



LABORATÓRNA DIAGNOSTIKA

Slovenská spoločnosť klinickej biochémie
Slovak Society of Clinical Biochemistry

Recenzovaný časopis pre pracovníkov diagnostických laboratórií

Číslo 2/2020

Ročník XXV.



LABORATÓRNA DIAGNOSTIKA

Slovak Society of Clinical Biochemistry
Časopis pre pracovníkov diagnostických laboratórií

Číslo 2/2020

Ročník XXV.

PRESEDA REDAKČNEJ RADY

Hedviga Pivovarníková

ODBORNÝ REDAKTOR

Oliver Rác

REDAKČNÁ RADA

Ján Balla
Pavel Blažíček
Beáta Bolerázska
Dušan Dobrota
Eva Ďurovcová
Michal Farkaš
Vladimír Heriban
Beáta Hubková
Mária Kačányiová
Katarína Lepejová
Daniel Magula
Angela Molčányiová
Jana Netriová
Katarína Šebeková
Ladislav Turecký
Marek Zálešák

Laboratórna Diagnostika
Vydáva Slovenská spoločnosť klinickej biochémie pri SLS
web: www.sskb.sk
ISSN 1335-2644
EV 5929/20
Vychádza: 2-krát ročne
nepredajné

december 2020

OBSAH

PIVOVARNÍKOVÁ, H.: ÚVODNÍK.....	5
BLAŽÍČEK, P., LÁNGOŠ, J., WEISMANOVÁ, E.: MNOHOPOČETNÁ ENDOKRINNÁ NEOPLÁZIA TYPU 2A A 2B.....	11
RÁCZ, O.¹, SOMOŠ, A.², FEKETEOVÁ, A.³, KNAPKOVÁ, M.: CYSTICKÁ FIBRÓZA – POKROKY V LIEČBE NAJČASTEJŠEJ MONOGÉNOVEJ CHOROBY	19
GAŠKO, R., HEFLER, M.: ŠTANDARDIZOVANÉ POROVNÁVANIE ROVNÍC NA STANOVENIE LDL CHOLESTEROLU – METODICKÁ ŠTÚDIA.....	25
KAŠKO, M., ORAVEC, S.: HDL PROFIL JEDINCOV S ATEROSKLEROTICKÝM POŠKODENÍM PERIFÉRNÝCH CIEV	35
ORAVEC, S., JEDINÁ, V., ŽITŇANOVÁ, I., GRUBER, K., DOSTAL, E.: MALÉ DENZNÉ LDL U OSÔB S PORUCHOU METABOLIZMU LIPOPROTEÍNOV	43
KAJABA, IGO: VÝVOJ BIOCHEMIZÁCIE EPIDEMIOLOGICKÝCH VÝSKUMOV STAVU VÝŽIVY A PREVALENCIE NEINFEKČNÝCH CHORÔB V OBYVATELSTVE SLOVENSKA.....	47
SOBOLOVÁ, V., NAGY, V., DUBAYOVÁ, K., MAREKOVÁ, M.: PROBLÉMY A PERSPEKTÍVA RUTINNEJ NEINVAZÍVNEJ DIAGNOSTIKY NÁDOROV MOČOVÉHO MECHÚRA NA MOLEKULOVEJ ÚROVNI	54
VEČURKOVSKÁ, I., MAŠLANKOVÁ, J., STUPÁK, M.: ANALYTICKÉ MOŽNOSTI ZYMOGRAFIE V KLINICKEJ PRAXI	64



ÚVODNÍK

Aktivity SSKB od poslednej odbornej akcie LABKVALITA 2019 (po prvýkrát pod záštitou EFLM) a počas pandémie koronavírusu

*Vážení a milé kolegyně a kolegovia,
vážení členovia Slovenskej spoločnosti
klinickej biochémie!*

*Druhé tohtoročné číslo Laboratórnej diagnostiky sa
k Vám dostáva koncom roka 2020.*

*Ukončením odbornej akcie LABKVALITA 2019 v októbri
minulého roka sa výbor SSKB pripravoval na organizova-
nie ďalšej veľkej odbornej akcie, akou mal byť XIV. Kon-
gres Slovenskej spoločnosti klinickej biochémie plánovaný
v termíne 11.–13. októbra 2020 v hoteli Permon, Podban-
ské. Účasť na tomto kongrese potvrdila aj súčasná výkon-
ná prezidentka EFLM (Európska federácia klinickej ché-
mie a laboratórnej medicíny) prof. Ana-Maria ŠIMUNDIĆ
z Chorvátska. Tento kongres mal byť jej prvou odbornou
medzinárodnou aktivitou vo funkcii výkonnej prezidentky
EFLM práve na Slovensku, na ktorej by sa aktívne podie-
ľala svojou prednáškou tematicky zameranou na oblasť,
v ktorej nielen aktívne pracuje, ale ju aj dlhodobo odborne
usmerňuje, a to na preanalytickú časť celkového procesu
vyšetrovania a jej úskalí nielen mimo laboratória, ale aj
v ňom samotnom.*

