacitu pre merané protilátky. Vyšetrenie tak zachyti veľmi nízke množstvá šIgE už od 0,1 kU/l. Výhodou je tiež plná automatizácia meraní a vysoký počet alergénov na palube.

Aj pre jedinú kauzálnu liečbu alergie – alergénovú vakcináciu (kedysi desenzibilizácia), je u pacienta potrebná detekcia správneho alergénu. Problémom je polysenzibilizácia, kedy nameráme vysoké hodnoty šIgE viacerých alergénov, dôležitá je správna interpretácia výsledkov. Môže ísť o jeden alergén ktorý ale reaguje s určitým epitopom aj u príbuzných i nepríbuzných alergénov. Riešením je vyšetrenie rekombinantných alergénov, ktoré sú presne definované a môžu identifikovať alergizujúcu zložku. V prípade skríženej reaktivity je tiež možné vyšetriť krížovo reaktívny karbohydrátový determinat CCD.

EHK v súčasnosti úspešne robíme v nemeckom Referenzinstitut für Bioanalytik Bonn, ktorý hodnotí koncentráciu, referenčnú triedu aj klasifikáciu stupňa senzibilizácie.

Za posledné roky sme vyšetřili viac ako 9 000 vzoriek šIgE proti rôznym alergénom. Najviac sú indikované potraviny F2, F1, roztoče D2, D1, IP3, plesne M6, M2, aeroalergény stromov T3, T4, tráv G5, G6, burín W6,W1 a iné.

Široká ponuka alergénov je uvedená na našej webovej stránke www.synlab.sk

PERSONALIZOVANÉ METABOLICKÉ PROFILOVANIE

Gustáv Kováč, Anna Porubenová, Štefan Hrušovský,
Katarína Černá, Ján Benetin, Pavel Blažíček

Ústav chémie, klinickej biochémie a laboratórnej medicíny,
Interná klinika, Neurologická klinika
Slovenskej zdravotníckej univerzity, Bratislava

ÚVOD

Cieľom projektu „**Personalizované metabolické profilovanie**“ je zavedenie čipovej diagnostiky, ktorá by mala zvýšiť aspekt personalizácie pri cielej metabolomickej profilácii pacientov s neurodegeneratívnymi a kardiovaskulárnymi chorobami, ako aj u diabetu so zameraním na cytokíny a signálne molekuly v klinickej a laboratórnej praxi.

METÓDA

Spôsob realizácie personalizovanej diagnostiky predstavujú čipový analyzátor a metabolická ambulancia – menovite:

Analytická technika

- Randox Evidence Investigator
- laboratórny materiál
- IT
- reagensy

Špecifické činnosti

- ambulantné
- laboratórne

implementujúce do klinickej praxe

- prediktívnu diagnostiku
- ciele prevenciu
- personalizovanú terapiu

vybraných skupín pacientov u degeneratívnych neurologických, kardiovaskulárných porúch, diabetu, hepatopatií ale aj športovcov.

VÝSLEDKY

| Názov aktivity | Ambulantné a laboratórne činnosti | Ukazovateľ výsledku | Ukazovateľ dopadu |
|---|---|--|---|
| <i>Názov špecifického cieľa</i> | vytvorenie metabolomickej ambulancie a metabolomického laboratória | ordinačné a prevádzkové hodiny včítane dátumu spustenia | počet vyšetrených pacientov a vzoriek |
| <i>Cieľ aktivity</i> | prediktívna diagnostika, cieľená prevencia a personalizovaná terapia | podiel pacientov prediktívne diagnostikovaných, podrobených preventívnym opatreniam a cieľenej terapii | počet pacientov prediktívne diagnostikovaných, podrobených preventívnym opatreniam a cieľenej terapii |
| <i>Termín realizácie aktivity</i> | 4-24 mesiac projektu | vyhodnocovať mesačne | vyhodnocovať mesačne |
| <i>Opis aktivity</i> | klinická a laboratórna diagnostika, stáže, semináre, workshopy, prezentácie | počet vyšetrených pacientov a vzoriek, seminárov, prezentácií workshopov a ich účasti | počet liečených pacientov a pacientov zaradených do cieľenej prevencie |
| <i>Metodológia aktivity</i> | anamnéza, fyzikálne vyšetrenie,, čipová fotometria, rešerše | počet výkonov | počet zlepšení |
| <i>Výstupy aktivity</i> | funkčná metabolická ambulancia a laboratórium, dispenzár, nová kultúra liečebnopreventívnej starostlivosti | priemerné počty | priemerný počet zlepšení |
| <i>Zodpovedná osoba</i> | prof. MUDr. RNDr. Gustáv Kováč CSc MBA | komplexná hodnotiacia správa | komplexná hodnotiacia správa |
| <i>Odborní pracovníci</i> | prof. MUDr. Štefan Hrušovský CSc SVS, doc. MUDr. Ján Benetin, Csc, doc ing. Pavel Blažíček Csc, RNDr. Katarína Baluchová Phd, prof. MUDr. RNDr. Gustáv Kováč CSc MBA | počet prednášok, publikácií | počet citácií |
| <i>Spôsob získavania spätnej väzby</i> | stretnutia projektového tímu navzájom ako aj so spolupracujúcimi subjektami | počet stretnutí | počet výstupov |
| <i>Očakávaný dosah aktivity</i> | Vytvorenie dispenzára pcientov s neurodegeneratívnymi, kardiovaskulárnymi, pečeneňými chorobami a diabetom podrubujúcimi sa personalizovanej terpaii a cieľenej prevencii | počet pacientov | počet zlepšených pacientov zaradených do programu cieľenej prevencie a personalizovanej terapie |
| <i>Zodpovednosť za implementáciu aktivity</i> | prof. MUDr. RNDr. Gustáv Kováč CSc MBA | % plnenia vyššie uvedených parametrov | % plnenia vyššie uvedených parametrov |

DISKUSIA

Očakávané výstupy

- metabolická ambulancia orientovaná na prediktívnu diagnostiku, cieľenú prevenciu a personalizovanú terapiu
- špecializované laboratórium poskytujúce čipovú diagnostiku
- dispenzáre pacientov s kardiovaskulárnymi chorobami, hepatopatiami a diabetom, identifikovaní meto-

dikou prediktívnej diagnostiky, podrobovaní cieľenej prevencii a liečení personalizovaným prístupom

Udržateľnosť

- udržateľnosť by mal zabezpečiť dispenzár pacientov, metabolická ambulancia a čipovo orientované laboratórium, ktoré by mali generovať požiadavky na realizáciu inovatívnej liečebnopreventívnej starostlivosti so zameraním na predikciu, prevenciu a perso-

nalizáciu s cieľom jej premietnutia do katalógu výkonov a financovania poisťovňami.

Aktivity

- rozšírenie cieľových skupín pacientov
- rozšírenie spektra a siete spolupracujúcich špecializovaných ambulancií a ústavov
- vývoj nových čipov.

Úžitky

- zníženie nákladov na terapiu v dôsledku personalizovanej terapie a prediktívnej diagnostiky.

Spôsob udržania kvality úžitkov a ich transfer do praxe

- spolupráca s rozšírenou sieťou poskytovateľov špecializovanej a ústavnej zdravotníckej starostlivosti
- spolupráca s výrobcom čipov Randox na vývoji nových čipov s cieľovou špecifikáciou metabolomických markerov.

Spôsob uplatniteľnosti výsledkov projektu v hospodárskej alebo spoločenskej praxi

- činnosť pilotnej metabolomickej ambulancie a metabolomického laboratória, ktoré prediktívnu klinickú a laboratórnou diagnostikou identifikuje pacientov z množiny neurodegeneratívnych a kardiovaskulárnych chorôb, diabetu a hepatopatií a zaradi ich do programu cieľenej prevencie a personalizovanej terapie.

Vyššie uvedená nová liečebnopreventívna kultúra zvýši kvalitu a efektívnosť poskytovanie zdravotníckej starostlivosti tým, že sa zameria cieľene na preventívne opatrenia a personalizovanú terapiu, čím zvýši účinnosť výstupov zdravotných (vyššie zdravie/zabránenie vzniku choroby resp. potlačenie jej príznakov) ako aj ekonomických (zníženie nákladov na liečbu).

ZÁVER

Zámerom

- je zaviesť do klinickej praxe personalizovanú diagnostiku, cieľenú prevenciu a personalizovanú terapiu
- využiť výsledky výskumu v laboratórnej praxi – menovite čipovú diagnostiku.

Spôsob realizácie predstavujú

- spolupráca s vybranými pracoviskami (špecializované ambulancie, kliniky, športové kluby)
- špecializované klinické vyšetrenia a sledovanie (vyšetrenie, monitoring a dispenzarizácia na ambulancii)
- laboratórne vyšetrenia adhézných molekúl, kardiálnych markerov, cerebrálnych markerov, cytokínov a prípadne (fertilitných markerov, tumorových markerov, tyreoidálnych markerov) na čipovom analyzátore
- doplnujúce vyšetrenia ďalších laboratórnych parametrov

DOPORUČENIA

Klinické vyšetrenia pacientov s

- degeneratívnymi neuropatiami
- aterosklerotickými komplikáciami
- diabetom
- hepatopatiami
- s cieľom identifikovať klustery klinických príznakov využiteľných v diagnostickej predikcii, cieľenej prevencii a personalizovanej terapii

Laboratórne stanovenie

- Metabolomického profilu s orientáciou na cytokíny, rastové faktory a špecifické metabolomické markery na čipovom analyzátore „Randox Evikdence Investigator“

LITERATÚRA

1. **Kováč, G., Porubená, A.:** *Laboratórna medicína - všeobecné pojmy*. Via Practica, 2008, 5, (11), 359–361.
2. **Kováč, G., Porubená, A.:** *Laboratórna medicína - základné pojmy*. Via Practica, 2008, 5 (10), 449–451.
3. **Kováč, G., Porubená, A.:** *Laboratórna medicína - špecifické pojmy*. Via Practica, 2008, 5 (12), 539–542.
4. **Kováč, G., Porubená, A.:** *Evaluation of the Quality of Clinical laboratories in the Slovak republic: conceptual and contextual remarks*. Accred Qual Assur, (2008), 13: 165–171.
5. **Kováč, G., Porubená, A.:** *Súčasný trendy určujúce vývoj v laboratórnej medicíne*. Laboratórna diagnostika v medicíne, (2008), 1, 9–12.
6. **Kováč, G., Porubená, A., Trupl, Jan, Blažiček P.:** *Je laboratórna medicína medicínsky alebo organizačný odbor?* Laboratórna diagnostika v medicíne (2008), 1, 13–14.
7. **Kováč, G., Porubená, A.:** *Quality and Privatisation of Laboratory Diagnostics in Slovakia*. Laboratórna diagnostika v medicíne, (2008), 1, 14–15.
8. **Kováč, G., Porubená, A., Blažiček, P., Trupl, J., Farkas, M., Balla, J.:** *Development, Organisation and Content of Polyvalent Medical Biophatology in Slovakia*. Clin. Chem. Lab. Med., 2008, 46, 8, A69
9. **Kováč, G., Porubená, A.:** *Biochemistry and principles of nutrition: Course for the distributors of nutritional supplements*. Vitamins, nutrition and diagnostics, 2008, 5, 123–125

POZNÁMKA

Identifikácia odborných pracovníkov

| Pracovník | Funkcia |
|--|---|
| Prof. MUDr. RNDr. Gustáv Kováč CSc MBA | Odborný garant |
| MUDr. Porubénová Anna MPH | Ambulantný lekár |
| RNDr. Slabý Blažej CSc | Manažér projektu |
| Doc. Ing. Blažiček Pavel CSc. | laboratórny pracovník – analýza cytokinómu a meabolómu na „Randox Investigator“ |
| RNDr. Baluchová Katarína PhD | laboratórny pracovník – analýza cytokinómu a meabolómu na „Randox Investigator“ |
| Prof. MUDr. Štefan Hrušovský CSc MPM SVS | Koordinátor problematiky hepatopatií a kardiovaskulárnych chorôb |
| MUDr. Katarína Černá | Koordinátor problematiky diabetu |
| Doc. MUDr. Ján Benetín CSc | Koordinátor problematiky neurodegeneratívnych chorôb |

PREDIKTÍVNA, PREVENTÍVNA A PERSONALIZOVANÁ MEDICÍNA (PPPM): INFORMÁCIE, OKOLNOSTI, AKTIVITY, PREDSTAVY

**Gustáv Kováč, Anna Porubénová, Štefan Hrušovský
Katarína Černá, Ján Benetín**

Ústav chémie, klinickej biochémie a laboratórnej medicíny,
Interná klinika, Neurologická klinika
Slovenskej zdravotníckej univerzity, Bratislava

ÚVOD

Cieľom príspevku je informovať odbornú verejnosť o informáciách, okolnostiach, aktivitách a predstavách, ktoré ÚCHKBaLM SZU v súvislosti s PPPM získal a vykonal. Máme pocit, že o tejto problematike sa na Slovensku referuje skôr v oblasti koncepcnej a organizačnej, ale chýbajú informácie o konkrétnych klinických aktivitách, resp. o problematike.

METÓDA

V príspevku sa budeme zaoberať:

- informáciami, ktoré sme za uplynulé obdobie nadobudli
- okolnosťami, s ktorými sme sa v minulosti stretli: všetky majú úzky vzťah k prediktívnej, preventívnej a personalizovanej medicíne, menovite: čipová diagnostika, POCT
- aktivitami, ktoré sme v tejto súvislosti realizovali: vypracovanie a podanie dvoch projektov
- predstavami, ktoré sme na základe vyššie uvedeného nadobudli, a na ktorých budujeme: menovite: ambulancia PPPM.

VÝSLEDKY

Informácie

Workshop o prediktívnej diagnóze, cielej prevencii a personalizovanej liečbe: 13–14 november 2008, Bruxelles riešil koncepciu PPPM a využitie:

- IT
- biotechnológii
- nanotechnológii (čipy)
- génovej terapie
- nukleových kyselín
- farmakogenomiky a farmakokinetiky
- iniciatív EU a NIH
- v/u
- profilácii pacienta
- neurodegeneratívnych chorôb
- diabetu

- kardiovaskulárnych chorôb
- rakoviny
- v reprodukčnej medicíne.

Monografia PPPM

Poskytla informácie zaoberajúce sa problematikou:

- bunkového cyklu
- nukleových kyselín
- farmakogenetiky
- degenerácie
- genovej terapie a individualizovanej medicíny
- diabetu
- Parkinsonovej a Alzheimerovej choroby
- sclerosis multiplex
- glaukómu
- neoplazií
- proteomiky
- asfyxie
- IT
- ekonomiky
- knowledge transferu
- v oblasti predikcie, prevencie a personalizácie.

Okolnosti

Čipová diagnostika: Randox Biochip Array Technology

Randox Investigator je príklad mikročipového analyzátoru, ktorý umožňuje analýzu bielkovinových markerov – adhézných molekúl, kardiálnych markerov, cerebrálnych markerov, fertilitných markerov, tumorových markerov, tyroidálnych markerov a cytokínov. Medzi markery, ktoré možno pomocou tejto technológie stanovovať patria:

- adhézne molekuly – Cellular Adhesion Molecule – 1, E selectin, L selectin, Vascular Cell Adhesion Molecule – 1
- kardiálne markery – Carbonic Anhydrase, CK MB, Fatty Acid Binding Protein, Glycogen Phosphorylase BB, Myoglobin, Troponin I
- cerebrálne markery – brain derived Neurotrophic Factor, Glial Fibrillary Acidic Protein, Heart Type Fatty Acids Binding Protein, Interleukin 6, S 100 B, CRP,
- hematologické markery – D dimer, NSE Soluble Tumor Necrosis Factor Receptor, Thrombomodulin, Von Willebrand Factor
- cytokíny - Epidermal growth factor, IL 1 alpha, IL 1beta, IL 2, IL 4, IL 6, IL 8, IL 10, Interferon.gamma, Monocyte Chemotactic Protein 1, TNF alpha, Vascular
- Endothelial growth factor, Matrix Metalloproteinase, Soluble IL 2 receptor alpha, Soluble IL 6 receptor, Soluble TNF receptor I + II
- fertilitné markery Estradiol, FSH, LH, Progesterone, Prolactin, testosterone
- tumorové markery patria CEA, fPSA, tPSA.

POCT

Využitie nanotechnológií v rámci POCT predstavuje celosvetový vývojový trend. POCT čoraz viac využívajúce

nanotechnológie predstavuje jeden z hlavných nositeľov/predstaviteľov pojmu personalizovanej laboratórnej diagnostiky. Kvalita, konektivita a regulácia sú základným predpokladom efektívneho využitia POCT v klinickej praxi. POCT (personalizovaná laboratórna diagnostika) má potenciál dobyť trh laboratórnej diagnostiky:

- v nemocnici
- na ambulancii
- doma u pacienta

lebo

- sa dá poskytovať bez komplikácií, jednoducho a pohodlne:
- netreba ísť do laboratória
- stačí kvapka krvi
- výsledok je za niekoľko sekúnd až málo minút.

Ďalšie špecifické benefity, ktorý v dôsledku miniaturizovanej analytickej techniky POCT poskytuje sú:

- zvýšená spoľahlivosť
- prenosnosť
- nízke náklady
- implantabilita („in vivo analyzátor“).

Implementácia POCT na ktorejkoľvek úrovni si vyžaduje:

- rozsiahlu prípravu
- včasné zaangažovanie všetkých zainteresovaných
- rozsiahle skúšanie
- flexibilitu a dobrú vôľu
- konektivitu LIS / HIS
- čas navyše
- výcvik a monitoring.

Condition sine qua non predstavuje nevhynutosť vypracovania národnej direktívy a jej implementácie na každej úrovni.

Aktivity

Projekt: Lipoprint, Investigator – moderné diagnostické a didaktické princípy a ich klinické aplikácie v PPPM.

Cieľom je zavedenie nových diagnostických a didaktických postupov za účelom zlepšenia zdravia a zvýšenia kvality života, čo v praxi značí zavedenie:

- inovatívnej kultúry – menovite personalizovanej diagnostiky
- výskumu orientovaného na reálne využitie jeho výsledkov - menovite čipová diagnostika a nanotechnológie
- prenosu novozískaných poznatkov do praxe: inovatívnej klinickej a metabolickej ambulancie + inovatívnej učebnice biochémie.

Východisková situácia

Región Bratislava nemá ambulanciu ani laboratórium zaoberajúcu sa komplexne prediktívnou diagnostikou, cieleňou prevenciou a personalizovanou terapiou. Cieľové skupiny: neurodegeneratívne, kardiovaskulárne ochorenia, hepatopatie a diabetes nie skúmané z vyššie uvedeného zorného uhla.

Situácia po ukončení realizácie aktivít projektu

Región Bratislava bude mať ambulanciu a laboratórium zaoberajúce sa komplexne prediktívnou diagnostikou, cieľnou prevenciou a personalizovanou terapiou. Časť pacientov z cieľových skupín bude zaradená do vyššie uvedených programov. Získajú sa dáta, z ktorých bude možné usudzovať na benefity, resp. nedostatky novej kultúry poskytovania liečebno preventívnej starostlivosti.

Spôsob realizácie projektu

- zariadenie ambulancie a laboratória (v priestoroch SZU)
- inštalácia čipového analyzátoru a elektroforézy IV generácie) podľa výberového konania
- zahájenie spolupráce s cieľovými ambulanciami: diabetologickými, neurologickými, kardiologickými, hepatologickými (FNsP Bratislava)
- klinické a laboratórne vyšetrenovanie pacientov z cieľových ambulancií a ich zaradenie do dispenzára a programu cieľnej prevencie alebo personalizovanej terapie
- vyhodnotenie výsledkov a získaných skúseností – priebežné aj záverečné.

Zdôvodnenie vhodnosti realizácie projektu

- Realizácia projektu je vhodná vzhľadom na existujúcu východiskovú situáciu v regióne Bratislava, kde absentuje infraštruktúra a liečebnopreventívny prístup orientujúci sa na prediktívnu diagnostiku, cieľnú prevenciu a personalizovanú terapiu
- Slovenská zdravotnícka univerzita a jej Ústav chémie, klinickej biochémie a laboratórnej medicíny vzhľadom na charakter a rozsah činnosti, dosiahnuté výsledky a odborný profil riešiteľov sú predpokladom, že ciele stanové v projekte budú dosiahnuté.

Udržateľnosť výsledkov projektu

- Pokračovanie projektu bude spočívať v tom, že pilotné centrum prediktívnej diagnostiky, cieľnej prevencie a personalizovanej terapie bude zaradené do siete zariadení poskytujúcich liečebno preventívnu starostlivosť a na základe získaných skúseností budú vznikať centrá aj v ďalších regiónoch.

Projekt: Vývoj nových senzorov/technológií pre prediktívnu, preventívnu a personalizovanú diagnostiku.

Cieľ

- aplikovaný výskum, nových senzorov / technológií pre prediktívnu, preventívnu a personalizovanú diagnostiku si vyžaduje okrem klasickej infraštruktúry základného výskumu aj infraštruktúru, ktorá patrí do oblasti materiálového výskumu a elektrotechniky akademických partnerov.

Firma Monogram: hlavný riešiteľ

- disponuje vybavením, ktoré pozostáva s prístrojov a zariadení v oblasti informačno-komunikačných

technológií umožňujúcich realizovať klasický výskum v oblasti riešenia systémov a vývoj nových IKT aplikácií.

Partner 1 - Slovenská zdravotnícka univerzita v Bratislave

V súčasnosti má k dispozícii laboratórium na výučbu praktík v odboroch lekárska chémia a lekárska biochémia na Slovenskej zdravotníckej univerzite, Bratislava Limbová 12, 1 poschodie, výučbová báza SZU „Inštitút laboratórnej diagnostiky“, na 3 poschodí polikliniky ProCare, Bratislava, Vlčie Hrdlo 47. V rámci projektu plánuje získať imunochemický biočipový analyzátor pre imunochemické analytické metódy, ktorý využíva biočipové technológie pre microarray analýzy proteínov, adhezívnych molekúl, cytokínov, markerov, DNA a RNA polymorfizmov. Použitie v praxi je možné pre imunologické testy (immunoassay) na diagnostické, súdne (forenzné)/toxikologické, veterinárne a farmaceutické účely. Podľa súboru testov, meranie do 23 látok v jednej vzorke, do 162 biočipov za hodinu.

Partner 2 - Elektrotechnický ústav SAV

Má k dispozícii:

- aparátúra pre prípravu polovodičových heteroštruktúr
- aparátúra pre prípravu oxidových vrstiev
- aparátúra pre rýchle žihanie do 1200 °C, 250 °C/s v kontrolovanej atmosfére
- kombinovaný systém pre vákuové napařovanie a napařovanie Aja Int.
- optická a elektrónová litografia v čistých priestoroch triedy 10 000
- meranie kapacitno-napätových a prúdovo-napätových charakteristík terminálových polovodičových súčiastok, transportné merania tranzistorov
- transportné merania supravodičov pri nízkych teplotách v silných magnetických poliach do 14 T.

Partner 3 - Ústav informatiky SAV

ÚI SAV je dlhoročným prevádzkovateľom vysoko výkonnej výpočtovej infraštruktúry, ktorá je sústavne aktualizovaná a má veľký potenciál pre využitie pri riešení náročných výpočtových úloh v oblasti životného prostredia.

Predstavy

Ambulancia PPPM

Oblasť uplatniteľnosti výsledkov projektu v hospodárskej a spoločenskej praxi predstavuje činnosť pilotnej metabolomickej ambulancie a metabolomického laboratória, ktoré prediktívnu klinickú a laboratórnou diagnostikou identifikuje pacientov z množiny neurodegeneratívnych a kardiovaskulárnych chorôb, diabetu a hepatopatií a zaradi ich do programu cieľnej prevencie a personalizovanej terapie. Nová liečebnopreventívna kultúra zvýši kvalitu a efektívnosť poskytovania zdravotníckej starostlivosti tým, že sa zameria cieľne na preventívne opatrenia a personalizovanú terapiu, čím zvýši účinnosť výstupov

zdravotných (vyššie zdravie/zabránenie vzniku choroby resp. potlačenie jej príznakov) ako aj ekonomických (zníženie nákladov na liečbu). Bude pritom závisieť od počtu:

- vyšetrených pacientov
- pacientov zaradených do preventívnych programov
- pacientov podrobených personalizovanej terapii
- čo predstavuje multiplikačný efekt v oblasti nepriamych vplyvov na
- socio-ekonomické prostredie vrátane
- vplyvu na
- zdravie obyvateľstva
- zlepšenie kvality života.

DISKUSIA

K workshopu PPPM EU Bruseli

Workshop v 2008 bol pre nás milníkom v zmysle vstupu do novej oblasti, oboznámenia sa s novými prístupmi a vytvorení osobných kontaktov s ich nositeľmi a stakeholdrami.

K čírovej diagnostike

Chceme zdôrazniť našu viacročnú spoluprácu s firmou Randox, ktorá začala v oblasti externej kontroly kvality a rutínnej biochemickej diagnostiky, a ktorá sa postupne preklonila do oblasti hľadania foriem zavedenia a využitia biočipového analyzátoru v klinicko-ambulantej praxi, pre ktorú hľadáme v súčasnosti optimálny modus. Čipová diagnostika je resp. Využitie nanotechnológií v klinicko-laboratórnej praxi predstavuje významný krok k personalizácii (laboratórnej) medicíny.

K POCT

V oblasti POCT máme rozpracované dva projekty jej využitia v nemocničnej a ambulantej praxi. Ako bolo uvedené vyššie POCT rovnako ako čipová diagnostika predstavuje významný nástroj personalizácie (laboratórnej) medicíny.

K projektu: Lipoprint, Investigator - moderné diagnostické a didaktické princípy a ich klinické aplikácie v PPPM

Napriek vynaloženému úsiliu a námahe, ktoré si vyžaduje vypracovanie EU projektu so všetkým čo s tým súvisí, projekt výberovým konaním. Bez ohľadu na to sa snažíme pokračovať vo vytýčenom smere - samozrejme s podstatne menšími možnosťami a pomalším tempom.

K projektu: Vývoj nových senzorov/technológií pre prediktívnu, preventívnu a personalizovanú diagnostiku

Projekt je podaný a vo výbereovom konaní. V súčasnosti čakáme na jeho výsledok

K ambulancii PPPM

Máme vytvorené priestorové a personálne predpoklady, ako aj vybudovanú časť kontaktov a vzťahov na zabezpečenie jej fungovania. Limitujúcim faktorom, ktorý ju bude odlišovať od „klasickej“ ambulantej starostlivosti bude miera využitia POCT a čírovej diagnostiky zabezpečujúcej promptosť (okamžitosť) laboratórnej diagnostiky.

ZÁVER

- Workshop PPPM EU v Bruseli koncom roka 2008 vymedzil pojem prediktívnej, preventívnej a personalizovanej medicíny
- Čipy a POCT zvyšujú mieru personalizácie
- Projekt „Lipoprint a Randox Investigator - moderné diagnostické a didaktické princípy a ich klinické aplikácie v PPPM“ bol prvým (zatiaľ neúspešným) pokusom implementovať do klinickej praxe ucelenú predstavu adaptovanú na naše pomery
- Projekt „Vývoj nových senzorov/technológií pre prediktívnu, preventívnu a personalizovanú diagnostiku“ (t. č. vo výberovom konaní) konsolidoval predstavu v oblasti spolupráce vo vývoji nových technológií za asistencie/podpory kliniky.
- Ambulancia PPPM predstavuje pokus o implementáciu vybraných prvkov predikcie, prevencie a personalizácie do klinickej praxe u vybraných chorôb.

DOPORUČENIA

- Budovať na poznatkoch postulovaných v monografii PPPM
- Implementovať do diagnostiky čipový analyzátor Randox Investigator
- Definovať a vybudovať ambulantnú POCT zostavu (oboje za účelom zvýšenej miery personalizácie ambulantej diagnostiky)
- Využiť poznatky a skúsenosti získané v procese vypracovania a podávania výskumných projektov v budúcnosti
- Rozvinúť činnosť ambulancie PPPM na základe spolupráce so špecializovanými ambulanciami a využívaním čírovej a POCT diagnostiky.

POZNÁMKA

Osobitnú oblasť kľúčového významu predstavuje bioinformatika, ktorou sme sa v tejto prezentácii zaoberali len veľmi okrajovo.

VALIDATION OF THE PREDICTIVE MARKERS - STATE OF THE ART

Kurt Krapfenbauer^{1, 2}

¹Department of Cranio-Maxillofacial and Oral Surgery, Medical University of Vienna, Waehringer Guertel 18–20, Vienna, Austria

²European association for predictive, preventive & personalized medicine, Brussels, EPMA headquarters, Woluwe-Saint-Pierre, avenue des Mimosas, 1150 Brussels, Belgium

e-mail: Kurt.krapfenbauer(at)boehringer-ingelheim.com, Krapfenbauer(at)epmanet.eu

ABSTRACT

Biomarkers are used for various purposes, including disease diagnosis and prediction, prognosis, safety assessment and assessment of treatment response. The ability of biomarkers to improve treatment and reduce health-care costs is potentially greater than in any other area of current medical research. For example, the American Society of Clinical Oncology estimates that routinely testing people with colon cancer for mutations in the K-RAS oncogene would save at least US\$600 million a year [1]. Thousand of papers have been written, but few too clinically useful biomarkers have been validated for routine clinical practice [2]. Major impediment for routine clinical practice of biomarkers is a) the lack of standardization in how specimens are collected for clinical trials and the lack in characterization how biomarkers are selected for further clinical validation. Each of these details is rarely documented and can dramatically affect the predictive outcome of biomarkers results. However the selection of biomarkers must be carefully assessed and depends on different important parameters such on sensitivity (= it should correctly identify a high proportion of true-non cases), sensitivity (= it should correctly identify a high

proportion of true cases), and predictive value etc.. Unfortunately, biomarkers with ideal specificity and sensitivity are difficult to find. One potential solution is to use the combinatorial power of a large number of different biomarkers, each of which alone may not offer satisfactory in specificity. Beside traditional immuno assays such as ELISA, recent technological advances in proteinchip- and multiplex-technology offer a great opportunity for simultaneous analysis of a large number of biomarkers in a single experiment, which has expanded at a rapid rate in the last decade. However, although many significant results have been derived, one limitation has been the lack of characterisation and validation such technology. Beside the technical characterization, it needs also quality requirements in correct characterization of the predictive value of biomarkers. In order to overcome these limitations we set up recommendations, a short proposal as well as minimum information about a variety of bioanalytical experiment that describes the minimum information required to ensure that the technical performance as well as the predicted value of biomarkers is correct. We outlined a number of key issues in research, development and clinical trial studies, including those associated with experimental design, analytical validation strategies, and analytical completeness and data managements. This guideline should serve us with a set of criteria which will help us to use it for carrying on to a high quality data project. Improvements in the quality outcomes are important, because without requirements in this standardization and validation, the interpretation of the results as well as the direct comparisons of the predictive value of biomarkers between different research labs or clinical trial studies is not possible. With respect to EPMA, we try to focus on defining the content and structure of the necessary information for the correct prediction of predictive biomarkers as well as for a correct performance of characterisation and validation.

1. Tallent, A.: *Advances in the Treatment of Gastrointestinal Cancers*. American Society of Clinical Oncology, January 13, 2009.
2. Poste, G.: *Nature*; 13 January 2011, Vol 469, 156–157.

KOLKO CHORÝCH JE UŽ MÁLO, ABY BEŽAL BIZNIS V ZDRAVOTNÍCTVE? - EKO- NOMICKO-ETICKÉ DILEMY ZDRAVOTNEJ STAROSTLIVOSTI.

Ján Lepej^{1,3}, Katarína Lepejová²

¹ Inštitút nukleárnej a molekulárnej medicíny, Košice

² Roche Slovensko s.r.o., Bratislava

³ Ústav sociálnych vied a zdravotníctva P.P.Gojdiča,
VŠZaSP sv Alžbety, Prešov

Hlavným poslaním zdravotníctva pri jeho vzniku bola služba chorému, trpiacemu človeku. Situácia sa však výrazne zmenila s príchodom modernej spoločnosti žijúcej v nadbytku. Od liečenia ochorení a rôznych neduhov sme sa v priebehu druhej polovice 20. storočia dostali k preventívnej starostlivosti o svoje zdravie. Definícia WHO definuje zdravie ako stav kompletnej fyzickej, duševnej a sociálnej pohody a nielen ako stav neprítomnosti choroby. Podľa tejto definície by však bolo chorých 75–90 % populácie a vo veku nad 50 rokov by snáď nebol zdravý nikto. Pre niektoré krajiny sa to zdá byť nespĺniteľná podmienka. Najnovšie sa zdravie považuje za „investíciu“ a cez prizmu peňazí sa na zdravotnú starostlivosť aj dívame. Stávame sa závislí na zdravotnej starostlivosti. Lekára vyhľadávame aj v prípadoch, keď by sme si vedeli poradiť aj sami. Ale na druhej strane, pre naše pracovné vyťaženie, alebo zo strachu, chodíme k lekárovi až pri vážnych príznakoch, v pokročilých štádiách ochorení. Čo zdravotne trápi jedného, vôbec nemusí prekážať inému človeku. Často nenachádzame optimálnu odpoveď na to, koho je potrebné liečiť a koho nie. Situácia sa od čias nielen Moliérovho „zdravého nemocného“, ale aj našich otcov, zásadne zmenila. Zdravotníctvo samé sa stalo motorom pre vývoj vedy a technológií a prispelo k rozvoju mnohých priemyselných odvetví. Zo zdravotníctva sa stal obchod. Náklady na zdravotnú starostlivosť rastú rýchlejšie ako HDP takmer vo všetkých krajinách, bez ohľadu, či prijali DRG systém financovania. Podľa zahraničných zdrojov vzostup nákladov na diagnostiku je rýchlejší ako v ostatných oblastiach, pričom vedie zobrazovacia a za ňou hneď nasleduje laboratórna diagnostika, ktorá tvorí len asi 2 % výdavkov. Žiaden pacient si neželá lacné zdravotníctvo a žiadny občan sa neteší zo zvyšovania daní či poplatkov do zdravotných poisťovní. Každý dobrý investor, či podnikateľ, rád vloží peniaze do rezortu, kde nehrozí kríza z nadvýroby. To, že sa jedná o veľmi efektívny systém na investovanie možno doložiť faktom, že každé predĺženie veku vyvoláva následne vzostup nákladov, hlavne u chronicky chorých. V mnohých prípadoch liečba týchto pacientov je veľmi nákladná a často je veľký problém rozhodnúť o jej ukončení. Existujú síce odborné odporúčania o liečbe ochorení, ale vychádzajú

z amerických alebo európskych guidelines – z krajín s podstatne vyšším HDP na obyvateľa. Náklady na zdravotnú starostlivosť na jedného obyvateľa sa medzi krajinami sveta veľmi líšia. V roku 2009: od 3 US\$ (Kongo) po 8 183 US\$ (Luxembursko). V príspevku analyzujeme vybrané príklady z krajín, ktoré majú nejaký vzťah k našim podmienkam. Ukazuje sa, že optimálne výsledky nezávisia len od výšky nákladov do zdravotníctva, ale aj od mnohých iných faktorov. Aj keď veľmi dôležité sú dobré stravovacie a životné návyky, zdravé životné prostredie bez nebezpečných vplyvov a vysoká miera všeobecnej vzdelanosti, významný podiel má práve systém zdravotníckej praxe. Na príklade dvojíc krajín USA vs Veľká Británia a SR vs ČR poukazujeme na význam zdravotníckej politiky. Z našej analýzy vyplýva, že dolná hranica optimálnych nákladov je 2000 € na osobu a rok. Vyššie náklady majú rôzne príčiny, ale zásadne neprispievajú k zvyšovaniu základných ukazovateľov zdravotného stavu populácie, ako sú odhadovaná dĺžka života, chorobnosť alebo úmrtnosť na niektoré ochorenia alebo vo vybraných vekových skupinách. Jeden z hlavných faktorov sú okrem technologickej náročnosti aj mzdy zdravotníckeho personálu. Otázka na záver, je to s ekonomikou v zdravotníctve u nás naozaj tak zlé? Iste nikto nepovie NIE. Zaujímavý paradox nielen z nášho zdravotníctva je, že výkony v odboroch, ktoré môžeme považovať za „kozmetické“ prinášajú veľké zisky (a pracovníci sú dobre zaplatení). Naopak odbory, kde často visí život človeka na vlásku, sa dostávajú do veľkých dlhov. Odpovedí na otázku, prečo niektoré zdravotnícke zariadenia fungujú a iné robia dlhy, je príliš veľa. Ale zhrnúť ich možno do jediného slova, ktoré by malo byť hlavným mottom zdravotníckych pracovníkov – ZODPOVEDNOSŤ! Zodpovednosť za svojich chorých je to, čo chýba: ministerstvu a poisťovniám, ktoré za 20 rokov nedospeli k systému spravodlivého oceňovania výkonov. Farmaceutickým korporáciám, ktoré vytvárajú ceny liekov nedostupné pre niektoré populácie. Zdravotníckym pracovníkom, ktorí nevyužívajú dostatočne svoje schopnosti. Finančným skupinám, ktorým je zisk prednejší ako kvalita. Na Labkvalite stále pripomíname, že pre dosiahnutie maximálnej kvality je vždy nevyhnutná kontrola. Hodnotenie spokojnosti pacientov je len malá (niekedy aj nepodstatná) časť kontroly. Veď keď pacient príde do pekného zdravotníckeho zariadenia ešte nemusí byť dobrý (aj v peknej banke vás dokážu obrať o peniaze). My, laboratórni pracovníci, si roky rozprávame o kvalite. V mnohom sa nám ju darí naplniť, v niečom nie. Stav sa v mnohom roky zlepšoval. Dnes pre chamtivosť niekoľkých dochádza k zhoršovaniu kvality (nielen predanalytickej fázy) a tak k poškodeniu mnohých. Ale poznáme aj odbornosti, kde kvalitu výstupu merať nevedia, ale sa o to ani nesnažia. Práve kvalita našej práce je hlavnou požiadavkou, nielen morálnou výzvou, ale aj faktorom, ktorý prispieva k zlepšeniu ekonomiky zdravotníctva a hlavne bezpečnosti starostlivosti o pacienta.

**LABKVALITA 2011
TRACEABILITY IN ROUTINE
CLINICAL CHEMISTRY - STATING
OR DEMONSTRATING?**

Solveig Linko

Joint Authority for the Helsinki
and Uusimaa Hospital District
HUSLAB

Laboratory medicine as a chemical testing field deals with biological samples from human beings, sometimes considered somewhat different from other types of measurements performed in chemical laboratories. In fact laboratory medicine is one important speciality among other important fields such as forensic, food or environment testing. Regardless of the specialty chemical testing have the same targets: assuring the reliability of the results for reasonable decision making and improving the traceability to SI for better comparability. Applying the principles chemical metrology also in clinical chemistry is a necessity for reaching these targets.

All measurements follow decision making to some extent and it has been calculated that the value of products with measurement results in industrialized countries is at least half of the gross domestic product (GDP). Chemical measurements, including laboratory medicine testing, cover roughly 50 % of all measurements. Therefore improving reliability has great financial importance. Demonstrating the traceability is needed and the value

of measurement results without a known uncertainty is questionable. In 2010 HUSLAB produced ca. 16 million clinical chemistry and haematology test results. On the top 20 list were 70 % of all results. Nearly six million reports were given as accredited (ISO 15189) concerning 12 laboratory tests on the HUSLAB top 20. Demonstrating the traceability for these tests (and many others under the scope of HUSLAB competence) is required.

During the last two decades competent measurements, traceability and knowledge of accuracy of the measurements in laboratory medicine have been emphasized in context with the IVD Directive 98/79/EC. The directive concerns with the diagnostic products' manufactures while the end-users need to demonstrate the competent results. Traceability is a common denominator for both parties and also for the organizers of inter-laboratory comparisons. The IVD directive requires that the traceability and uncertainty of calibrators and controls is described and documented. This data should be available for the end-users.

The Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine, **JCTLM was established between** the International Committee of Weights and Measures (**CIPM**), the International Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (**IFCC**), and the International Laboratory Accreditation Cooperation (**ILAC**). The essential goal of the JCTLM is to provide a worldwide platform to promote and give guidance on internationally recognized and accepted equivalence of measurements in laboratory medicine and traceability to appropriate measurement standards. Improving the comparability of the laboratory results continues.

VPLYV BIOAKTÍVNEHO KOMPLEXU KVERCETÍNU, SELÉNU, KATECHÍNOV A KURKUMÍNU NA VYBRANÉ PARAMETRE KARDIOVASKULÁRNEHO RIZIKA

Jana Máleková, Alexander Maďarič, Jana Kdrabová,
Marica Kudláčková, Igo Kajaba, Csilla Mišlanová,
Viera Spustová, Pavel Blažíček, Martina Valachovičová

Slovenská zdravotnícka univerzita v Bratislave

Mnohé výskumné štúdie čoraz viac dokazujú súvislosti medzi potravinami, ich zložkami a ich jednotlivými účinkami na zdravie. Jedným z posledných trendov sú funkčné potraviny, ktorých konzumácia má pozitívny vplyv ako na duševný, tak aj na fyzický stav organizmu a zároveň môže znižovať ohrozenie rôznymi civilizačnými ochoreniami. Zdravá výživa a správne stravovacie návyky sú hlavným piliérom zdravého spôsobu života. Prostredníctvom správne upravenej stravy a výberu zdraviu prospešných potravín je možné viacerým ochoreniam priamo predchádzať ako aj zmiernovať prejavy ochorení, ktoré sú geneticky podmienené (Štefková *a kol.*, 2010; Kajaba *a kol.*, 2007). Nakoľko preventívne pôsobenie výživy zahŕňa antiaterogénne, antitrombotické, protizápalové, imunomodulačné, HDL-cholesterol stabilizujúce, antiobezitogénne, antidiabetogénne (pri DM 2. typu) a antionkogénne účinky, výživou je možné predchádzať najmä kardiovaskulárnym ochoreniam (ateroskleróza, hypertenzia, hypercholesterolémia), onkologickým ochoreniam (rakovina hrubého čreva, konečníka, pankreasu, prostaty), diabetu mellitu 2. typu a obezite (Kajaba *a kol.*, 2007; Kajaba *a kol.*, 2006). Funkčná potravina je taká potravina, ktorá je obohatená o určitú aktívnu zložku a okrem svojej nutričnej hodnoty má aj pozitívny vplyv na zdravie, fyzickú výkonnosť alebo duševný stav. Tieto potraviny predstavujú akýsi medzistupeň medzi „obyčajnými“ potravinami a liekmi. Na rozdiel od liekov môžu mať v organizme širšie spektrum pôsobnosti bez vedľajších nežiadúcich účinkov, no sami o sebe neliečia, pretože ich cieľom je ovplyvňovať prechodný stav medzi chorobou a zdravím posilňovaním obranných mechanizmov alebo napomáhaním procesu uzdravovania. Mali by sa teda konzumovať preventívne, aby ku vzniku konkrétnej choroby nedošlo. Funkčné potraviny tiež neriešia nedostatok určitej potrebnej zložky výživy a nemožno nimi nahradiť ostatné zložky jedálnička (Jurkovičová, 2005). Ich pravidelnou konzumáciou možno doceliť rôznorodé pozitívne účinky na organizmus, pretože podporujú imunitný systém, odďaľujú príznaky stárnutia, ovplyvňujú vývin a funkcie nervového systému, pomáhajú pri znižovaní telesnej hmotnosti, regulácii koncentrácie cukru v krvi, pri znižovaní hladiny cholesterolu. Podporujú tiež funkciu gastrointestinálneho traktu a ich pozitívny vplyv sa využíva aj v prevencii

kardiovaskulárných a onkologických ochorení (Šimko, 2006). Funkčné potraviny, ktorých prínos pre zdravie je dostatočne vedecky zdôvodnený a podporený vedcami, majú potenciál stať sa dôležitou súčasťou zdravého životného štýlu a byť prospešné ako pre verejnosť, tak aj pre potravinársky priemysel (Hasler, 1998).