*10. februára 2020 v rámci mailovej komunikácie za-
slala názvy svojich dvoch úvodných prednášok, a to prvú
v mene EFLM adresovanú našej odbornej spoločnos-*

*ti a v druhej sa chcela zamerať na „Odporúčania EFLM
na manažment kvality v preanalytickej fáze“. Výbor SSKB
pripravoval návrhy a pozvania aj pre ďalších významných
zahraničných hostí. Naša radosť s účasťou prezidentky
EFLM bola predčasná, nakoľko 6. 3. 2020 sme mali už aj
na Slovensku potvrdený prvý prípad ochorenia COVID-19,
a tak sme museli prispôbiť tejto novej situácii aj všet-
ky naše rozbehnuté aktivity a postupne presúvať na nové
možné termíny v roku 2021. Nový termín pre **XIV. kongres
SSKB** sme stanovili na **10.–12. októbra 2021** na pôvodne
oznámenom mieste konania (hotel Permon, Podbanské).*

*Na webovej stránke SSKB sme avizovali ďalšiu odbor-
nú akciu, akou malo byť „**Fórum medicínskej diagnostiky
2020 – Inovácia prostredníctvom medicínskej hodnoty
a laboratórnej efektivity**“ usporiadanej v hoteli Partizán,
Tále, plánovanú na 19.–20. 3. 2020. Kompletný odborný
program podujatia bol už pripravený, ale z dôvodu hrozby
ovplyvnenia zdravia účastníkov podujatia koronavírusom
a na základe odporúčaní Virologického ústavu BMC SAV
a ÚVZ SR – nevyhľadávať miesta s vysokou hustotou ľudí,
ak to nie je nevyhnutné a obmedziť cestovanie na vedecké
konferencie a organizovanie konferencií do času, kým
sa neujasní epidemiologická situácia, sa organizátori už
3. 3. 2020 rozhodli preložiť podujatie na iný termín. O čase
a mieste podujatia budú všetci členovia SSKB, ale aj iných
odborných spoločností včas informovaní. Veríme, že táto*

skutočnosť neovplyvní záujem o toto odborné podujatie, podporené edukačným grantom firmy Roche Slovensko.

Výbor SSKB aktívne sledoval všetky dostupné usmernenia a odporúčania MZ SR, ÚVZ SR, Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO), ale aj medzinárodných odborných spoločností (už spomínaná EFLM, tiež IFCC (Medzinárodná federácia klinickej chémie a laboratórnej medicíny) a ďalšie odborné zdroje.

Chronologicky uverejňoval na webovej stránke SSKB aktuálne **usmernenia WHO** pre laboratóriá testujúce na prítomnosť SARS-COV-2 (prehľad laboratórnej diagnostiky, výpovedná hodnota testov, požiadavky na biosafety level), **infografiky** pre verejnosť vytvorené odborom ŠPDTP Ministerstva zdravotníctva SR/napr. Osoby s vyšším rizikom ochorenia COVID-19, Pomoc sebe a druhým COVID-19, Čo robiť, ak ste chorý COVID-19, 10 odporúčaní, keď ste doma COVID-19. Výbor SSKB publikoval aj **edukačnú prezentáciu** „Zdravie je vo Vašich rukách“.

Na webovej stránke SSKB je publikovaných aj pár múdrych myšlienok od prof. Westgarda: **ŠPRINTOM DO MARATÓNU: KVALITA LABORATÓRNEHO TESTOVANIA V ČASE KRÍZY COVID-19.**

Z anglického originálu *Sprinting into a Marathon: Striving for Quality in the Covid19 Crisis* preložil Ján Balla 14.4.2020. Publikované s láskavým dovolením S. Westgarda 15.4.2020, z ktorého časť si dovoľm citovať:

Na úvod parafráza z filmu *Up in the Air* (oficiálny preklad Lietam v tom). Hlavným hrdinom je šéf spoločnosti (hrá ho George Clooney), ktorá sa zaoberá podnikovou optimalizáciou, ale v skutočnosti je profesionálnym vyhadzovačom z práce, nepretržite lieta po Spojených štátoch a znižuje stavy vo firmách, ktorých šéfovia nemajú dosť odvahy na to, aby svojich ľudí prepustili sami. Na začiatku filmu šéf spoločnosti začína príhovor so svojimi zamestnancami s jasným vyhlásením: „Maloobchodníci klesli o 20 percent, automobilový priemysel je na dlažbe, trh s bývaním kolabuje... Je to jedno z najhorších období zaznamenaných v Amerike.“ Potom sa zastaví, nadýchne sa a povie. „**Toto je náš okamih!**“ Je to čierny humor? Ruku na srdce, po rokoch škrtania laboratórií, šetrenia na laboratórnych testoch, krátenia platieb na laboratórnych skúškach, znižovania stavov laboratórnych pracovníkov, šetrenia na úkor kvality, svet znenazdajky čelí nebezpečnému vírusu a laboratóriá zažívajú svoj okamih. **Teraz laboratóriá a odborníci v laboratóriách demonštrujú svoj**

zásadný význam pre zdravotnú starostlivosť, pre skutočné prežitie miliónov ľudí. Želali by sme si, aby čas výslnia bol pre laboratóriá vhodnejší, ale ako to už býva, tento je náš. Predtým sme si mysleli, že jediná príležitosť, kedy by zdravotnícky sektor a široká verejnosť mohli uznať význam a dôležitosť laboratórií je nejaký druh štrajku, aby sa laboratórne testovanie stalo náhle nedostupným. Teraz si však úprimne želáme, aby pandémia nebola spôsobom, akým dosiahneme naše uznanie.