V štúdiu sme sa zaoberali vplyvom bioaktívneho komplexu kvercetínu, selénu, katechínov a kurkumínu na vybrané kardiovaskulárne parametre. Súbor tvorilo 50 mužov, nefajčiarov vo vekovom rozpätí 30 až 50 rokov. BMI $26,5 \pm 0,5$ kg/m², WHR $0,887 \pm 0,008$, percento telesného tuku $23,1 \pm 0,8$, krvný tlak $138 \pm 2/83 \pm 1$ mm Hg (priemer \pm SEM); hodnoty boli štandardne namerané alebo vypočítané. Všetci probandi boli subjektívne zdraví, t. z. bez kardiovaskulárneho, onkologického ochorenia, diabetu, ochorenia obličiek, tráviaceho traktu a štítnej žľazy. Probandom bola podávaná funkčná potravina v podobe bioaktívneho komplexu kvercetínu, selénu, katechínov a kurkumínu s významnými antioxidačnými, antiinflamačnými, antisklerotickými a ďalšími ochrannými vlastnosťami (Maďarič *a kol.*, 2005). Probandi konzumovali funkčnú potravinu počas 2 mesiacov v dennej dávke 100 g (v podobe sušienky obsahujúcej selenizovanú sušenú cibuľu (6 g), zelený čaj (2 g) a kurkumu (1,3 g)). Krv bola odoberaná nalačno štandardným spôsobom. Sérové koncentrácie celkového cholesterolu a HDL-cholesterolu boli merané pomocou štandardných laboratórnych postupov. Hodnota LDL-cholesterolu sa vypočítala podľa vzorca Friedewalda: LDL-cholesterol = celkový cholesterol - triacylglyceroly/2,2 - HDL-cholesterol. Aterogénny index = LDL-cholesterol/HDL-cholesterol. Probandi neboli počas štúdie suplementovaní vitamínmi ani minerálnymi látkami. Štúdia bola realizovaná v jesennom období, hodnotené 2-mesačné vysadenie konzumácie pripadlo na zimné obdobie. Pri štatistickom vyhodnotení bol použitý Studentov *t*-test na porovnanie výsledkov pred konzumáciou sušienky, po 2 mesiacoch konzumácie a po ďalších 2 mesiacoch bez konzumácie funkčnej potraviny.

Dostatočný príjem potravín bohatých na vlákninu je spojený s nižším rizikom kardiovaskulárných ochorení, rozpustná a nerozpustná vláknina znižuje koncentrácie celkového cholesterolu a LDL-cholesterolu. Analýza 10 prospektívnych štúdií (s použitím viac než 336 000 osôb) v USA i Európe ukazujú, že nárast príjmu vlákniny o každých 10 g/deň bolo spojené so 14 % znížením (relatívne riziko RR = 0,86) všetkých srdcových príhod a 27 % poklesom (RR = 0,73) koronárneho rizika smrti (Errkila *a kol.*, 2008). Flavonoidy vykazujú biologickú aktivitu vrátane antialergických, protizápalových, protivírusových, protinádorových a vazodilatačných účinkov. Dostatočný príjem bioaktívnych látok a ich prítomnosť vo funkčných potravinách prispieva k aktívnej ochrane voči chronickým degeneratívnym ochoreniam. Flavonoly, špeciálne kvercetín, inhibuje oxidáciu LDL-cholesterolu, znižuje pôsobenie zápalových markerov (Perez-Vizcaino *a kol.*, 2010). Kvercetín vykazuje antihypertenzívne a antiaterogénne účinky, chráni pred ischemickým po-

škodením myokardu. Zvýšený príjem selénu môže znížiť kardiovaskulárne riziko redukciami lipidovej peroxidácie, inhibuje zápal (Ravn-Haren, 2008). Vysoký obsah polyfenolov bol zaznamenaný v kurkume. Extrakt z kurkumy má protizápalové, imunostimulačné, antikarcinogénne a antisklerotické účinky (Miquel *a kol.*, 2002). Kurkumový extrakt v množstve 200 mg podávaný po dobu 45 dní výrazne znížil lipidovú peroxidáciu u zdravých mužov vo veku 27 až 67 rok (Ramírez-Boscá *a kol.*, 1995). V ďalšej štúdii podobná dávka extraktu z kurkumy spôsobila zníženie HDI a LDL-peroxidov o 25–50 % (Ramírez-Boscá *a kol.*, 1997).

Tab. 1. Koncentrácie celkového, HDL-, LDL-cholesterolu a hs-C-reaktívneho proteínu a hodnoty aterogénneho indexu

| parametre | pred konzumáciou (1) | po 2-mesačnej konzumácii (2) | 2 mesiace po vysadení konzumácie (3) |
|------------------------------|----------------------|------------------------------|--------------------------------------|
| Celkový cholesterol (mmol/l) | 5.17±0.14 | 4.96±0.13* | 5.14±0.13 [^] |
| HDL cholesterol (mmol/l) | 1.25±0.04 | 1.26±0.04 | 1.11±0.03*** ^^ |
| LDL-cholesterol (mmol/l) | 3.18±0.12 | 2.90±0.11** | 3.18±0.12^^ |
| Aterogénny index LDL/HDL | 2.64±0.13 | 2.38±0.12* | 3.18±0.12*** ^^ |
| hsC-reaktívny proteín (mg/l) | 1.91±0.22 | 1.71±0.21 | 1.99±0.25 |

Výsledky sú vyjadrené ako priemer ± SEM

* - (2), (3) vs. (1); * - P < 0.05; ** - P < 0.01; *** - P < 0.001;

[^] - (3) vs. (2); [^] - P < 0.05; ^{^^} - P < 0.001

Stanovené dáta udávajú zlepšenie lipidového profilu po konzumácii funkčnej potraviny (tab. 1). Koncentrácia celkového cholesterolu a LDL-cholesterolu, rovnako ako hodnota aterogénneho indexu boli významne znížené po 2-mesačnej konzumácii funkčnej potraviny. Avšak 2-mesiace po vysadení konzumácie sa hodnoty celkového a LDL-cholesterolu vrátili ku hodnotám pred konzumáciou (tab. 1). U jedincov s prevládajúcim príjmom rastlinných potravín sa výrazne znížili hodnoty hsCRP oproti všeobecnej populácii (Krajčovičová-Kudláčková a Blažiček, 2005; Szeto *a kol.*, 2004), v dôsledku dostatočnej a pravidelnej konzumácie ovocia a zeleniny, ktoré sú bohatým zdrojom salicylanov a iných protizápalových látok (Lawrence, 2003). Tieto zlúčeniny sú obsiahnuté v cibuli a taktiež v kurkume. Po konzumácii funkčnej potraviny bolo zaznamenané nesignifikantné zníženie koncentrácie hs-CRP (tab. 1). Dva mesiace po vysadení konzumácie sa hodnota hs-CRP znova dostala na úroveň hodnoty pred konzumáciou.

Vyvinutá funkčná potravina – cibuľová selenizovaná sušienka s prídavkom zeleného čaju a kurkumy má významné antisklerotické účinky, čo dokazujú významne redukované hodnoty celkového a LDL-cholesterolu v krvi probandov ako aj redukovaná hodnota aterogénneho indexu po 2-mesačnej konzumácii. K zlepšenému lipidovému profilu mohol prispieť aj sušienkou konzumovaný tuk, ktorý obsahoval 40 % mono- a polynenasýtených mastných kyselín; konkrétne sušienka obsahovala 6,7 % kyseliny olejovej, ktorá znižuje LDL-cholesterol, ale šetrí (nezníža) HDL-cholesterol. Pravdepodobne preto zostala koncentrácia HDL-cholesterolu tesne po konzumácii sušienky nezmenená oproti hodnote pred konzumáciou. Významne znížená HDL-cholesterol koncentrácia po 2-mesačnom vysadení konzumácie sušienky pravdepodobne súvisí s výrazne redukovanou fyzickou aktivitou probandov v zimnom období.

LITERATÚRA

1. Erkkila, A., DeMello, V.D., Riserus, U., Laaksonen, D.E.: *Dietary fatty acids and cardiovascular disease, an epidemiological approach*. Progr. Lipid Res., 2008; 47: 172–187.
2. Hasler, C.M.: *Funcional food- their role in disease prevention and health promotion*. In Food Technology. ISSN 1557–4571, 1998, vol. 52, no. 2, p. 57–62.
3. Jurkovičová, J.: *Vieme zdravo žiť?* Bratislava: Univerzita Komenského, 2005. 165 s. ISBN 80-223-2132-X.
4. Kajaba, I. *a kol.*: *Perspektívy prevencie výživou u obyvateľstva v 21. storočí*. In Životné podmienky a zdravie. Bratislava: ÚVZ SR, 2007. ISBN 978-80-7159-166-5. s. 142.
5. Kajaba, I. *a kol.*: *Prevencia výživou a telesnou aktivitou u osôb stredného veku*. In Životné podmienky a zdravie. Bratislava: ÚVZ SR, 2006. ISBN 80-7159-160-2. s. 136–140.
6. Krajčovičová-Kudláčková, M., Blažiček, P.: *C-reactive protein and nutrition*. Bratislava Med J, 2005; 106: 345–347.
7. Lawrence, J.R., Peter, R., Baxter, G.J.: *Urinary excretion of salicylic and salicylic acids by non-vegetarians, vegetarians and patients taking low dose aspirin*. J. Clin. Pathol., 2003; 56: 649–650.
8. Maďarič, A., Kadrabová, J.: *Cereálne potraviny vysokobohatené o cibuľové a iné rastlinné polyfenoly a vlákniny*. Úžitkový vzor č. 4137, 2005.
9. Miquel, J., Bernd, A., Sempere, J.M., Díaz-Alperi, J., Ramírez, A.: *The curcuma antioxidants: pharmacological effects and prospects for future clinical use*. Arch. Gerontol. Geriatr., 2002; 34: 37–46.
10. Perez-Vizcaino, F., Duarte, J.: *Flavonols and cardiovascular disease*. Mol. Aspects Med., 2010; 31: 478–494.
11. Ravn-Haren, G., Bugel, S., Krath, B.N., Hoac, T., Staged, J., Jorgensen, K., Bresson, J.R., Larsen, E.H., Dragsted, L.O.: *A short-term intervention trial with selenate, selenium enriched yeast and selenium enriched milk: Effects on oxidative defence regulation*. Br. J. Nutr., 2008; 99: 883–892.

12. Ramírez-Boscá, A., Soler, A., Carrión-Gutiérrez, M. A., Laborda-Alvarez, A., Quintanilla-Almagro, E.: *Antioxidant curcuma extracts decrease the blood lipid peroxide levels of human subjects*. Age, 1995;18: 207–210.
13. Ramírez-Boscá, A., Carrión-Gutiérrez, M. A., Soler, A., Puerta, C., Díaz, A., Quintanilla, E., Bernd, A., Miquel, J.: *Effects of the antioxidant turmeric on lipoprotein peroxides: implication for the prevention of atherosclerosis*. Age, 1997; 20: 165–168.
14. Szeto, Z. T., Kwok, T. C., Benzie, I. F.: *Effect of a long-term vegetarian diet on biomarkers of antioxidant status and cardiovascular disease risk*. Nutr., 2004; 20: 863–866.
15. Šimko, P.: *Funkčné potraviny – charakteristika, súčasný stav a trendy ďalšieho rozvoja*. In *Pediatrica pre prax*. ISSN 1336-8168, 2006, roč. 7, č. 2, s. 20.
16. Štefková, G., Bernasovská, K., Bernasovská, G.: *Výživa, fajčenie, alkohol – sledované determinanty zdravia v primárnej zdravotnej starostlivosti*. In *Životné podmienky a zdravie*. Bratislava: ÚVZ SR, 2010. ISBN 978-80-7159-176-4. s. 97–100.

PERSONALIZOVANÁ DIAGNOSTIKA Z POHLADU PATOLÓGA

František Ondriaš, Iveta Mečiarová
Jana Rampalová

Diagnostické centrum Ružinov
Alpha medical patológia s.r.o, Bratislava

Snaha po personalizácii terapie je nepochybne jednou z často diskutovaných tém mnohých vedeckých či pracovných podujatí. Bolo by vytrhnutím z logického kontextu, keby sa v rovnakom duchu nevyvíjali aj snahy v oblasti diagnostických aktivít. V procese rutínnej diagnostiky hrá podnes bioptická patológia často nezastupiteľnú úlohu.

Morfologická diagnostika, podobne ako aj iné medicínske, či laboratórne disciplíny, prekonáva v posledných desaťročiach zásadné zmeny. Odohrávajú sa nielen v oblasti nových možností základného spracovania biologických materiálov, ale najmä v oblasti zobrazovacích možností a tým aj objektivizácie detailného bioptického hodnotenia.

Na rozdiel od výlučne „laboratórných“ diagnostických oblastí si odbor patológie podržal svoje podstatné špecifiká, aj s vylúčením jeho nekroptických aktivít. Je nutné si uvedomiť, že biopticko – cytologické pracoviská pracujú v dvojfázovom režime, kde len spracovanie biologických materiálov a vytvorenie konečného produktu, t. j. histologického či cytologického preparátu má atribúty typickej laboratórnej prevádzky. Vlastná medicínska mikroskopická diagnostika je výlučne intelektuálny proces, ktorého konečným produktom je detailný bioptický nález. Ide často o obsiahly textový elaborát s definovanými normatívmi. Bioptická diagnóza je často prvou, určujúcou a definitívnou diagnózou, ktorá prejedikuje často závažné formy terapie. Okrem priameho efektu na terapiu sa v súčasnosti vyžaduje, aby diagnostikujúci odborník zaujal fundované stanovisko k prognostickým aspektom, alebo ich priamo ovplyvnil. Bezprostredné efekty vidíme najmä v oblasti diagnostiky nádorových ochorení.

Dosiahnuť takto vyžadovaný stav nie je v súčasnosti možné bez využitia všetkých dostupných diagnostických postupov. Kvalitná bioptická diagnostika nie je mysliteľná bez využitia špičkových produktov tak v oblasti prístrojového vybavenia, či v oblasti vysoko špecializovaných nastavbových farbiacich metódik. Enzymatické, histochemické, imunohistochemické a in situ hybridizačné metodiky sú v súčasnosti nevyhnutné na splnenie odborných požiadaviek klinických partnerov.

Pri naplňaní pojmu personalizácie mikroskopickej diagnostiky sú v súčasnosti podstatné dve základné línie:

- a) dosiahnutie maximálnej diagnostickej precíznosti najmä v oblasti definovania histogenézy, stágingu a gradingu malígnych nádorov,
- b) morfológická diagnostika v oblasti stanovovania terapeuticky významných biomarkerov.

SOUČASNOST A BUDOUCNOST KARDIOMARKERŮ

Radek Pudil

I.interní kardiologická klinika
Lékařská fakulta Univerzity Karlovy
Fakultní nemocnice Hradec Králové
Česká republika

Stanovení srdečních troponinů a natriuretických peptidů se stalo součástí běžné klinické praxe. Zatímco srdeční troponiny jsou považovány za zlatý standard pro průkaz myokardiální nekrózy, natriuretické peptidy jsou využívány při posuzování přítomnosti a tíže srdečního selhání. Stanovení obou markerů má navíc prognostický význam. V oblasti srdečních troponinů se začínají v klinické praxi používat vysoce senzitivní metody (hs metody), které poprvé umožňují stanovit 99.percentil. Jejich stanovení s sebou přináší nejenom výhody (včasnější diagnostika akutního koronárního syndromu, stratifikace rizika i u ostatních onemocnění, jako je například embolizace do plic a podobně), ale i zatím ne zcela zodpovězené otázky (zvýšení hladiny troponinů nekardiální etiologie). Evropská kardiologická společnost na základě dostupnosti využití vysoce senzitivních troponinů vytvořila první tzv. rule out protokol pro diagnózu akutního koronárního syndromu.

Vzhledem k tomu, že bolesti na hrudi patří mezi nejčastější diagnózy v emergentní medicíně, hledají se také další způsoby, kterými lze zpřesnit a urychlit diferenciální diagnostiku akutních koronárních syndromů. Jedním z velmi nadějných parametrů je stanovení mastné kyseliny vázícího proteinu (hFABP).

hFABP je malý cytosolový protein, jehož hlavní funkcí je transport mastných kyselin s dlouhým řetězcem v kardiomyocytu. Je obsažen uvnitř kardiomyocytu a vlivem ischemie myokardu se velmi rychle uvolňuje do cirkulace. Právě rychlost jeho uvolnění do cirkulace vlivem ischemie a návrat k původním hodnotám přináší nové potenciální využití v diferenciální diagnostice bolesti na hrudi. Dosavadní studie prokázaly, že stanovení hFABP v kombinaci se stanovením vysoce senzitivního troponinu přináší významnou přidanou hodnotu v diferenciální diagnostice bolesti na hrudi. Současná data ukazují, že jeho stanovení navíc i prognostický význam.

Autor také podává své vlastní zkušenosti se stanovením hFABP u nemocných s onemocněními kardiovaskulárního systému.

Ukazuje se, že mastné kyseliny vázící protein je velmi nadějným parametrem s potenciálem využití v klinické praxi.

STATE OF THE ART AND PERSPECTIVES OF CARDIAC MARKERS

Radek Pudil

1st Department of Internal medicine – Cardiology
Medical Faculty of Charles University
and University Hospital, Hradec Králové
Czech Republic

The assessment of cardiac troponins and natriuretic peptides became a routine part of the clinical practice. While cardiac troponins (cTn) are considered the gold standard for the detection of myocardial necrosis, natriuretic peptides are used in assessing the presence and severity of heart failure.

The assessment of both markers has also prognostic significance. For the first time, high-sensitive (hs) methods allow to detect 99th percentile in a clinical practice. This approach brings not only advantages (earlier diagnosis of myocardial necrosis, risk stratification in other cardiovascular diseases, e.g. pulmonary embolism, etc.), but also rises questions of cTn increase of non-cardiac etiology. European Society of Cardiology proposed a rule-out protocol for acute coronary syndromes.

In spite of the fact, that chest pain patients represent the most frequent diagnosis in emergency rooms, new methods for detection of coronary artery disease patients are under intensive research. Heart fatty acid binding protein (hFABP) is one of the most promising parameters at this field. hFABP is a small cytosolic protein that functions as the principal transporter of long-chain fatty acids in the cardiomyocyte. hFABP is present in abundance in the myocardium and is released rapidly into the circulation in response to myocardial injury. Its rapid release into circulation after ischemic stimulus and return to normal levels is essential for its potential use in differential diagnostics of chest pain patients. Current studies showed that hFABP and hs troponin assessment brings significant added value in differential diagnostics of acute chest pain patients. Novel data also show the prognostic potential of this parameter in patient with cardiovascular diseases. The author also summarizes his own experience with hFABP assessment.

These data show that hFABP is new promising parameter for clinical practice.

MANAŽMENT A ETIKA V RIADENÍ KVALITY MEDICÍNSKÝCH LABORATÓRIÍ

Lubomír Špaček^{1, 2}

¹Ústav laboratórných vyšetrovacích metód, OÚSA, s.r.o.
Bratislava

²Poradenská činnosť systémov manažérstva kvality
v zdravotníckych laboratóriách, Bratislava

Keď sa začne hovoriť o kvalite, mnohí z nás si možno pomyslia na certifikáciu, akreditáciu, EHK a pod. Existujú však dva druhy organizácií – jedny, pre ktorých sa kvalita vlastnej činnosti a poskytovaných služieb stala spôsobom myslenia, a druhé, ktoré si napr. od akreditácie sľubujú potvrdenie, ktoré im zvýši štatút a pod.

V príslušných štandardoch kvality sú definované požiadavky na manažment. Dôležité je však vedieť, ako môže manažér efektívne tieto požiadavky plniť. Aké nástroje môže manažér použiť na úspešné riadenie činnosti a kvality. V tomto sú rezervy a preto na niektoré tieto nástroje chcem upozorniť v tomto článku.

Práca pojednáva o úlohe vedúcich pracovníkov v zabezpečení fungovania systému manažérstva kvality v medicínskych laboratóriách. V práci sa taktiež venuje pozornosť etickým aspektom činnosti medicínskych laboratórií.

Manažment laboratória zohráva kľúčovú úlohu v zabezpečení činnosti ale i kvality. Nedostatočná váha vedúcich pracovníkov prikladaná kvalite vedie k formálnemu prístupu k systému manažérstva kvality, ktorý potom nemôže byť efektívnym nástrojom zlepšovania kvality a prosperity činnosti medicínskych laboratórií. Skutočne živý záujem o kvalitu sa nahrádza formálnymi symbolmi kvality. Systém riadenia kvality nezavádzame preto, aby sme zožali slávu, ale aby sme mali kontrolu nad tým, akú službu naše laboratórium poskytuje.

„Manažment je zodpovedný za 94 % problémov súvisiacich s kvalitou a jeho prvým krokom by malo byť odstránenie prekážok, ktoré bránia zamestnancom dobre vykonávať ich prácu.“

(Deming, 1986)

MANAŽMENT V RIADENÍ KVALITY V MEDICÍNSKOM LABORATÓRIU

Definícia vedúceho pracovníka a jeho základných povinností napr. v Zákonníku práce. Povinnosti manažmentu z hľadiska systému manažérstva kvality sú definované v príslušných štandardoch kvality.

DEFINÍCIA VEDÚCEHO PRACOVNÍKA A JEHO ZÁKLADNÝCH POVINNOSTÍ PODĽA ZÁKONNÍKA PRÁCE

Vedúci pracovník je definovaný v Zákonníku práce, § 9, bod 3:

„Vedúci zamestnanci zamestnávateľa sú zamestnanci, ktorí sú na jednotlivých stupňoch riadenia zamestnávateľa oprávnení určovať a ukladať podriadeným zamestnancom zamestnávateľa pracovné úlohy, organizovať, riadiť a kontrolovať ich prácu a dávať im na ten účel záväzné pokyny.“

ZÁKLADNÉ POVINNOSTI VEDÚCICH ZAMESTNANCOV PODĽA ZÁKONNÍKA PRÁCE

§ 82:

„Vedúci zamestnanec je povinný najmä:

- riadiť a kontrolovať prácu zamestnancov,
- utvárať priaznivé pracovné podmienky a zaisťovať bezpečnosť a ochranu zdravia pri práci,
- zabezpečovať odmeňovanie zamestnancov podľa všeobecne záväzných právnych predpisov, kolektívnych zmlúv a pracovných zmlúv a dodržiavať zásadu poskytovania rovnakej mzdy za rovnakú prácu alebo za prácu rovnakej hodnoty,
- utvárať priaznivé podmienky na zvyšovanie odbornej úrovne zamestnancov a na uspokojovanie ich sociálnych potrieb,
- zabezpečovať, aby nedochádzalo k porušovaniu pracovnej disciplíny,
- zabezpečovať prijatie včasných a účinných opatrení na ochranu majetku zamestnávateľa.“

PRINCÍPY SYSTÉMOV MANAŽÉRSTVA KVALITY PODĽA ISO 9001:2008

V tomto štandarde je uvedených 8 základných princípov budovania systému manažérstva kvality:

- Orientácia na zákazníka.
- Vodcovstvo.
- Zapojenie všetkých pracovníkov.
- Procesný prístup.
- Systemový prístup k manažmentu.
- Neustále zlepšovanie.
- Orientácia na fakty pri rozhodovaní.
- Vzájomná prospešnosť vzťahov s dodávateľmi.

Pozrieme sa bližšie na tie body, ktoré majú predovšetkým vzťah k úlohám manažmentu.

VODCOVSTVO

Manažér je osoba, ktorá riadi v organizácii činnosť, ktorú vykonávajú podriadení pracovníci (zamestnanci). Manažéri organizácii na všetkých stupňoch riadenia musia viesť a vytvoriť také prostredie pre svojich pra-

covníkov, aby všetky skupiny zamestnancov podávali v práci maximálne výkony v záujme naplňovania vytýčených cieľov organizácie. V súčasnosti je požiadavka riadenie nahradiť vedením. Cieľom manažmentu musí byť pomoc ľuďom a zariadeniu, aby vykonávali prácu lepšie a rozumnejšie.

Realizácia princípu vedenia vyžaduje:

- deklarovanie vízie, politiky, cieľov organizácie v súlade s požiadavkami zákazníkov a zainteresovaných strán,
- vytváranie pracovného prostredia vzájomnej dôvery medzi zamestnancami a manažmentom,
- poskytovanie príležitostí zamestnancom k vlastnej aktívnej a tvorivej práci, vrátane určenia zodpovednosti a právomoci,
- motiváciu svojich zamestnancov k tímovej práci a k zlepšovaniu.

ZAPOJENIE VŠETKÝCH PRACOVNÍKOV

Ludské zdroje sú najvýznamnejšie pre činnosť organizácie. Pre zapojenie ľudí musí vedenie organizácie:

- vysvetľovať dôležitosť všetkých činností svojich zamestnancov pre dosahovanie výsledkov organizácie,
- viesť všetkých zamestnancov k otvorenej diskusii o ich nedostatkoch a hľadať riešenia,
- trvale vzdelávať zamestnancov na všetkých úrovniach,
- odmeňovať zamestnancov za pracovné výkony,
- motivovať zamestnancov k lepším výkonom.

Budovanie systému manažérstva kvality prináša zmeny na pracovisku, ktorého organizácia, systém práce, systém riadenia sa možno vyvíjal dlhú dobu a pozvoľne. Preto je potrebné s pracovníkmi veľa komunikovať, aby sa zvládalo neporozumenie potrebným zmenám, negatívne postoje a získavala aktívna a konštruktívna spolupráca.

MANAŽÉRSKE SYSTÉMY A PROCESY

Úspešné vodcovstvo a prevádzkovanie organizácie vyžaduje si systematické a viditeľné riadenie. Úspech vyplýva zo zavedenia a udržiavania systému manažérstva, ktorý sa navrhol tak, aby trvalo zlepšoval efektívnosť a účinnosť výkonnosti organizácie tým, že zohľadňuje potreby všetkých zainteresovaných strán. Riadenie organizácie zahŕňa okrem ďalších manažérskych disciplín aj manažérstvo kvality.

POŽIADAVKY NA MANAŽMENT PODĽA ISO/IEC 17025:2005

Niektoré z požiadaviek dotýkajúce sa manažmentu: „Laboratórium musí:

- a) mať vedúcich a odborných pracovníkov, ktorí majú právomoc a zdroje na zavádzanie, udržiavanie a zlepšovanie systému manažérstva kvality,
- b) stanoviť zodpovednosť, právomoc a vzájomné vzťahy všetkých pracovníkov, ktorí riadia, vykonávajú alebo overujú práce,
- c) zabezpečiť primeraný dohľad nad pracovníkmi zaoberajúcimi sa skúškami,
- d) mať technický manažment, ktorý má celkovú zodpovednosť za odborné činnosti,
- e) mať manažéra kvality, ktorý musí mať určenú zodpovednosť a právomoc, ktoré umožnia zabezpečiť, aby sa zaviedol systém manažérstva týkajúci sa kvality a aby sa trvalo dodržiaval.

Vrcholový manažment musí vydať Vyhlásenie politiky kvality.“

POŽIADAVKY NA MANAŽMENT PODĽA ISO15189:2007

Niektoré z definícií dotýkajúce sa manažmentu:

Manažment laboratória – osoba (osoby), ktorá riadi činnosť laboratória, ktoré vedie riaditeľ laboratória.

Riaditeľ laboratória – kompetentná osoba, ktorá vedie laboratórium, je predstaviteľom laboratória a má za laboratórium celkovú zodpovednosť.

Norma pomerne podrobne uvádza požiadavky na organizáciu a manažment, povinnosti riaditeľa laboratória. Detailným požiadavkám na riaditeľa laboratória a manažment laboratória norma venuje značný priestor. Pre podrobnosti odporúčam si pozrieť originálny text normy.

AKO EFEKTÍVNE NAPLŇAŤ ÚLOHU MANAŽÉRA

V príslušných štandardoch sú vymenované požiadavky na manažment. Dôležité je však vedieť, ako môže manažér efektívne tieto požiadavky plniť. Aké nástroje môže manažér použiť na úspešné riadenie činností a taktiež v manažmente kvality. V tomto majú mnohí manažéri rezervy. Práve na niektoré takéto nástroje chcem upozorniť v tomto článku. Najprv však niečo o koncepciách manažérskych úloh:

KONCEPCIE MANAŽÉRSKÝCH ÚLOH

V literatúre môžeme najstť rôzne koncepcie manažérskych úloh:

Tradičná koncepcia – funkčný model

- plánovanie,
- organizovanie,
- vedenie,
- kontrolovanie.

Kontrolovanie je napr. fyzické, písomné, porada, osobný pohovor a pod. Je napr. treba identifikovať, kde

cyklus zaviazol, vo vzťahu k úlohe, vo vzťahu k jednotlivým pracovníkom a pod.

Model medziludských vzťahov:

- zameranie na neformálnu úroveň organizácie ako nosný prvok úspechu organizácie,
- manažment ľudskej zložky (motivácia pracovníkov).

Politicko-osobnostná koncepcia

- osobná moc a taktika jednej osoby – vodca,
- práca so skupinami pracovníkov.

Organizačná koncepcia

- zohľadňovanie vnútorných a vonkajších faktorov činnosti organizácie.

Nový pohľad:

manažér ako projektant – venuje pozornosť organizačnej štruktúre a vnútorným operáciám organizácie riadi:

- rozvoj produkčnej funkcie – výkony, počty vzoriek, potreby rozšírenia kapacít,
- rozvoj informačných systémov,
- nepretržité zvyšovanie kvality,
- ľudské zdroje,
- meniace sa úlohy a vzťahy s profesionálmi a vedením.

Štruktúra organizácie musí byť flexibilná!

manažér ako stratég – sa sústreďuje na adaptáciu organizácie vonkajšiemu prostrediu, identifikácia a vyhodnocovanie vývoja okolia, ktoré môže mať vplyv na organizáciu:

- reakcie na zmeny v okolí,
- horizontálna a vertikálna integrácia, diverzifikácia,

manažér ako vodca – usiluje o vnášanie vízií a strategického riadenia do organizácie, udržiavanie dlhodobých perspektív a úsilie o nepretržité zvyšovanie hodnoty organizácie,

- zabezpečenie, že členovia organizácie vidia, rozumejú a akceptujú kľúčové hodnoty organizácie (závery, ciele a činnosti),
- „misia“ organizácie (nové spôsoby učenia, podpora kreativity a participácie).

NOVÉ ZRUČNOSTI A VEDOMOSTI OČAKÁVANÉ OD MANAŽÉRA

V súčasnosti sú od manažéra vyžadované aj ďalšie zručnosti a vedomosti:

- transformačné kompetencie: facilitácia procesu zmien a adaptácia nestabilnému prostrediu,
- zručnosti: budovanie tímov, skupinové procesy, participácia na rozhodovacom procese, manažment konfliktov, negociácia, komunikácia a budovanie koalícií,
- vedomosti: štatistika, poisovníctvo, epidemiológia,
- citlivosť na vzťah medzi nákladmi a kvalitou,
- inovátor,
- vodca realizácie zmien,

- tvorca kolektívu,
- udržiavateľ vízií.

VLASTNOSTI EFEKTÍVNEHO MANAŽÉRA

Pre efektívnu prácu manažéra sú užitočné nasledovné vlastnosti a schopnosti:

- vydáva jasné príkazy,
- podporuje otvorenú komunikáciu,
- inštruuje a podporuje ľudí,
- poskytuje objektívne hodnotenie,
- vytvára nepretržitý systém regulácie a kontroly,
- vyberá správnych ľudí,
- chápe finančné dôsledky svojich rozhodnutí,
- podporuje inovácie a nové myšlienky,
- dáva podriadeným jasné rozhodnutia,
- demonštruje vysokú úroveň integrity.

ZDROJE SÍL EFEKTÍVNEHO MANAŽÉRA

Efektívna práca manažéra si vyžaduje aby disponoval dostatočnou silou na presadenie, ktorú mu môžu poskytovať nasledovné zdroje:

Moc postavenia:

- Formálna autorita.
- Prepožičané kompetencie a rozhodovacie právomoci.

Moc vedenia:

- Odbornosť, schopnosti, znalosti.
- Informovanosť, delegovanie, budovanie tímu.

Moc osobnosti:

- Autorita zo sebadôvery.
- Dôraznosť, pozitívna pribojnosť, asertivita, komunikačné schopnosti.
- Sklon k tímovej spolupráci, image, charizma.

DESAŤ „DROBNOSTÍ“ SKUTOČNÝCH LÍDROV

Skutoční lídri totiž dokladajú svoje schopnosti nie veľkými gestami ale mnohými drobnými, nenápadnými spôsobmi:

- **Sú myslou vždy prítomní.** Lídri si dávajú pozor na to, čo práve robia alebo s kým práve hovoria. Nie sú ako niektorí ľudkovia, ktorí sú duchom niekde inde, keď s nimi hovoríte. Pri naozajstných lídroch sa necítite nevidení, nepoznaní alebo nepočutí, venujú vám pozornosť.
- **Počúvajú.** Pretože sú prítomní a dávajú pozor, lídri si nielen pamätajú, že sa s vami rozprávali, ale aj to, čo ste povedali. Po rozhovore s nimi sa necítite ako „Preboha, veď to som rovnako mohol hovoriť aj s tamojšou stenou.“
- **Rozprávajú rozumne.** Lídri sú si vedomí, že to, čo hovoria, má efekt na ostatných, takže hovoria s plným vedomým. Nie sú ako poniektorí šašovia, ktorí na poradách okrikujú kolegov a podriadených a robia

z nich hlupákov, ktorí sa potom boja odporovať. Naozajstní lídri sa takto správať nepotrebujú.

- **Cieľavedome povzbudzujú.** Lídri s nohami na zemi a vedomí si svojej osobnosti vedú ostatných ľahko povzbudiť. Povzbudzujú ľudí, aby podstupovali riziká, aby sa nebáli robiť chyby, aby rozvíjali svoje schopnosti a zručnosti, aby sledovali svoje sny. Pomáhajú ľuďom nájsť odvahu a srdce.
- **Sú úprimní.** Naozajstní lídri sa snažia spoznať samých seba, aby aktivovali vnútorné zdroje potrebné pre úprimné hovorenie, vystupovanie a vedenie ostatných. Konajú podľa toho, čo hovoria, takže sa nestáva, že presvedčajú ľudí o niečom, čo sami robia ináč. Nesprávajú sa neeticky, aj keď by to bolo legálne. Ak je niečo neetické, nájdú si inú cestu.
- **Sú skromní.** Naozajstní lídri vedú, že arogancia je rovnako nezdvorilá ako nebezpečná. Vedú tiež, že hoci sa krátkodobý úžitok môže zdať senzáčný, dlhodobé následky arogancie sú zničujúce. Dobrí lídri vždy preukazovali veľkú skromnosť, čo podporovalo ich vodcovské rysy, ktoré slúžili im aj iným.
- **Sú vytrvalí.** Lídri vedú, že keď sa venujú rizikovým činnostiam, môžu zlyhať. Ale je to ich každodenná práca. Vedú, že zlyhania alebo problémy nie sú slepé uličky, ale brány, ktoré vedú k poznaniu a skúsenosti vyššieho rádu. Aj keď niekedy môžu byť dočasne sklúčení, vždy vytrvávajú.
- **Sú odvážni.** Lídri vedú, že každý vrátane nich občas cíti strach. Nikdy ale nenechajú strach, aby im zabránil sledovať ich sny, budovať zručnosti alebo hovoriť úprimne. Skutočného lídra môžete ovaliť kusom uhlia len na to, aby ste nakoniec zistili, že sa znovu postavil na nohy a v tom uhli objavil diamant.
- **Sú hlbaví.** Lídri sú nastavení na to, aby ostatným ľuďom prejavili uznanie, či už im hovoria dobré ráno alebo ich chvália za dobre odvedenú prácu. Tým, že myslia na dopad svojho správania na iných, sú lídri na porade vždy včas, správne využívajú čas, sú organizovaní a dodržiavajú sľuby. Aj napriek svojim ohľadom voči druhým však nespúšťajú zo zreteľa svoju vlastnú cestu, svoje myšlienky a činnosti.
- **Sú zdvorilí.** Dobrí lídri sa k iným správajú vždy zdvorilo, ale na druhej strane očakávajú, že ostatní sa budú chovať zdvorilo zase k nim. Netolerujú nezdvorilé a neúctivé správanie.

Toto boli len niektoré zo základných „drobností“ správania sa pravých lídrov, ktoré dovoľujú, aby sa lídri a vodcovstvo zdravo rozvíjali. Nezáleží na tom, kde sa nachádzate v hierarchii podniku, či pracujete doma alebo na vrchnom poschodí mrakodrapu – uvedené správanie vám pomôže získať skvelé líderské kompetencie.

RIADENIE ZMENY

Zavádzanie systému manažérstva kvality znamená pre organizáciu a pre pracovníkov menšiu alebo väčšiu zmenu. Treba ju zvládať ako zmenový proces.

Odpor voči zmene je emocionálna reakcia na nové požiadavky na človeka v pracovnom procese, ktorá sa prejavuje v nechote prijať tieto nové požiadavky a správať sa v súlade s nimi.

Odpor voči zmene je prirodzenou súčasťou procesu zmeny. Problém nie je existencia odporu ako takého, ale to, ako manažérsky na odpor reagujeme.

Pri zavádzaní zmeny platí zásada:

“Nie je normálne, ak sa odpor voči zmene neprejaví v reakciách pracovníkov. Aby sme zmenu mohli zaviesť, je potrebné tento odpor vyvolať a následne ho prekonať.”

VÝCHODISKÁ – ČO ZNAMENÁ ZMENA:

- strategická reorientácia znamená prechod zo známej sféry pôsobenia inštitúcie, aj ľudí v nej, **do neznámej a neistej budúcnosti, v ktorej mnohé zo starých pravidiel a zásad nebudú platíť.** Zmenia sa kritéria úspechu spoločnosti aj jednotlivca v nej. Zmena prináša existenčné ohrozenie,
- ľudia sa musia vzdať zdrojov svojho minulého úspechu a rozvinúť u seba úplne nové zručnosti. Je možné, že sa im to nepodarí...
- ľudia musia zmeniť svoje postoje, pracovné správanie a medziludské vzťahy v inštitúcii. **Hrozí strata prestíže...**
- od ľudí sa očakáva zmena pohľadu na svoju prácu a osvojenie si nových hodnôt. Niektorí sa boja, že ak zmenia názor, priznajú, že doteraz nerobili dobre...
- vedúci pracovníci nesú ťarchu zmeny. Musia sa starať o zmenu pracovných postupov a organizácie, ale aj o zmenu postojov a osvojenie si nových hodnôt spoločnosti u pracovníkov,
- manažéri musia zmeniť svoj štýl riadiacej práce, pretože v nových podmienkach nie je možné efektívne riadiť starými prostriedkami riadenia,
- zmena prináša nielen zmenu technológie, ale aj zmenu vzťahov vnútri organizácie a zmenu vzťahov s jej okolím (s trhom),
- zavádzanie zmeny vyžaduje zvýšené nároky na spätnoväzbové informácie o chode novej štruktúry, na ich vyhodnocovanie a spätné opravné kroky, čo zvyšuje riziko v rozhodovaní v etape zmeny,
- zavádzanie zmeny vyžaduje vykonať sériu implementačných krokov koordinovane celým manažmentom podniku,
- pri zavádzaní zmeny vzrastá význam dôvery vedením a spolupracovníkmi, preto je potrebné, aby **manažment vytváral atmosféru dôvery,**
- **zmena je nevyhnutná pre budúci úspech.**

DÔSLEDKY ZMIEN

- **ohrozenie vlastných záujmov všetkých,** ktorí sú zmenou dotknutí, každý člen organizácie má svoje vlast-

né záujmy – napr. udržať si postavenie, moc, istotu zamestnania, príležitosť postupu...

Ohrozenie vlastných záujmov je preto základnou príčinou odporu voči zmene,

- neistota, každá zmena vyvoláva neistotu o budúcnosť, čím frustruje základnú ľudskú potrebu. Plánovaná zmena tým vyvolá odpor, pretože človek má potrebu žiť v istote,
- nedostatok porozumenia a dôvery,
- **zmeny často nie sú kompletne vysvetlené tým, ktorých sa budú týkať.** Príčinou môže byť neschopnosť iniciátorov zmeny efektívne komunikovať alebo neschopnosť tých, ktorých sa bude zmena týkať, túto dostatočne pochopiť. Môže ísť tiež o neochotu zverejniť pravé dôvody zmeny,
- výsledkom bude pravdepodobne nedôvera voči tomu, čomu nerozumiem, alebo voči tomu, čo mi bolo nedostatočne vysvetlené (vytvorenie fám),
- nedostatok komunikácie o zmene je základnou príčinou nedôvery,
- nedôvera môže byť výsledkom predchádzajúcej skúsenosti so zmenou,
- rozdielne vnímanie, rozdielne vnímanie potreby zmeny je bežné jednak po zostupnej linii riadenia, ale aj medzi jednotlivými útvarmi,
- nedostatok tolerancie - neschopnosť vnímať, že môže existovať aj iný spôsob práce, je výsledkom nedostatku tolerancie voči iným názorom (konzervativizmus, predsudky).

Pozor na pasívnu rezistenciu! Tá môže byť veľmi silným protivníkom.

STRATÉGIE PREKONANIA ODPORU VOČI ZMENE

1. Stratégie vychádzajúce z použitia sily – mocenské postupy

Stavajú na moci vyplývajúcej z pozície manažéra. Ide o rivalitné stratégie založené na princípe výhra – prehra. Tieto reakcie sú častejšie, ako to zodpovedá súčasnému stavu poznatkov o manažmente.

Ich výhodou je jednoduchosť postupu pre manažéra. Ich uplatnenie nevyžaduje žiadne špeciálne poznatky o riadení zmeny a riadení ľudí... Ich nevýhodou je fakt, že z potenciálnych spojencov si väčšinou tvoríme oponentov.

Medzi takéto stratégie patrí používanie sily alebo právomoci:

- **donucovacia sila založená na faktickej moci** vyplývajúcej z funkčného postavenia. Je založená na donútení prostredníctvom hrozby, **Pracovníci sú často stavaní pre alternatívnu voľbu – buď sa prispôbia zmene alebo odídu.**
- **formálna sila** vyplývajúca z postavenia a s ním súvisiacou možnosťou meniť systémy riadenia a odmeňovania. Ide o byrokratickú metódu, kedy systémom opatrení donútime konať pracovníkov v súlade s našim zámerom,

- **referenčná sila** sa odvodzuje od vyšších nadriadených. Obsahuje v sebe prvok presvedčovania prostredníctvom používania autority vyššieho. **Ide o manipuláciu,**
- **expertná sila** vychádza z postavenia manažéra ako špičkového odborníka. **Zameraná je na presvedčovanie odbornou autoritou.**

Stratégie založené na používaní moci sú zamerané na redukcii odporu pôsobením buď na racionálne aspekty odporu, čo je nedostatočné (naše správanie je v značnej miere diktované iracionálnymi zložkami nášho „podvedomia“), alebo pôsobia na emocionálnu zložku vzťahu k autorite spočívajúcej v strachu. Väčšinou vedú tieto taktiky k zvýšeniu odporu voči zmene na úrovni emocionálnej, ale vonkajšie správanie je v súlade s požiadavkami zmeny.

Práve tento fakt vedie mnohých manažérov k tomu, aby preferovali pri presadzovaní zmien násilné spôsoby.

2. Stratégie participácie – vodcovské postupy

Vodcovské postupy sú založené na inšpirácii ideou, individualizovanom vplyve rešpektujúcom osobnosť pracovníka a intelektuálnym podnecovaním, ktoré **motivuje pracovníka k tomu, aby hľadal sám vyhovujúce riešenia.**

Stratégie participácie využívajú tiež vplyv sily, ale ide o tzv. neformálnu autoritu založenú na vzťahoch a morálnu silu (autoritu). Neformálna autorita ponúkajúca partnerstvo, umožňujúca vlastnú tvorivú iniciatívu pracovníka dáva priestor pre uplatnenie toho racionálneho a konštruktívneho čo v ľuďoch je.

Stratégie participácie vedú k stotožneniu sa pracovníkov so zmenou.

Stratégie participácie používajú techniky **tímovej práce.** Ich náročnosť je daná tým, že **fungujú na princípoch koučingu** a vyžadujú dôveru po vertikále riadenia.

Zapojte ľudí do podpory poslania a stratégie svojej spoločnosti – podporujte a zvyšujte ich lojalitu so spoločnosťou.

Lojalitu pracovníkov so spoločnosťou podporujú:

- participatívny štýl riadenia,
- efektívny motivačný program,
- nástroje personálnej práce – najmä kariérový rozvoj, vzdelávanie a hodnotenie pracovníkov.

Podporujte a realizujte efektívne vodcovstvo na všetkých úrovniach riadenia založené na dôvere. Úspech všetkých procesov zmien je založený na existencii vzájomnej dôvery po vertikále riadenia.

DÔVERU PODPORUJE:

- **otvorená a intenzívna komunikácia** o problémoch, dôvodoch zmien a o dopadoch zmien na ľudí, pretože tým komunikujeme akceptáciu a dávame najavo

pochopenie pracovníkov. Nesprávna komunikácia vedie u zamestnancov k strate orientácie, nedôvere a skepse,

- **jednoznačne deklarované úsilie o úspech** a konanie manažmentu v súlade s týmito deklaráciami,
- **jasne formulovaná stratégia** (vízia) budúcnosti, aby každému bolo jasné, prečo sa zmeny robia,
- **pamätajte na zmenu postojov a hodnôt vašich podriadených**. Ľudia sa musia so zmenou stotožniť, aby pocítovali potrebu zmeniť doterajšiu prácu,
- **zainterosovanie všetkých pracovníkov**. Zainteresujte podľa možnosti do projektu už od samého začiatku všetky skupiny zamestnancov, ktoré by mohli projektu klásť odpor. Nechajte pracovníkov, aby sa zúčastňovali návrhu riešenia,
- **neignorujte pocity zamestnancov** – sú pochopiteľné a neodškriepiteľné,
- **podriadte svoju podnikovú kultúru službe zákazníkom**. Ide o princíp, ktorý rešpektuje všeobecné poznatky o úspešnosti spoločností – úspešné sú tie spoločnosti, ktoré sa snažia poskytnúť čo najlepší produkt svojmu zákazníkovi a za čo najvýhodnejších podmienok,
- **pri plánovaní zmien pamätajte na dopad zmien na ľudí v spoločnosti**. Zmena môže byť spojená so zmenami počtu zamestnancov. To vyvoláva obavy a neistotu. O predpokladaných dopadoch na ľudí je potrebné otvorene hovoriť. K tomuto účelu sa vypracúva program (riadenie) zamestnanosti v spoločnosti,
- **presadzujte tímovú prácu**. Pre úspech zmeny je nevyhnutná tímová práca. Moderná zmena je založená na reinginieringu procesov (BPR), ktorý nie je možné uskutočniť bez spolupráce rôznych odborníkov,
- **vytvárajte atmosféru pre produktivitu**. Dobre vytvorený systém organizácie a riadenia založený na procesnom usporiadaní vytvára základné predpoklady pre zvýšenie produktivity. Efektívne vodcovstvo rešpektujúce poslanie spoločnosti a riadeného útvaru spolu s oceňovaním kvalitného a produktívneho výkonu posilňuje atmosféru produktivity. Súčasťou nástrojov na zvyšovanie produktivity je aj zvyšovanie flexibility pracovnej sily (viacprofesnosť),
- **správne zaradujte ľudí na pracovné miesta – správny človek na správne miesto**. Procesy zmien sú spojené so zmenami v pracovnom a funkčnom zaradení pracovníkov. Pre úspech zmeny je veľmi dôležité, aby pracovníci, ktorí v spoločnosti zostávajú, robili to, čo vyhovuje ich povahe, záujmom a schopnostiam,
- **rozvíjajte systém starostlivosti o ľudí**. Paralelne s rozvojom systémov riadenia a motivácie je potrebné venovať pozornosť aj systému starostlivosti o ľudí. Týmto spôsobom ľuďom komunikujeme, že spoločnosti na nich záleží. Tento systém v sebe obsahuje:
 - systém osobného pracovného rastu (kariérový rast), najmä v zmysle horizontálneho rastu,
 - systém sociálnych istôt a sociálnej starostlivosti,
- **objektívne hodnotíte dosiahnuté úspechy**. Celý proces zmeny má rad etáp. Je veľmi dôležité, aby sa dosiah-

nuté výsledky hodnotili objektívne. Na hodnotení dosiahnutých výsledkov sa podieľajú všetci pracovníci.

- **korigujte nesprávnu cestu otvorene**. Projekt sa môže uberať nesprávnu cestou.
- **nedopustíte demotiváciu napr.:**
 - chýbajúcimi materiálnymi podnetmi,
 - nedostatočnou spätnou väzbou o priebehu premeny,
 - negatívnymi skúsenosťami so zmenami,
 - odsudzovaním omylov a chýb,
 - nedostatočným definovaním rolí jednotlivých zúčastnených tým, že riadiaci pracovníci nebudú fungovať ako nasledoviahodný vzor,
 - vytvorením tímu, kde to medzi jednotlivými členmi „iskrí“ v medziosobnej rovine.

KONTROLA V RIADIACOM PROCESE

Etapy kontrolného procesu

Kontrola je **posledným článkom** v riadiacom procese manažérov.

Riadiaci proces má v základnej štruktúre členenie na:

- plánovanie,
- organizovanie,
- vedenie ľudí,
- kontrola.

Kontrola je teda proces, ktorý je všeobecne vnímaný ako **aktivita zameraná na zistenie, či jednotlivé činnosti, aktivity a akcie, ktoré sa v spoločnosti realizujú, vedú k dosiahnutiu cieľa alebo cieľov**. Pomáha manažmentu orientovať sa aj v podmienkach stanovenia budúcich cieľov, ich merateľných parametrov.

Hoci kontrola je nevyhnutnou súčasťou riadenia, niektorí manažéri sa jej snažia vyhnúť, necítia sa voči nej pohodlne. Pre pracovníkov je taktiež neprijemné, ak sú kontrolovaní. Je to predovšetkým dôsledok toho, že sme v minulosti zažili nesprávne poňatú a vykonávanú kontrolu. **Treba sa naučiť vykonávať a aj zniesť efektívnu kontrolu, ako nevyhnutnú súčasť riadenia.**

AKO DOSAHOVAŤ POROZUMENIE A EFEKTÍVNY VPLYV

Každý manažér ale všeobecne každý pracovník potrebuje dosahovať porozumenie. Rozumieť druhým, aby rozumeli druhý jemu. Účinnou pomôckou môže byť tzv. „trojuholník porozumenia“. Každý manažér ale všeobecne každý pracovník potrebuje aby mal vplyv v oblasti v ktorej pôsobí. Môcť veci, ľudí a dianie ovplyvňovať. Účinnou pomôckou môže byť tzv. „trojuholník vplyvu“.

TROJUHOLNÍK POROZUMENIA

V procese riadenia ale i všeobecne v akejkoľvek situácii môže manažér využívať veľmi účinný princíp

na dosahovanie porozumenia -trojuholník porozumenia, ktorý je utváraný tromi faktormi:

- Afinita,
- realita,
- Komunikácia.

Afinita - je to emocionálna náklonnosť, blízkosť, vzťah ktorého najvyššou mierou je láska.

Realita - je to miera súhlasu dosiahnutá dvoma ľuďmi o niečom, „s čím človek súhlasí, že to tak je“.

Komunikácia - výmena myšlienok medzi dvoma ľuďmi s cieľom vytvoriť efekt (niečo vyvolať).

Ak sa niektorý z týchto prvkov afinita (A), realita (R), komunikácia (K) zväčší, zväčšia sa i ostatné dva a vzrastie porozumenie (plocha trojuholníka).

Komunikácia je najdôležitejší nástroj manažéra, pomocou ktorého môžeme aktívne ovplyvňovať ostatné dva faktory a dosahovať väčšie porozumenie.

V procese prípravy a zavádzania zmien (napr. akreditácie) je potrebné s pracovníkmi čo najviac komunikovať, vysvetľovať, pýtať sa, odpovedať, dať priestor na prediskutovanie nejasností. K zmenám pristupovať s afinitou, komunikáciou rozširovať realitu a výsledkom bude väčšie porozumenie potrebné na efektívnu realizáciu zmien.

Používanie tohoto jednoduchého vzťahu môže výrazne zvýšiť schopnosť manažéra efektívne dosahovať potrebné porozumenie nielen v riadení ale i vo všetkých oblastiach života.

TROJUHOLNÍK VPLYVU

Riadenie (kontrola) činností je podstatnou úlohou manažéra. Riadenie je nevyhnutné v akejkoľvek činnosti. Riadenie súvisí s dvoma predpokladmi - vedením (znalosťou) a zodpovednosťou.

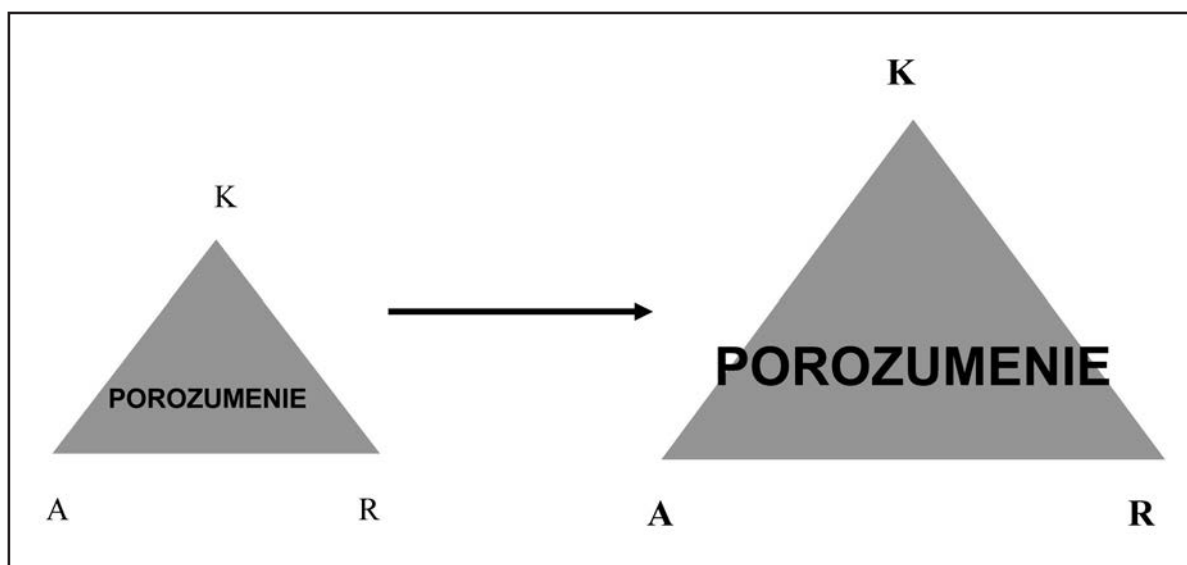
Vedenie = znalosť, mať potrebné informácie a vedieť ich použiť (porozumenie).

Zodpovednosť = ochota a schopnosť byť v pozícii úplnej príčiny toho čo človek spôsobuje so všetkými z toho vyplývajúcimi dôsledkami. Nie je to len formálne poverenie na činnosť ale predovšetkým jednoznačný vnútorný postoj ochoty vykonať všetko, aby sa v danej oblasti dosiahli požadované výsledky, požadovaný plnohodnotný produkt, služba.

Niektorí pracovníci, i vedúci pracovníci, nie sú si vedomí takejto zodpovednosti alebo nie sú ochotní preberať takto definovanú zodpovednosť!

Riadenie (kontrola - K) môže byť efektívna len ak je spojená s potrebným vedením (V) a s vedomou ochotou prevziať za danú činnosť zodpovednosť (Z). Vtedy má človek vplyv na danú oblasť.

Efektívne môžeme veci ovplyvňovať, ak mám potrebné vedomosti a zručnosti -vedenie (porozumenie), ak som si vedomý plnej zodpovednosti a ak vykonávam kompletne riadenie danej oblasti. Čím viac pozornosti venujem týmto trom faktorom, tým väčší reálny vplyv budem na danú oblasť mať.



Chýbajúca, nedostatočná alebo neefektívna komunikácia je základným problémom v organizáciách, v spoločnosti, v rodinách. Investícia do dobrého tréningu na rozvoj komunikačných schopností je pre manažéra investíciou s najlepšou návratnosťou.

Riadenie (kontrola) akejkoľvek veci, človeka alebo činnosti môže byť redukované na tieto základné prvky:

- začiatok (štart),
- priebeh (pretrvanie, udržiavanie, zmena),
- zastavenie (stop).

Činnosť (alebo seba, podriadených) treba vo vhodnom okamihu spúšťať, potrebný čas udržiavať v prebiehaní činnosti a potom, keď sa dosiahol žiadaný efekt, treba činnosť zastaviť.

Môže to byť demonštrované na príklade smernice v systéme manažérstva kvality:

- **začiatok** (štart): smernica daná do používania,
- **priebeh** (pretrvanie, zmena): smernica je používaná, sledované jej používanie, robené opatrenia na správne používanie a pod.,
- **zastavenie** (stop): smernica je zrušená, stiahnutá, nahradená.

Takto vyzerá v stručnosti riadenie životného cyklu smernice.

Nedostatky v riadení sa môžu vyskytnúť v každej z týchto 3 častí:

- **zlyhanie v štarte**. Činnosti sa vôbec neštartujú. Potrebné smernice sa nevytvoria, nezverejnia, nedajú do používania,
- **nezabezpečenie udržiavania** v priebehu alebo sa stále len udržuje v činnosti i keď účel bol už splnený. O osud raz vydaných smerníc sa viac už príslušný manažér nestará. Nesleduje, či sa používa správne, či sa vôbec používa, aký má dosah na činnosť, ktorú ma upravovať a pod.,
- **neriadené ukončenie** (samovoľné ukončenie pred splnením účelu alebo zlyhanie v ukončení, keď už stratila opodstatnenie). Niektorí pracovníci pôsobia ako samovoľní ukončovači. Činnosti ani nezačnú, ak nie sú sústavne tlačení alebo ich postupne prestanú vykonávať. Niektorí natrafia na materiál o ktorom ďalší pracovníci ani nevedia, že existuje. Na pracoviskách sa hromadia rôzne pokyny a iné materiály o ktorých aktuálnosti už chýba informácia. Platia ešte, majú sa používať, sú ešte potrebné, neboli už zrušené?

Pre efektívne fungovanie systému manažérstva kvality je nevyhnutné:

- udržiavať dostatočné znalosti u seba a u všetkých pracovníkov,
- ochotu prevziať zodpovednosť za vykonávané činnosti a pracovníkov,
- vykonávať skutočné riadenie (kontrolu) pracovníkov a činností.

Znaky dobrého manažéra:

- udržiavať si čo najlepšie znalosti riadenej oblasti (a okolia), riadených pracovníkov
- má ochotu prevziať plnú zodpovednosť za vykonávané činnosti a pracovníkov,
- vykonáva skutočné riadenie (kontrolu) pracovníkov a činností (a nemá problém ľudí riadiť),
- Komunikuje, komunikuje, komunikuje...

Znaky dobrého pracovníka:

- udržiavať si čo najlepšie znalosti vykonávanej činnosti,
- má ochotu prevziať plnú zodpovednosť za vykonávané činnosti a potrebnú spoluprácu,
- vykonáva riadenie (kontrolu) vlastných činností a nástrojov,

- strpí byť riadený (kontrolovaný) ale môže pracovať samostatne.

ETIKA V MEDICÍNSKOM LABORATÓRIU

Hoci etika ako nutná súčasť vzdelania a civilizovaného života má veľmi dlhú históriu, v súčasnosti pociťujeme jej absenciu v politike, v činnosti inštitúcií, firiem a v medziľudských vzťahoch.

Všeobecná etika skúma morálne štandardy. Aplikovaná etika sa zaoberá špecifickou problematikou rôznych oblastí – podnikateľská etika, etika v bankovníctve, vo vede, v reklame, v masmediálnej komunikácii, v zdravotníctve a pod. Nie vždy je však jasné čo je považované za etické správanie. Mnohé spoločnosti, firmy, organizácie, združenia, profesie či komunity si však potrebu etiky v ich činnosti navonok i vo vnútri uvedomujú a deklaratívne sa prihlasujú k plneniu určitých etických princípov definovaných napr. vo forme etického kódexu.

Etický kódex

Etický kódex je jedna zo súčastí inštitucionalizovanej etiky. Je to súhrn noriem, pravidiel, a princípov, podľa ktorého by sa mal alebo sa musí riadiť každý člen skupiny. Úlohou kódexu je teda usmerňovať správanie sa člena skupiny alebo pracovníkov. Mal by zabezpečiť dodržiavanie noriem, vytvorenie pozitívneho imidžu skupiny, zamedziť vzniku konfliktov a mal by byť návodom ako riešiť problémy, ktoré sa vyskytnú.

Etický kódex vo všeobecnosti môže napr. riešiť nasledovné okruhy otázok sociálnej zodpovednosti vo vzťahu k externým a interným záujmovým skupinám:

- zodpovednosť voči spoločnosti a štátu, vláde a regiónu,
- zodpovednosti voči akcionárom a vlastníkom,
- zodpovednosti voči klientom,
- zodpovednosti voči obchodným partnerom, dodávateľom,
- zodpovednosti voči veriteľom,
- zodpovednosti voči zamestnancom,
- zodpovednosti voči manažmentu,
- zodpovednosti voči konkurencii,
- zodpovednosti voči životnému prostrediu.

Dôležitou oblasťou etického zvládania môže byť problematika medziľudských vzťahov, rôzne formy šikany, obťažovania, zneužívania postavenia atď.

V procese rozhodovania by sa mala každá firma, ktorej záleží na etickom profile a imidži, snažiť sa do svojej stratégie zahrnúť tieto etické princípy:

1. Neškodiť iným.
2. konať čestne voči všetkým zúčastneným stranám.
3. Participovať na spoločnom blahu.

Prvý princíp sa považuje za morálne minimum, ku ktorému by sa mala hlásiť každá organizácia.

Druhý princíp predstavuje základnú požiadavku

v komunikácii a kooperácii medzi ľuďmi, bez ktorej akákoľvek zmluva je absurdná a bezpredmetná. Byť čestným v konaní zároveň vyjadruje úctu k druhej osobe.

Tretí princíp predstavuje uvedenie, že každá organizácia je súčasťou určitého spoločenstva a z toho použitia im vyplývajú tak práva ako aj povinnosti.

Etické kódexy v medicínskom laboratóriu

Medicína sama je spojená s celým radom etických otázok (základné princípy lekárskej etiky, informovaný súhlas, dilematické situácie v intenzívnej medicíne, etika ľudskej genetiky, problematika klonovania, kmeňové bunky, darcovstvo a transplantácie, problematika reprodukcie, problematika umierajúcich, paliatívnej medicíny a eutanázie, drogové závislosti a alkoholizmus, dostupnosť medicíny – alokácia zdrojov) ktoré si vyžadujú pozornosť etických profesionálov, medicínskych odborníkov ale i verejnosti.

V medicínskom laboratóriu sa môžeme stretnúť s nasledovnými druhmi etických kódexov:

Etický kódex registrovaného člena SNAS – upravuje povinnosti akreditovaného subjektu SNAS z hľadiska dodržiavania podmienok za ktorých môže akreditovaná organizácia používať odkazy na svoj status akreditácie.

Etický kódex zdravotníckeho pracovníka (podľa prílohy zákona 578/2004 Z. z.).

Etika v laboratórnej medicíne, informatívna Príloha C v ISO 15189 môže byť inšpiráciou nie len pre akreditované medicínske laboratória. Odvoláva sa na profesné kódexy príslušných profesií. Ústredným motívom je ochrana záujmov pacienta.

V článku C.2.1: „*Všeobecný princíp zdravotníckej etiky je, že dobrá starostlivosť o pacienta je prvoradá. Avšak vzťah medzi laboratóriom a pacientom je komplikovaný aj skutočnosťou, že medzi žiadateľom a laboratóriom môže byť zmluvný vzťah. Hoci tento vzťah (ktorý je často komerčný) sa často môže javiť ako dôležitejší, povinnosťou laboratória je, aby starostlivosť o pacienta a jeho záujmy boli prvoradé a mali prednosť.*“

Príloha sa venuje nasledovným okruhom z hľadiska etiky: *Zber informácií, Odber primárnych vzoriek, Výkon vyšetrenia, Oznamovanie výsledkov, Skladovanie a uchovávanie zdravotných záznamov, Prístup k záznamom medicínskeho laboratória, Použitie vzoriek na iné vyšetrenia, než na aké sa požadovali, Finančné vzťahy.*

Táto príloha sa zaoberá etickými otázkami činnosti medicínskeho laboratória vo vzťahu k pacientovi. Nerieši však ďalšie eticky dôležité okruhy v práci medicínskeho laboratória, tak ako je uvedené vyššie. Je na zvážení manažmentu laboratória, čo do etického kódexu zahrnie.

Námaha, ktorú manažment medicínskeho laboratória vynaloží na formulovanie vlastného etického kódexu a jeho prejednávanie s pracovníkmi, iste bude dobrou investíciou do zvýšenia nielen kvality poskytovaných služieb ale i sebaúcty manažmentu a pracovníkov a väčšieho uspokojenia s práce.

LITERATÚRA

1. ISO 9001:20082.
2. ISO/IEC 17025:2005.
3. ISO 15189:2007.
4. **Barica, J. a kol.:** *Marketing a riadenie úspešného manažéra.* Verlag Dashöfer, 2010.
5. **Madr, J. a kol.:** *Řízení kvality ve zdravotnickém zařízení.* Grada Publishing, 2004.
6. <http://www.ibispartner.sk/sk/kvalita/222-projektovy-manazment-s-rozumom-a-citom>.
7. <http://www.ibispartner.sk/sk/kariera/406-desat-drobnosti-skutocnych-lidrov>.
8. **Motivačný seminár pre vedúcich pracovníkov.** Business Success, Bratislava 2007.
9. **Etický kódex registrovaného člena SNAS**, http://www.snas.sk/index.php?page=5&page_sub=42.
10. **Remišová, A.:** *Podnikateľská etika v praxi – cesta k úspechu.* EPOS, Bratislava 1999.

Adresa pre korešpondenciu:

RNDr. Lubomír Špaček

OÚSA, s. r. o.

Haydukova 10, 812 50 Bratislava

lspacek@ousa.sk

POŽADAVKY NORMY ISO 15189 NA PREANALYTIKU V TERÉNU A ZABEZPEČENÍ JEJICH DODRŽENÍ

Luděk Šprongl

Centrální laboratoř, Šumperská nemocnice a. s.
Nerudova 460/41, 787 52 Šumperk, ČR

Norma EN ISO 15189-2007 je základním standardem pro hodnocení kompetence klinických laboratoř. Zjednodušeně řečeno v rámci akreditačního jde také o posouzení schopnosti laboratoře vydávat validní výsledky. Otázkou je, zda je norma dostatečná k posouzení všech procesů týkajících se procesu tvorby výsledků. A také zda je splnění všech požadavků normy ovlivnitelné laboratoři.

V mém sdělení se budu z tohoto pohledu věnovat části preanalytické fáze probíhající mimo laboratoř – odběru u praktických lékařů či ambulantních specialistů. Co k tomu říká norma? Jednak v bodě 3.11 definuje preanalytickou fázi (postupy předcházející vyšetření): kroky začínající v chronologickém pořadí požadavkem lékaře a zahrnující žádanku o vyšetření, přípravu pacienta, odběr primárního vzorku a dopravu do laboratoře nebo v rámci laboratoře a končící zahájením postupu analytického vyšetření. Požadavky na tuto část procesu se vyskytují v bodě 5.4.3. – požadavky na obsah příručky pro odběr primárních vzorku. V bodě a je povinnost informovat pacienty týkající se osobní přípravy na odběr, v bodě b postupy pro přípravu pacienta, označení

vzorku a odběr vzorku a v bodě c návody mimo jiné pro načasování odběru a zacházení se vzorkem. Další body jsou věnovány správné identifikaci vzorku a dopravě vzorku. Souvisí i odstavec 5.4.5. – identifikace vzorku a 5.4.6. – sledování dopravy vzorku.

Z uvedeného je patrné, že jsou prakticky všechny aspekty ovlivňující validitu a návaznost výsledků v normě obsaženy, ale často jen v požadavcích na dokumentaci. Významný faktor – příprava pacienty a způsob odběru – je pouze povinnou součástí příručky pro odběr primárních vzorků. Jejich splnění ale závisí pouze na odpovědnosti lékaře v terénu. Laboratoř je schopna ověřit správné použití odběrových nádobek, dopravu (teplota, doba) a souhlas údajů na žádance s označením na odběrové nádobce. Přípravu pacienta (dieta, úplnost sběru moči atd.) a způsob odběru (vleže, vsedě; se zataženou či uvolněnou rukou) nelze ověřit a zkontrolovat.

To znamená – norma mluví jasnou řečí a požadavky jsou srozumitelné a dostatečné. Ale plnění některých z nich mimo laboratoř jde velmi obtížně kontrolovat – kontrolovatelná je jen správná dokumentace (návod) a její srozumitelnost pro lékaře a pacienty. A jak postupuje sám terénní lékař (či sestra). Poučí správně pacienta? Ověří přípravu pacienta k odběru a jak? Tuto oblast preanalytické fáze nelze zkontrolovat ani v průběhu auditu.

Z toho vyplývá, že norma definuje požadavky na postupy před vyšetřením dostatečně. Ale některé části neanalytické fáze nelze zkontrolovat a tak u testů s komplikovanější přípravou na odběr či s komplikovanějším odběrem, stejně jako u testů ve sbírané moči, dodržování normy 15189 laboratoři nemusí zaručit validitu výsledků.

Literatura: EN ISO 15189-2007“.

AKO SI PREDSTAVUJE KVALITNÚ SPOLUPRÁCU LABORATÓRIUM S KLINIKOU

František Štefanec^{1, 2}, Zuzana Keryová²

¹Oddelenie klinickej biochémie a hematológie
Fakultná nemocnica s poliklinikou, Skalica, a.s.

²Oddelenie klinickej biochémie a hematológie
Poliklinika Senica, n. o.

ABSTRAKT

Je viacero definícií spolupráce, ale spoluprácu medzi laboratóriom a klinikmi možno nazvať ako spoločnú účasť na poskytovaní zdravotnej starostlivosti. Obidvaja majú spoločný predmet činnosti (poskytovanie zdravotnej starostlivosti) a spoločné ciele – starostlivosť o pacienta a ochranu zdravia. Tým, že jeden subjekt si objednáva službu u druhého, mení sa rovnovážna spolupráca na vzťah „zákazník – poskytovateľ“ ide teda o „obchod“, v ktorom si lekári „objednávajú službu“ (analýzu vzoriek biologického materiálu pacienta) v laboratóriu. V konkurenčnom prostredí laboratórií sa situácia môže posunúť zo zdravej konkurencie na „boj“ o o zákazníka. To je stav, ktorý existuje aj na Slovensku.

Ako zmeniť klasickú spoluprácu na vzájomne výhodnú? Medzi laboratóriom a klinikom je o to **lepšia spolupráca**, čím je **lepšia komunikácia**. Na základe niekoľkoročných skúseností z dobrej spolupráce s klinikmi je potrebné rozvíjať rôzne aktivity ako sú:

1. Osobné stretnutia v ambulanciách a na oddeleniach.
2. Exkurzie klinikov v laboratóriu.
3. Operatívne riešenie problémov.
4. Využívanie možností 3. tisícročia – elektronická komunikácia.

Čo by predovšetkým privítalo laboratórium zo strany klinikov?

1. **Súčinnosť v administratívnych záležitostiach** (elektronický príjem výsledkov, elektronická žiadamka – blízka budúcnosť, internet).
2. **Dodržiavanie pravidiel preanalytickej fázy** (30 % podiel na kvalite výsledku).

BENEFITS OF ACCREDITATION OF PROVIDER OF INTERLABORATORY- COMPARISONS IN MEDICAL LABORATO- RIES ACCORDING TO NEW ISO17043

Tiikkainen, UH

Labquality Ltd, Ratamestarinkatu 11, 00520 Helsinki,
Finland

The international standard ISO 17043 for accreditation of proficiency tests (EQA programmes and schemes) was approved at the end of 2010. By now some EQA-providers have already achieved the accreditation according to the new standard and several have applied for accreditation.

This standard “Conformity assessment – General requirements for proficiency testing” covers general requirements, competence of providers of proficiency testing (PT) schemes and development and operation of PT schemes.

The reasons for EQA providers to spend resources on accreditation process are numerous. One of the main causes is the customer requirements since laboratories must participate in the accredited schemes whenever possible stated by authorities. Also the status of the accredited provider is highly appreciated by the customers. The example of the other EQA providers is followed and the tool for continuous improvement in quality service and efficiency of operation has been mentioned to be important aspects for accreditation.

As a consequence of accreditation and adapting the requirements of the standard ISO 17043 strengthens the scheme management and the procedure itself. From the providers point of view the main benefits are the harmonization of various scheme processes including statistical design, information and special reports to participants. Attention has to be paid to the selection of experts and steering groups and accreditation ensures that a provider has professional and competent personnel for coordinating EQA schemes.

There are expectations for the change in the impact of the quality of EQA service also from the laboratory's point of view. Accreditation proves that the provider is organizing the EQA schemes with competence and fulfilling the requirements of the standard. The key issues of specimen stability and homogeneity, reliable and repeatable scheme information, improved report quality and evaluation of a participant performance are required. Accreditation standard emphasizes also customer support and education.

Labquality started its accreditation process in 2010 and the Finnish accreditation body FINAS approved the standard ISO 17043 in Finland in February 2011.

The first accreditation assessment for Labquality took place on the 24th of August 2011 and eight nonconformities were reported. Our plan for corrective actions is accepted by Finas and the aim is that Labquality will have the accreditation status for 36 different schemes at the end of 2011.

This major process is significant for Labquality itself and of course for its clients. The accreditation status will show that Labquality has competence to produce EQA schemes with expertise and good knowledge and is acknowledged to develop its operation for the future EQA needs.

NEW AND THE MOST POPULAR LABQUALITY SCHEMES

Tiikkainen, UH

Labquality Ltd, Ratamestarinkatu 11,
00520 Helsinki, Finland

Labquality has provided external quality assurance schemes (EQA) for clinical laboratories for over 40 years. Among the very first schemes started in early 1970's were general clinical chemistry and qualitative test on urine. These schemes are still popular with 500 participating laboratories per survey.

Over the years the selection of the EQA schemes has increased and the updated programme for Labquality's EQA services for 2012 has been published with over 150 different schemes from various laboratory medicine disciplines, most popular schemes being Glucose meters (650 participants/survey) and Streptococcus (group A), antigen detection (540 participants/survey).

From time to time we have received suggestions and requests from our client laboratories for improvements to our services. Some of them have now been implemented in the updated EQA programme. Most suggestions from laboratories have concerned organizing a new scheme that had not previously existed in Labquality's range or adding a new component to an existing scheme.

NEW SCHEMES AND FREQUENCIES

For example, the pilot surveys for the schemes *Legionella* antigen and *Streptococcus pneumoniae* antigen detection in urine held in 2011 were successful and now these schemes are available in Labquality's EQA programme for 2012, where you will find more information. In addition, the schemes for Human T-cell lymphotropic virus antibodies (HTLVAb) and HI virus antibodies for POC methods are available at laboratories' requests. All the new schemes are marked as "New" in the programme catalogue.

In addition according to the client laboratories' needs the number of surveys has been increased up to four times yearly in the schemes of Glucose meters, Gram stain, blood culture, Leucocyte differential count, Protein electrophoresis, Prostate specific antigen and Reticulocyte count.

PARTICIPATE IN A PILOT SURVEY

If a laboratory is interested in taking part in pilot surveys, information and an invitation to participate will be found on the Labquality website (www.labquality.fi) together with a list of the planned pilot surveys in the 2012 Programme. The coming pilot surveys will include one for veterinary laboratories and another for Leucocyte differential count for Hemocue devices. Schemes for Norovirus, detection and *Plasmodium falciparum*, antigen detection are under the development. Inquiries about details of these surveys can be addressed to the EQA coordinator responsible for the survey.

YOUR FEEDBACK IS VALUABLE

As mentioned, suggestions and requests from laboratories are an important part of EQA scheme development work. We hope you will always contact us if you are not satisfied with the service we offer or you cannot find a scheme, report or analyte suitable for your quality needs. You can reach us easily through our website ("Drop us a line!" section), telephone or email, or by contacting your local Labquality distributor. All suggestions are welcome and evaluated. Some of them are selected for further processing and some are retained for later development.

We would like to thank you for all the suggestions we have received so far and look forward to developing the EQA services with your help in the future.

STANOVENIE ANTIOXIDAČNÉHO STATUSU U VRCHOLOVÝCH ŠPORTOVCOV- VESLÁROV

**Vladimír Urbánek, Marica Kudláčková, Igo Kajaba,
Jana Máleková, Viera Pauková, Csilla Mišlanová,
Martina Valachovičová**

Slovenská zdravotnícka univerzita v Bratislave

Voľné radikály a oxidačný stres sa priamo, či nepriamo zúčastňujú na chorobných procesoch nielen civilizačných ochorení (kardiovaskulárne ochorenia, malígne ochorenia, diabetes mellitus, obezita, osteoporóza, hepatopatie, pankreatitída, renálne ochorenia, neurodegeneratívne ochorenia, ochorenia kože, gastrointestinálne ochorenia a iné), ale i pri viac ako 100 ďalších ochoreniach. Reaktívne formy dusíka a kyslíka ako superoxidový aniónový radikál, hydroxylový radikál, peroxid vodíka a singletový kyslík sú schopné poškodzovať všetky biochemické komponenty organizmu (Valko *a kol.*, 2001). Je dôležité, aby bol v organizme zachovaný rovnovážny stav medzi tvorbou a vychytávaním voľných radikálov. Porušenie spomenutej rovnováhy môže byť spôsobené zvýšenou koncentráciou voľných radikálov, zníženou aktivitou ochranných enzýmových systémov a tiež deficitom prirodzených antioxidantov. Trvalá nerovnováha medzi dvojicou antioxidant- prooxidant v prospech prooxidanta je označovaná ako oxidačný stres (Muchová *a kol.*, 2004; Kimáková *a kol.*, 2003; Krajčovičová-Kudláčková *a kol.*, 2002).

Prínosy telesného cvičenia pri podpore dobrého zdravia a v prevencii rôznych ochorení sú pevne uznávané, počas ťažkej fyzickej námahy sa však vtok kyslíka do aktívnych kostrových svalov zvyšuje 100-násobne a spotreba kyslíka 15-násobne. Takéto zvýšenie rýchlosti oxidačného metabolizmu je spojené so zvýšenou tvorbou reaktívnych foriem kyslíka a preto cvičenie samé o sebe môže indukovať oxidačný stres. Veslovanie patrí medzi šport s veľkým objemom, dlhotrvajúcim zaťažením a výrazným uplatnením sily. Do výskumu bola zahrnutá dospelá populácia aktívnych veslárov zo Slovenska. Kontrolu ku veslárom tvorili ich známi, ktorí necvičia aktívne, ale dodržiavajú odporúčania WHO pre fyzickú aktivitu na zachovanie zdravého životného štýlu. Počet probandov v oboch skupinách ako aj ďalšia charakteristika skupín je uvedená v tab. 1. Vyšetrenia boli uskutočňované na jar. Všetci boli subjektívne zdraví, t.z. bez kardiovaskulárneho ochorenia, rakoviny, diabetu, ochorenia obličiek, tráviaceho traktu a štítnej žľazy.

Tab.1. Charakteristika súboru

| | VESLÁRI | NEVESLÁRI |
|--------------------------------------|------------|------------|
| n | 20 | 20 |
| vekové rozpätie (r) | 20 - 30 | 20 - 27 |
| priemerný vek (r) | 24,0 ± 1,0 | 22,4 ± 0,3 |
| Body mass index (kg/m ²) | 23,1 ± 0,6 | 22,4 ± 0,6 |
| fajčiari | 0 % | 0 % |

Výsledky sú vyjadrené ako priemery ± SEM

Športovci vs. nešportovci majú významne redukované plazmatické koncentrácie vitamínu C, vitamínu E a vitamínu A, nevýznamne zmenené koncentrácie β-karoténu (tab.2). Priemerné hodnoty vitamínov u všetkých probandov sú podprahové, t.zn. rizikové resp. menej účinné v prevencii oxidačného stresu. Práhové hodnoty pre antioxidantné vitamíny plazmy boli určené v dlhodobých nutričných a klinických štúdiách na základe korelácií medzi incidenciou ochorení spôsobených voľnými radikálmi a hodnotami vitamínov. Čo sa týka individuálnych hodnôt, 55 % nešportovcov má protektívne hodnoty vitamínu C vs. 0 % športovcov. Hodnoty vitamínu E s ochranným efektom boli nájdené u 45 % nešportovcov vs. 5 %, β-karotén pôsobí optimálne len u 15 % nešportovcov vs. 5 % a protektívne hodnoty vitamínu A boli namerané u 5 % nešportovcov vs. 0 % športovcov (tab. 2).

Tab.2. Plazmatické koncentrácie antioxidantných vitamínov a výskyt nadprahových hodnôt

| | VESLÁRI | NEVESLÁRI |
|--------------------|-------------|--------------|
| vitamín C (μmol/l) | 26,1 ± 2,1 | 48,7 ± 3,5** |
| > 50 | 0 % | 55 % |
| vitamín E (μmol/l) | 20,6 ± 1,5 | 30,0 ± 1,3** |
| > 30 | 5 % | 45 % |
| β-karotén (μmol/l) | 0,18 ± 0,02 | 0,21 ± 0,04 |
| > 0,4 | 5 % | 15 % |
| vitamín A (μmol/l) | 1,24 ± 0,07 | 1,49 ± 0,05* |
| > 2,2 | 0 % | 5 % |

Výsledky sú vyjadrené ako priemery ± SEM

* - P < 0,05; ** - P < 0,01

Riziko oxidačného stresu je menšie, ak plazmatická hodnota vitamínu C má vyššiu hodnotu než vitamínu E (Gey, 1998), čo súvisí s predpokladom dostatočnej ponuky vitamínu C na regeneráciu tokoferolu. Za podmienok pomeru vitamínov > 1 sa zabráňuje fungovaniu vitamínu E ako prooxidanta. Pomer vitamín C/vitamín E > 1 má 90 % nešportovcov vs. 70 % športovcov (tab. 3).

Tab. 3. Molárne pomery vitamínu E ku lipidovým parametrom a vitamínu C, výskyt nadprahových hodnôt

| | VESLÁRI | NEVESLÁRI |
|--|-------------|---------------|
| vitamín E/cholesterol (μmol/mmol) | 4,66 ± 0,31 | 7,44 ± 0,43** |
| > 5,2 | 30 % | 100 % |
| vitamín E/triacylglyceroly (μmol/mmol) | 23,3 ± 2,3 | 31,9 ± 3,1* |
| > 16 | 80 % | 90 % |
| vitamín C/vitamín E | 1,43 ± 0,17 | 1,69 ± 0,03* |
| > 1,0 | 70 % | 90 % |

Výsledky sú vyjadrené ako priemery ± SEM

* - P < 0,01; ** - P < 0,001; limity protektívnych hodnôt (Gey 1994; 1998; Krajčovičová-Kudláčková a kol., 2003)

Neveslári majú významne vyššiu hodnotu vitamínu E v 1 mmole lipidov. Nadprahová hodnota molárneho pomeru vitamín E/cholesterol predstavuje efektívnu ochranu LDL voči oxidácii. Bola nájdená u 100 % neveslárov vs. 30 % veslárov. Ako je známe, oxidačne modifikované LDL podporujú rozvoj aterosklerózy. Nadprahová hodnota molárneho pomeru vitamín E/triacylglyceroly predstavuje efektívnu ochranu PUFA voči oxidácii. Zistili sme významne vyššiu hodnotu molárneho pomeru u nešportovcov. Protektívne hodnoty malo 90% neveslárov vs. 80 % veslárov.

Výsledky hodnôt antioxidantných vitamínov v plazme napovedajú, že aktívni veslári majú v porovnaní s nešportovcami nedostatočný antioxidantný status, ktorý nie je schopný redukovať zvýšené riziko oxidačného stresu.

LITERATÚRA

1. Gey, K. F.: *Long-term adequacy of all major antioxidants, presumably in synergy with other vegetable-derived nutrients, may help to prevent early stages of cardiovascular disease and cancer, respectively.* Int. J. Vit. Nutr. Res., 65, 1994, 65-69.
2. Gey, K. F.: *Vitamins E plus C and interacting conutrients required for optimal health.* Biofactors, 7, 1998, 113-174.

3. Kimáková, T., Bernasovská, K., Pomfý, M.: *Oxidačný stres, výživa a civilizačné ochorenia*. In Životné podmienky a zdravie. Bratislava: ÚVZ SR, 2003. ISBN 80-7159-138-6, s. 117–119.
4. Krajčovičová-Kudláčková, M., Ursínyová, M., Blažíček, P., Spustová, V., Ginter, E., Hladíková, V., Klvanová, J.: *Free radical disease prevention and nutrition*. Bratisl. Med. J., 104, 2003, 64–68.
5. Krajčovičová-Kudláčková, M., Ursínyová, M., Spustová, V.: *Prevenia voľnoradikálových ochorení. 1. Antioxidačné stopové prvky*. Ateroskleróza, 6, 2002, 162–165.
6. Muchová, J. a kol.: *Lekárska chémia a toxikológia*. Bratislava: Lekárska fakulta UK, 2004. 152 s. ISBN 80-223-1934-1.
7. Valko, M., Morris, H., Mazur, M., Rapta, P., Bilton, R. F.: *Oxygen free radical generating mechanisms in the colon: Do the semiquinones of vitamin K play a role in the aetiology of colon cancer?* Biochem. Biophys. Acta, 1527, 2001, 161–166.

OXIDAČNÉ POŠKODENIE LIPIDOV, PROTEÍNOV A DNA U OSÔB S DOMINANTNOU KONZUMÁCIOU RASTLINNEJ POTRAVY

Martina Valachovičová, Marica Kudláčková
Viera Pauková

Slovenská zdravotnícka univerzita, Bratislava

Oxidačný stres je definovaný ako nerovnováha medzi pro-oxidantami alebo voľnými radikálmi na jednej strane a antioxidantami na strane druhej. Škodlivé účinky kyslíka sa prejavujú cez tvorbu voľných radikálov, ktoré sú toxické pre bunky (superoxidové anióny, hydroxylové radikály, peroxylové radikály, peroxid vodíka, hydroperoxydy a peroxinitritové anióny) (2). Voľné radikály sú zodpovedné za poškodenie buniek a ohrozenými bunkami sú bunky bunkových membrán, ktoré sú bohaté na polynenasýtené mastné kyseliny, senzitivne ku oxidácii. DNA tiež podlieha rôznym atakom reaktívnych produktov metabolizmu kyslíka. Poškodenie molekúl ako dôsledok oxidačného stresu sa zaraďuje ako zodpovedné za vznik a vývoj chronických, s vekom spojených ochorení, najmä kardiovaskulárnych a mnohých typov rakoviny (1).

Antioxidantom je každá látka, ktorá je schopná zabrániť oxidačnému poškodeniu molekúl alebo je schopná toto poškodenie opraviť. Sú vytvorené rôzne mechanizmy na ochranu pred škodlivým vplyvom voľných radikálov (1). Patria k nim endogénne antioxidanty (superoxid-dismutázy, H_2O_2 - odstraňujúce enzýmy, metalo-proteíny), ktoré sú neadekvátne kompletne chrániť molekuly a tak pre udržanie zdravia sú dôležité antioxidanty z potravy. Významná úloha patrí antioxidačným vitamínom. V dlhodobých epidemiologických a klinických štúdiách bol na základe korelácie medzi incidenciou ochorenia alebo rizikovými markermi pre ich genézu na jednej strane a plazmatickými hodnotami vitamínov na strane druhej určený ochranný limit plazmatických hodnôt vitamínov, nad ktorým hodnoty sú efektívne pre prevenciu ochorení spôsobených voľnými radikálmi (7). Ochranné hodnoty vitamínov môžu byť ľahko dosiahnuteľné správnym nutričným režimom. Výživa je kľúčovým environmentálnym faktorom ovplyvňujúcim incidenciu mnohých chronických ochorení (10,11). Ovocie, zelenina, rastlinné oleje, orešky, semená a celozrnné výrobky sú hlavné potravinové komponenty pre vitamín C, vitamín E a beta-karotén.

Náhodne vybraných 83 subjektívne zdravých neobéznych (BMI < 30) nefajčiacich žien veku 60–70 rokov (dobrovoľníci epidemiologickej štúdie procesov starnutia) bolo rozdelených do dvoch skupín. Skupinu dlhodobých vegetariánov (n = 45) tvorilo 20 lakto-ovo-vegetariánov, ktorí konzumovali dominantne rastlinnú potravu a prídávali mliečne výrobky a vajíčka a 25 semi-vegetariánov s prídavkom bieleho mäsa a rýb 1-krát týždenne a me-

nej. Nevegetariánska (kontrolná) skupina pozostávala z 38 osôb bežnej populácie na tradičnom zmiešanom stravovaní. Charakteristika skupín je uvedená v tab.1.

Krv bola odoberaná nalačno štandardným spôsobom. Plazmatické koncentrácie vitamínov C, E a beta-karoténu boli stanovované HPLC metódami (3, 14). EDTA bol použitý ako antikoagulant. Konjugované diény mastných kyselín a proteín-karboonyly v plazme boli určované spektrofotometricky (15, 18). Alkalická comet assay modifikovaná aplikáciou odpovedajúcich enzýmov bola použitá na stanovenie hodnôt DNA zlomov, oxidovaných purínov a oxidovaných pyrimidínov v izolovaných lymfocytoch (4). Príjem vitamínov, minerálnych a stopových prvkov bol len v prirodzenej forme (žiadna suplementácia). Na finálne vyhodnotenie výsledkov bol použitý Studentov *t*-test.

Vo vegetariánskej skupine vz nevegetariáni boli namerané signifikantne redukované hodnoty oxidovaných purínov, oxidovaných pyrimidínov a konjugovaných diénov mastných kyselín. Vegetariánske plazmatické hodnoty vitamínu C a beta-karoténu ako aj na lipidy štandardizovaná hodnota vitamínu E boli významne zvýšené. Priemerná hodnota vitamínu C v plazme je u vegetariánov vyššia ako 50 µmol/l, hodnota beta-karoténu vyššia ako 0,4 µmol/l, t. zn. sú to ochranné hodnoty pre účinnú prevenciu ochorení spôsobených voľnými radikálmi. U nevegetariánov sú hodnoty oboch vitamínov pod uvedenými číslami, teda menej účinné v prevencii ochorení. Plazmatické hodnoty vitamínu E sú vyššie ako 30 µmol/l u oboch hodnotených skupín. Vegetariánska skupina má významne redukovanú hodnotu lipidovej peroxidácie napriek vyššiemu príjmu polynenasýtených mastných kyselín (24,8 ± 0,8 g/deň vz 18,6 ± 0,9 g/deň, P < 0,001), ktoré majú vyššiu schopnosť oxidovateľnosti. Tento nález je dôsledkom účinnej antioxidantnej ochrany (tab. 1). Vitamín C a beta-karotén sú derivované z ovocia a zeleniny. Konzumácia týchto potravinových komodít je významne vyššia u vegetariánov (ovocie 383 ± 25 g/deň vz 251 ± 19 g/deň, P < 0,001; zelenina 293 ± 23 g/deň vz 190 ± 15 g/deň, P < 0,001).

Epidemiologické štúdie priniesli poznatky, že potrava obsahujúca antioxidanty, ale nie veľmi bohatá na kalórie, najmä ovocie, zelenina a cereálie pomáhajú udržiavať zdravie človeka a predchádzať ochoreniam (8). Je dokázané aj v predkladanej práci, že antioxidantné vitamíny môžu redukovať oxidačné poškodenie, ale údaje pre priaznivé účinky vitamínových suplementov sú čiastočne nekonzistentné. Je evidentné, že príjem antioxidantov konzumáciou na antioxidanty bohatej potravy je efektívnejší pre redukciu DNA poškodenia než suplementácia jednotlivými antioxidantami (17). Vysoké dávky antioxidantných suplementov vo všeobecnosti nie sú dobré a môžu spôsobiť poškodenie. Zdravotné benefity príjmu ovocia a zeleniny sa prejavujú pri konzumácii aspoň 3 dávok za deň (9), odporúčaná optimálna konzumácia je 5 - 6 dávok/deň. Zloženie stredomorskej alebo vegetariánskej stravy je predurčené znižovať riziko chronických ochorení (6, 10, 12, 19).

Tab.1. Charakteristika skupín, produkty oxidačného poškodenia lipidov, proteínov, DNA a plazmatické koncentrácie antioxidantných vitamínov

| | Nevegetariáni | Vegetariáni |
|---|---------------|----------------|
| n | 38 | 45 |
| vekovú rozpätie (r) | 60 - 70 | 60 - 70 |
| priemerný vek (r) | 63,4 ± 0,5 | 65,2 ± 0,5 |
| BMI (kg.m ⁻¹) | 26,7 ± 0,4 | 24,6 ± 0,5** |
| BMI rozpätie (kg.m ⁻¹) | 21,7 - 29,8 | 18,7 - 28,7 |
| doba vegetarianizmu (r) | - | 10,3 ± 0,8 |
| konjugované diény mastných kyselín (µmol/l) | 1,60 ± 0,11 | 1,12 ± 0,08*** |
| proteín-karboonyly (µmol/l) | 96,8 ± 9,5 | 87,7 ± 6,8 |
| DNA zlomy (AU) | 55,0 ± 3,1 | 54,1 ± 3,5 |
| oxidované puríny (AU) | 58,8 ± 5,4 | 44,6 ± 4,2* |
| oxidované pyrimidiny (AU) | 57,3 ± 4,3 | 42,5 ± 4,8* |
| vitamín E (µmol/l) | 37,4 ± 1,6 | 36,2 ± 1,5 |
| celkový cholesterol (mmol/l) | 5,82 ± 0,24 | 5,20 ± 0,09** |
| triacylglyceroly (mmol/l) | 1,54 ± 0,13 | 1,29 ± 0,07* |
| vitamín E/celkový cholesterol+ triacylglyceroly (µmol/mmol) | 5,09 ± 0,15 | 5,63 ± 0,19* |
| vitamín C (µmol/l) | 45,1 ± 3,5 | 58,2 ± 2,5** |
| beta-karotén (µmol/l) | 0,24 ± 0,03 | 0,56 ± 0,06*** |

Výsledky sú priemery ± SEM

* - P < 0,05; ** - P < 0,01; *** - P < 0,001

Celozrnné výrobky, strukoviny, ovocie a zelenina redukujú riziko mnohých typov rakoviny, najmä rakoviny tráviaceho traktu, snáď hlavne pre vysoký obsah vlákniny (5). Vlákna zvyšuje obsah stolice a znižuje tranzitný čas, tým redukuje vystavenie črevného epitelu mutagénom. V hodnotenej skupine vegetariánov bol príjem celozrnných produktov 115,6 ± 10,9 g/deň vz 62,4 ± 11,7 g/deň (P < 0,01), príjem strukovín 26,9 ± 3,2 g/deň vz 17,8 ± 2,8 g/deň (P < 0,05) a príjem vlákniny 35,0 ± 1,8 g/deň vz 26,0 ± 1,3 g/deň (P < 0,001). Flavonoidy, izotiokyanáty a alylsulfidy v ovoci a zelenine sú modulatormi enzýmového systému zabezpečujúceho metabolizovanie karcinogénov (19). Antioxidantné vitamíny C a E a polyfenoly inhibujú tvorbu nitrozoamínov, ktoré sú potenciálne karcinogénne (13). Zvýšená aktivita glukagónu dôsledkom vyššej konzumácie rastlinných bielkovín môže viesť k poklesu IGF-1 aktivity (insulin-

like growth factor) a tým môže byť vývoj rakoviny retardovaný (16). V hodnotených skupinách populácie bol príjem rastlinných bielkovín u vegetariánov $50,3 \pm 2,7$ g/deň vz $40,2 \pm 2,3$ g/deň ($P < 0,01$).

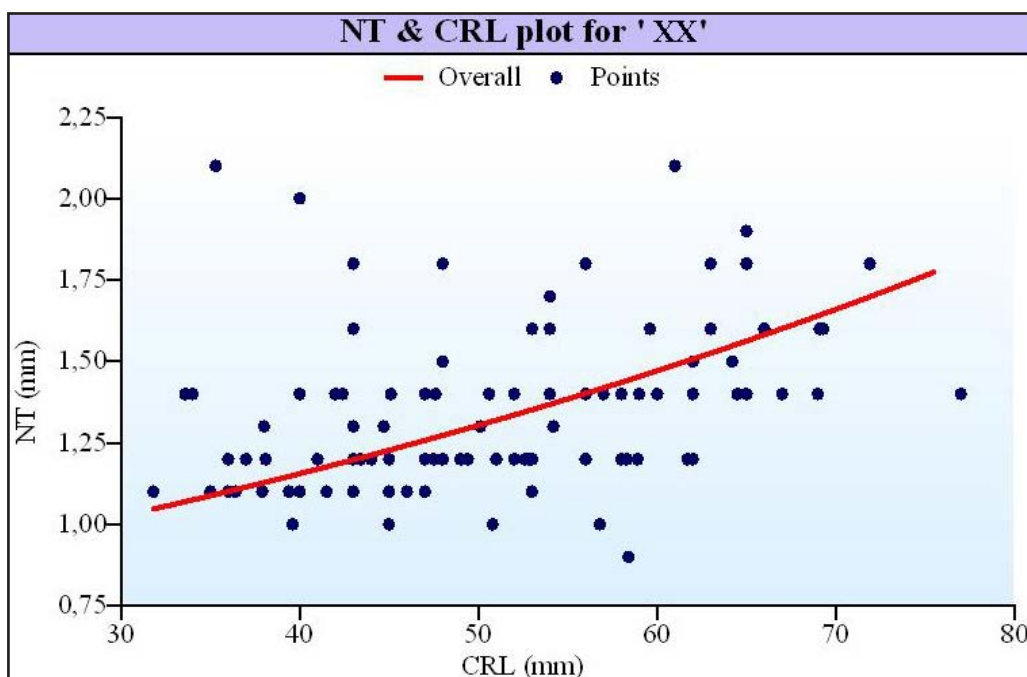
Výsledky redukovaných hodnôt oxidačných produktov lipidov a DNA v dôsledku lepšieho antioxidantného statusu u osôb s dominantnou konzumáciou rastlinnej potravy napovedajú, že vegetariánske stravovanie môže predchádzať oxidačnému stresu a tým môže byť prevenciou voči ochoreniam spôsobených voľnými radikálmi.

Práca bola vytvorená realizáciou projektu „Výskum zdravotných efektov rastlinnej potravy a možnosti redukcie zdravotných rizík“ ITMS kód: 26240220022, na základe podpory operačného programu „Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja“.

LITERATÚRA

1. Benzie, I.F.: *Evolution of antioxidant defence mechanisms*. Eur. J. Nutr., 39, 2000, 53–61.
2. Bonnefoy, M., Drai, J., Kostka, T.: *Antioxidants to slow aging, facts and perspectives*. Presse Med., 31, 2002, 1174–1184.
3. Cerhata, D., Bauerová, A., Ginter, E.: *Determination of ascorbic acid in serum by HPLC and its correlation to spectrophotometric determination*. Ces. Slov. Farm., 43, 1994, 166–168.
4. Collins, A. R., Dušinská, M., Gedik, C. M. *et al.*: *Oxidative damage to DNA, do we have a reliable biomarker?* Environ. Health Perspect., 104, 1996, 465–469.
5. Fraser, G. E.: *Associations between diet and cancer, ischemic heart disease and all-cause mortality in non-Hispanic white California Seventh-day Adventists*. Am. J. Clin. Nutr., 70, 1999, 532.
6. Gallus, S., Bosetti, C., LaVecchia, C.: *Mediterranean diet and cancer risk*. Eur. J. Cancer Prev., 13, 2004, 447–452.
7. Gey, K. F.: *Ten year retrospective on the antioxidant hypothesis of arteriosclerosis, threshold plasma levels of antioxidant nutrients related to minimum cardiovascular risk*. J. Nutr. Biochem., 6, 1995, 206–236.
8. Gutteridge, J. M. C., Halliwell, B.: *Antioxidants – molecules, medicines, and myths*. Biochem. Biophys. Res. Comm., 393, 2010, 561–564.
9. Hung, H. Y., Helzlsouer, K. J., Appel, L. J.: *The effects of vitamin C and vitamin E on oxidative DNA damage, results from a randomized controlled trial*. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 9, 2000, 647–652.
10. Kapiszewska, M.: *A vegetable to meat consumption ratio as a relevant factor determining cancer preventive diet. The Mediterranean versus other European countries*. Forum Nutr., 59, 2006, 130–153.
11. Key, T. J., Appleby, P. N., Rosell, M. S.: *Health effects of vegetarian and vegan diets*. Proc. Nutr. Soc., 65, 2006, 35–41.
12. Krajčovičová-Kudláčková, M.: *Health benefits of plant food*. Klin. Biochem. Metab., 13, 2005, 168–171.
13. Kris-Etherton, P. M., Hecker, K. D., Bonanone, A. *et al.*: *Bioactive compounds in foods, their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer*. Am. J. Med., 113, 2002, 71–88.
14. Lee, B. L., Chua, S. C., Ong, H. Y. *et al.*: *HPLC method for routine determination of vitamins A and E, and beta-carotene in plasma*. J. Chromatogr., 581, 1992, 41–43.
15. Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N. *et al.*: *Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins*. Methods Enzymol., 186, 1990, 464–479.
16. McCarty, M. F.: *Up-regulation of IGF binding protein-1 as an anticarcinogenic strategy, relevance to caloric restriction, exercise, and insulin sensitivity*. Med. Hypotheses, 48, 1997, 297–308.
17. Moller, P., Loft, S.: *Dietary antioxidants and beneficial effect on oxidatively damaged DNA*. Free Rad. Biol. Med., 41, 2006, 388–415.
18. Recknagel, E., Glende, E. A.: *Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes*. Methods Enzymol., 105, 1984, 331–337.
19. Sabaté, J.: *The contribution of vegetarian diets to human health*. Forum Nutr., 56, 2003, 218–220.

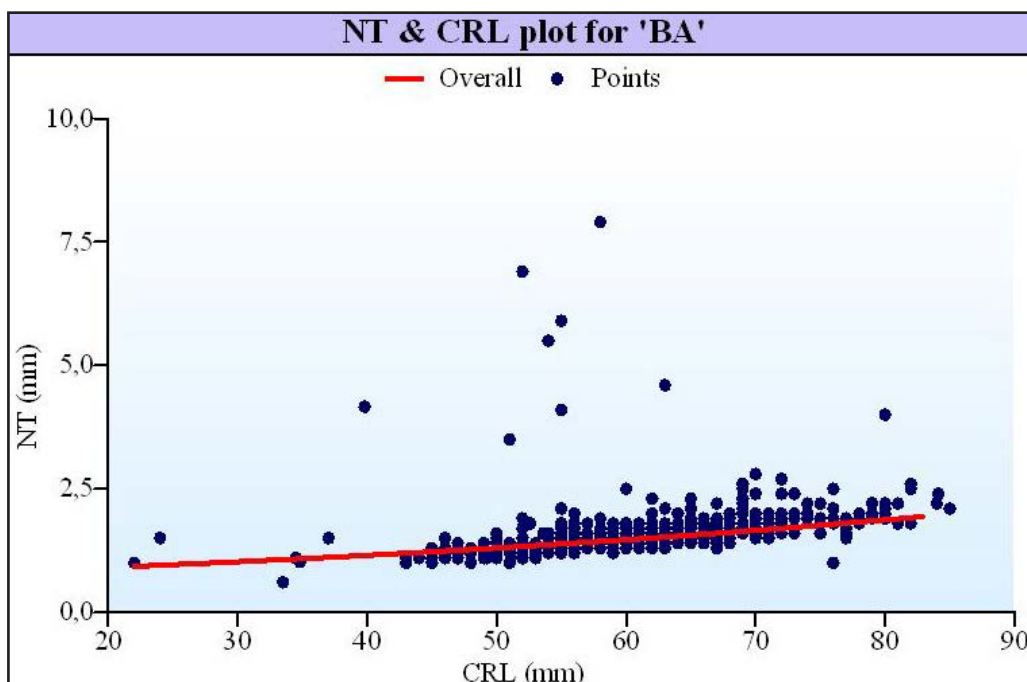
PRÍLOHY



Obrázok 1. Audit merania NT lekárom, ktorý nemá certifikát FMF

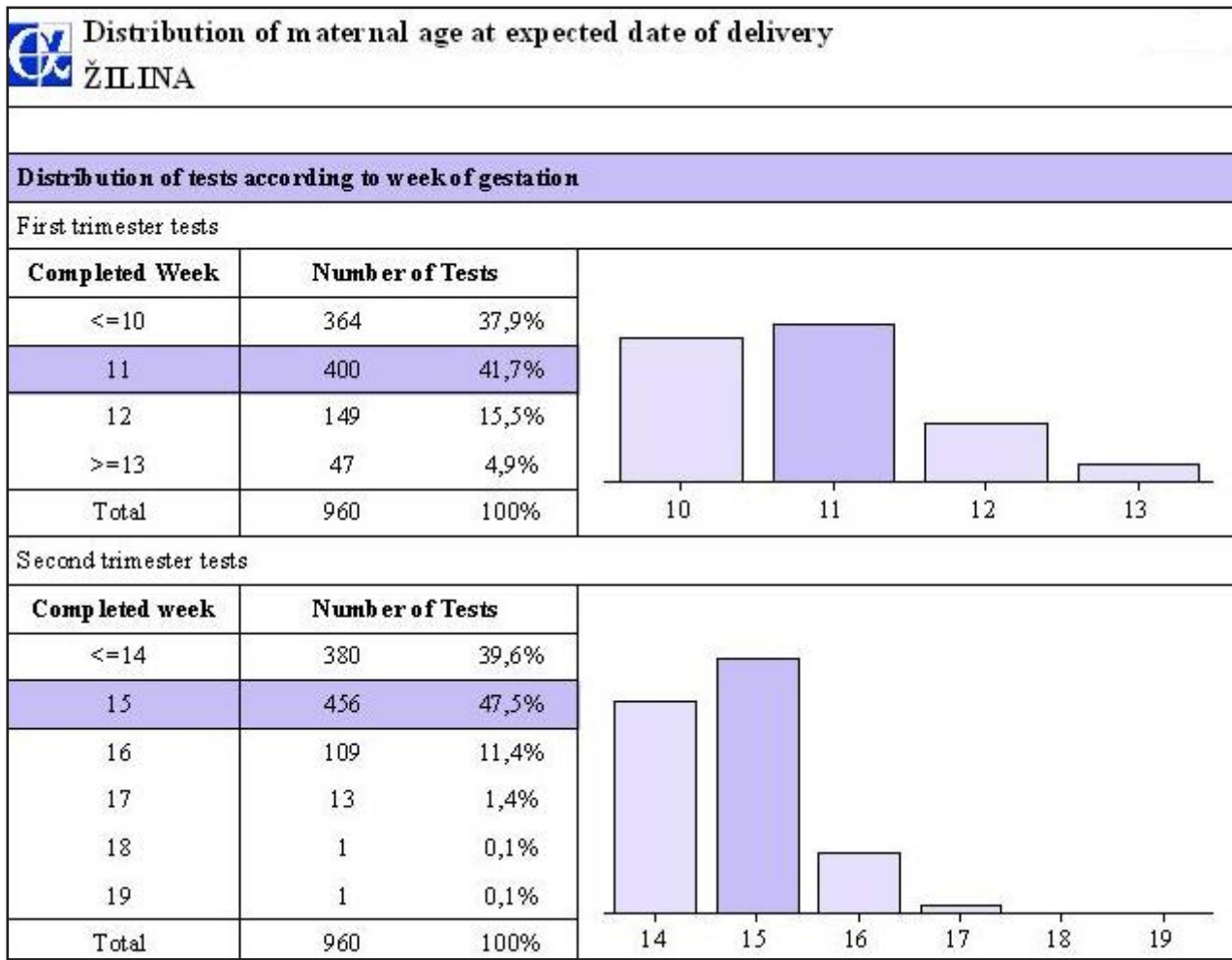
(The Fetal medicine foundation), výstup z programu ALPHA za obdobie 1. 11. 2009–15. 8. 2010.

Meranie NT sa môže vykonať len ak je dĺžka plodu meraná ako CRL viac ako 45 mm. Obrázok dokazuje, že lekár nameral nesprávne NT u viac ako 1/3 plodov. Numerická hodnota rozsahu merania NT je medzi 1–2 mm, je nízky nárast veľkosti NT na týždeň gravidity, nebola zistená ani jedna hodnota nad 2,5 mm

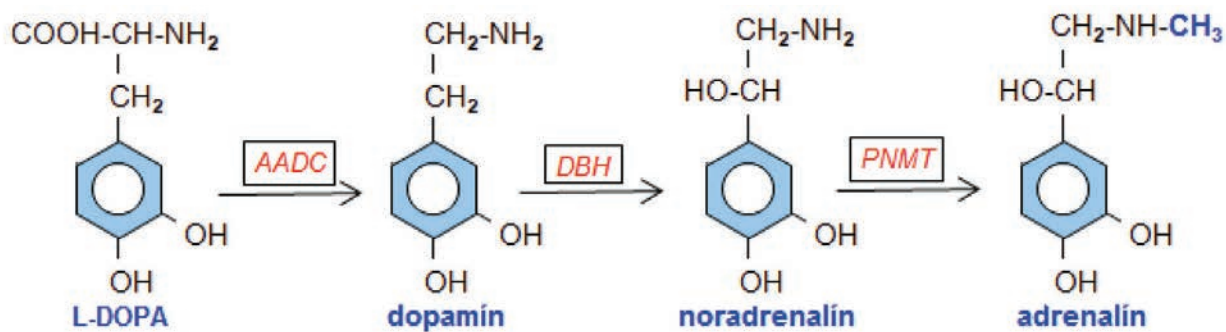


Obrázok 2. Audit merania NT lekárom, ktorý má certifikát FMF (The Fetal medicine foundation), pravidelne ho audituje. Výstup z programu ALPHA za rovnaké obdobie trvania projektu (1. 11. 2009–15. 8. 2010).

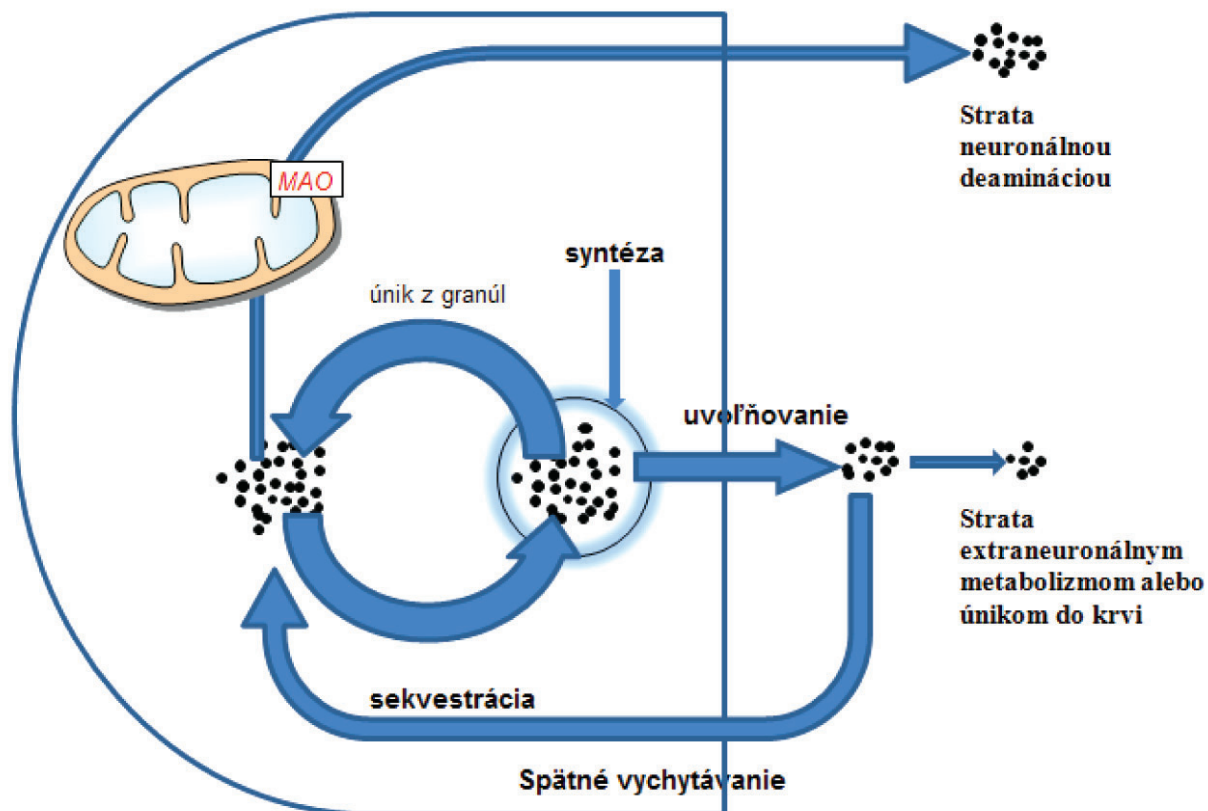
Meranie NT vykonal lekár iba ak dĺžka plodu meraná ako CRL bola viac ako 45 mm (7× zanesená chybná hodnota merania pri nastavovaní programu). Je dostatočný počet meraní na zostavenie regresnej krivky. Vidieť dostatočný nárast veľkosti NT s rastom CRL. Lekár zistil 9× hodnotu NT vyššiu ako 3 mm



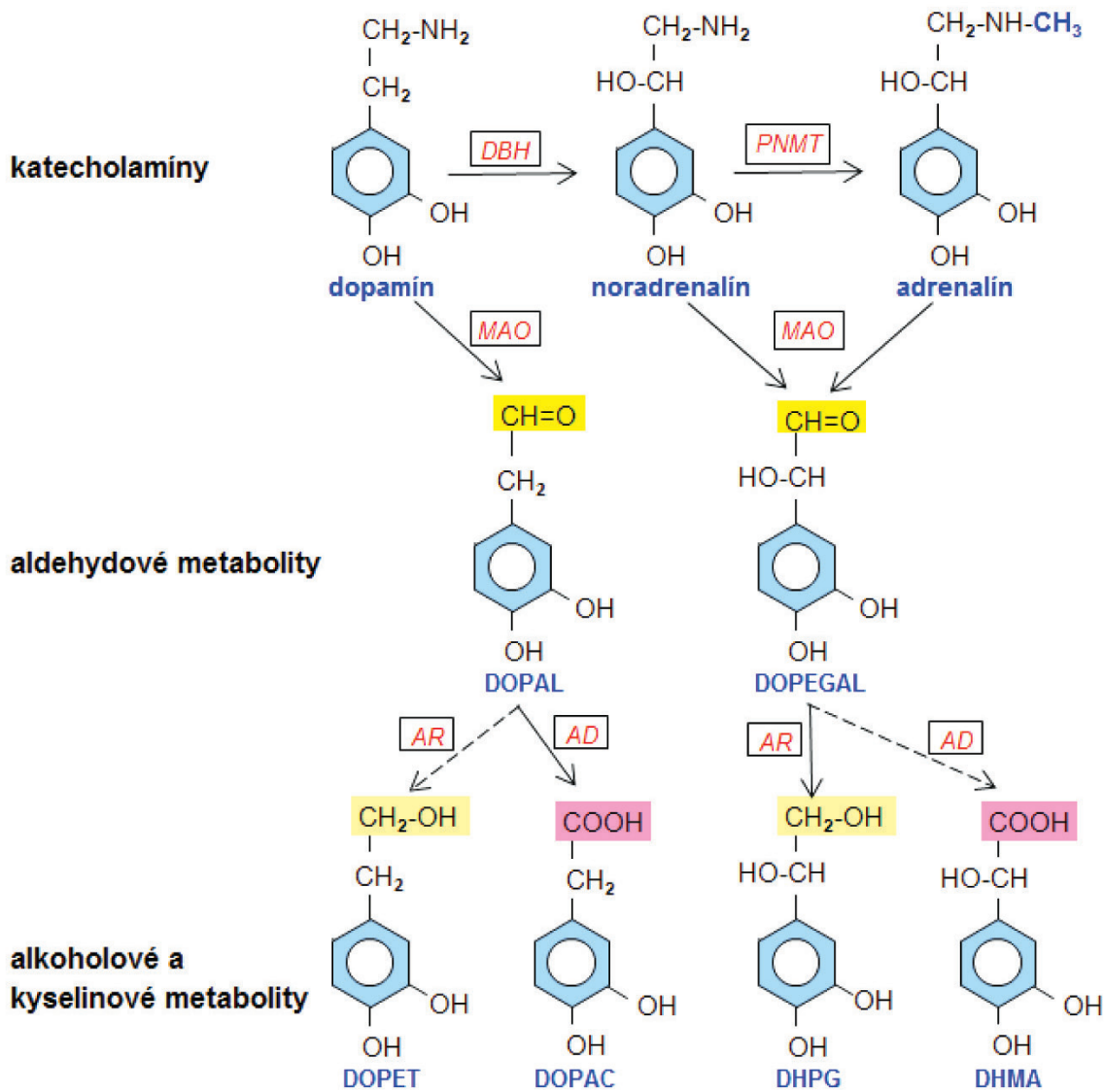
Obrázok 3. Charakteristika súboru podľa času odberu vzorky krvi v I. trimestri gravidity (1. 11. 2009-15. 8. 2010)



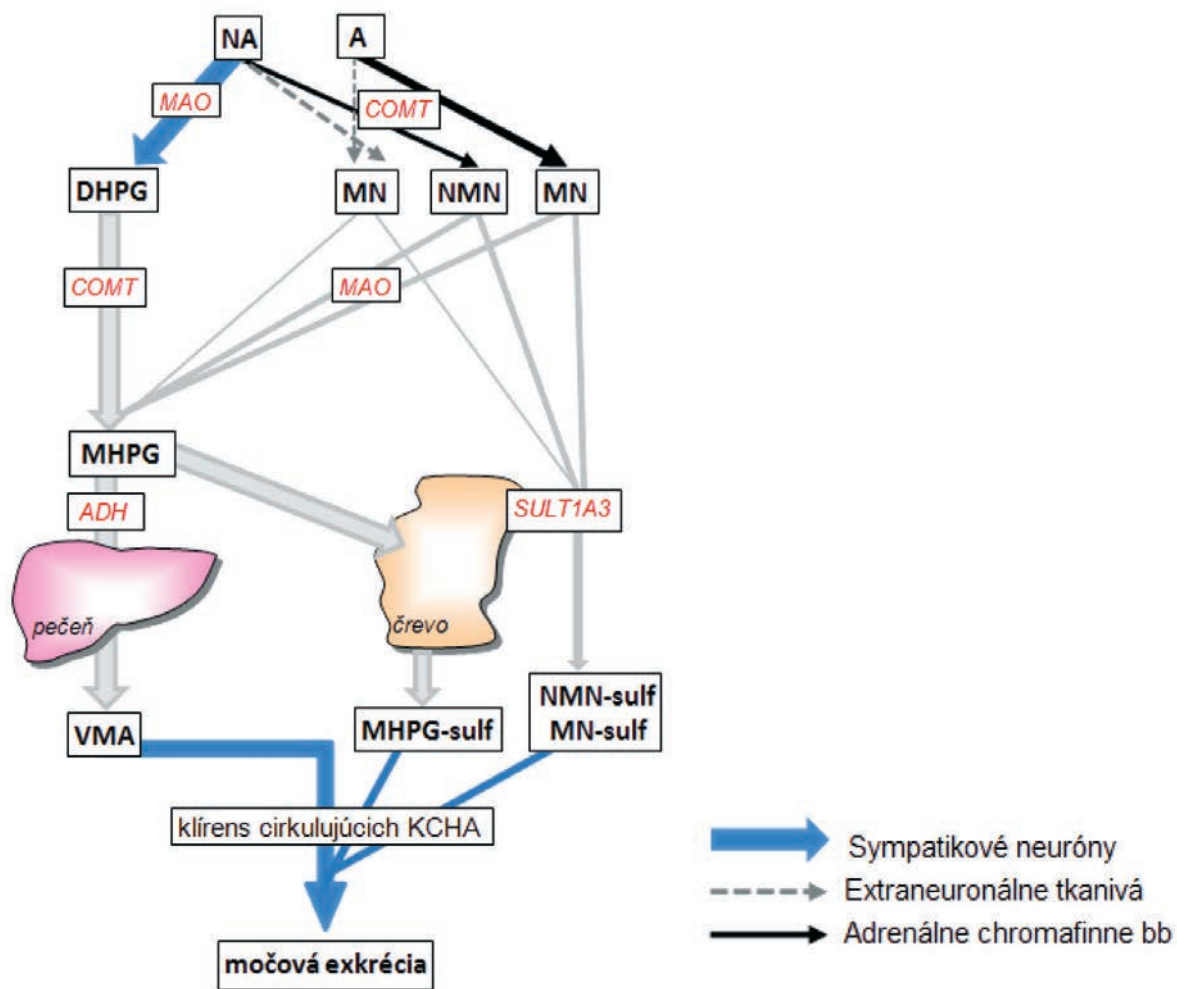
Obr. 1 Štruktúra katecholamínov



Obr. 2. Schéma dynamickej rovnováhy v bunkách syntetizujúcich KCHA



Obr. 3. Schéma oxidatívnej deaminácie KCHA na aldehydové intermediáty a následné metabolity
 DBH - dopamín-beta-hydroxyláza, PNMT - fenoletanolamín-N-metyltransferáza, DOPAL - 3,4-dihydroxyfenylacetaldehyd,
 DOPEGAL - 3,4-dihydroxyfenylglykolaldehyd, AD - aldehyddehydrogenáza, AR - aldehydreduktáza,
 DOPET - 3,4-dihydroxyfenyletanol, DOPAC - kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová, DHPG - 3,4-dihydroxyfenylglykol,
 DHMA - kyselina dihydroxymandľová



Obr. 4. Schéma hlavných metabolických ciest odbúravania noradrenalínu (NA) a adrenalínu (A)
 DHPG - 3,4-dihydroxyfenylglykol, MHPG - 3-metoxi-4-hydroxyfenylglykol, MN - metanefín, NMN - normetanefín,
 VMA - kyselina vanilmandľová, ADH - alkoholdehydrogenáza, SULT1A3 - sulfotransferáza



Produkty pre laboratórnu diagnostiku

Mikrobiológia

- Testovanie citlivosti ATB a ATM, kamerový systém **ADAGIO**[®]
- Latexové testy (streptokoky, stafylokoky, meningokoky)
- Rýchle identifikačné testy (mykoplazmy, neissérie)
- Mykologické diagnostiká
- Kultivačné pôdy, chromogénne médiá
- Antibakteriálne séra

Imunohematológia

- ABO, Rh typizácia krvných skupín
- Typizácia ďalších skupinových systémov
- Systémy stĺpcovej gélovej aglutinácie
- Pomocné a doplnkové materiály

Viroológia a infekčná sérológia

- Diagnostické súpravy
 - HIV 1/2
 - Hepatitídy A, B, C vrátane markerov
 - Syfilis, toxoplazmóza, chlamýdie, rubeola, CMV, EBV, H. pylori, HSV, borrelié...
- Prístrojová technika
 - Automatický ELISA analyzátor **EVOLIS**[™]
 - Premývačky, ELISA readre, inkubátory

Kontrola kvality

- Systém externej kontroly kvality **EQAS**[™]
- Materiály pre internú kontrolu kvality **Liquichek**[™], **Lyphocheck**[™], **VIROTROL**[®], **AmpliTrol**[™]
- Sérokonverzné a antigénové panely,
- Systém vlastných elektronických príbalových letákov **My eInserts**[™]
- Software pre spravovanie QC dát **UNITY Real Time**[®], **Westgard Advisor**[™], **UnityWeb**[®], **Unity Desktop**[®], **UnityConnect**[™], **WebConnect**[™]

Monitorovanie diabetu

- Systémy na testovanie glykovaného hemoglobínu, **VARIANT**[™] **II Turbo**, **VARIANT**[™] **II**, **D-10**[™]
- POC systém **In2i A1c**

Autoimunita

- Systémový autoimunitný IFA a EIA screening
- Orgánovo špecifické IFA testovanie
- IFA automatizácia – **PhD**[™] **Ix System**
- Multiplexová technológia **BioPlex**[™] **2200 System**

BIO-RAD

Sabinovská 10
821 08 Bratislava,
mobil: 0905 531649-51
www.bio-rad.com
www.qcnet.com

... pre komplexne dokonalé laboratórium sú dôležité aj detaily



SUPER GL 2

najpoužívanejšie glukóзовé analyzátory

NOVINKA



ADAMS A1c

HPLC analyzátor glykovaného hemoglobínu

Eurolab Lambda a.s.

Špecialista na

- automatizovanú močovú analýzu
- glukóзовé analyzátory
- osmometriu
- analýzu glykovaného hemoglobínu (HPLC)
- okultné krvácanie



Osmomat 030 osmometer
rokmí preverená kvalita



močová linka **Iris**
viac ako 95 inštalácií v SR a ČR