Ale sme tu, vo svete zúfalej potreby našich služieb.

Najprv sa ale musíme odpútať od politiky. Každý, kto tvrdí, že je to iba podvod, chrípka alebo zlá chrípka, to pravdepodobne povedal z bezpečnej vzdialenosti v nedotknutej časti sveta. Už ich veľa nezostalo. Čoskoro tieto bezpečné zóny nebudú existovať. Čína by nenazvala to, čo sa im stalo, hoaxom. Južná Kórea by neoznámila svoje skúsenosti ako jednoduchý prípad chrípky. Taliansko a Španielsko práve teraz zápasia s niečím oveľa horším ako so zlou chrípkou. Mesto New York čelí mnoho násobne väčšiemu počtu obetí ako po útoku z 9/11. Čísla, veda a všetky poznatky poukazujú na skutočnú globálnu pandémiu.

Ako odborníci v laboratóriách sme na tento okamih jedinečne vybavení svojimi schopnosťami, svojou spôsobilosťou, svojou profesionálnou etikou a preukázanou oddanosťou. Vždy sme vedeli, aké dôležité sú naše výsledky, aké kritické sú pre správnu liečbu a správneho pacienta. Tento rok s Covid-19, **si svet uvedomí, aké dôležité sú laboratórne výsledky.**

Laboratóriá sa zaoberajú faktami. Kým nebude vakcína **my sme autori pravdy** („truth tellers“) a **my sme jedinou cestou z tejto krízy.** Bez rozsiahleho laboratórneho testovania, nielen PCR, ale aj sérológie, so sledovaním kontaktov a izoláciou, nedokáže vláda vyriešiť, kedy, čo a koľko môže znova otvoriť a obnoviť to, čo sa stane novým normálnym životom. Pretože tento vírus je zákerný, skrýva sa v ľuďoch, ktorí sú asymptomatickí a používa ich ako tajné skrýšy a rozmietače a čiha v ľuďoch celé týždne pred tým, než sa objaví, **preto potrebujeme testy viac ako kedykoľvek predtým.** Len pár slov o tom ako postupovať ďalej...

Očakávajte, že budete preťažení. Mnohí z vás už sú. Niektorí máte ešte pokoj, ticho pred búrkou. Možno budete mať šťastie, ale nespoliehajte sa na to. Očakávajte, že bude viac pacientov, mnoho požiadaviek na laboratórne skúšky, viac ako kedykoľvek predtým. Dokonca, keď zvládnete prvú vlnu tejto krízy, začnite plánovať prípravu

na ďalšie vlny. **Kým nie je vakcína, laboratórne testovanie je v tomto boji rozhodujúcou zbraňou.**

Očakávajte nedostatok. Testovacích tampónov, transportných vírusových médií, reagensí. Ak máte v súčasnosti stabilné zásoby, myslíte na to, že v budúcnosti ich nebudete mať. Radšej sa zásobte nadbytkom, zväzťe zavedenie viac ako jednej metódy testovania, aj od nezávislého dodávateľa alebo spoločnosti, takže ak vaše zásoby pre metódu X klesnú, stále máte šancu s metódou Y. Po celé roky sledujeme efektívnosť toho, čo manažéri nazývajú LEAN (prístup, ktorým manažéri ospravedlňujú znižovanie stavu zamestnancov a zásob). Dnes musíte vybudovať **ochranu do hĺbky** pomocou zásob a záloh. Overte alternatívy pre tampóny, zväzťe vytvorenie vlastného vírusového transportného média, ak môžete, improvizujte a rozvíjajte aj alternatívne riešenia (staré zručnosti sa vám teraz budú veľmi hodiť). Ak ste laboratórium s vysokou komplexnosťou, uvoľnite nejaký talent do vývoja vlastných testov (home-made) vo vašom laboratóriu.

Myslite dlhodobo. Naplánujte si túto vlnu, ďalšiu vlnu a ďalšiu vlnu. Predpokladajte najmenej jeden rok požiadaviek na testovanie, možno dva roky. Preto sme v názve použili slovo **maratón**. Bolo by úžasné, keby sme sa mylili, je zbožným práním vidieť tento cieľ o niekoľko mesiacov. Je ťažko mysliteľné očakávať nápravu už v blízkej budúcnosti pretože jediné víťazstvo sa dá dosiahnuť očkovaním, keď šírenie vírusu budú mať pod kontrolou všetky krajiny.

Nezabudnite na kvalitu. Áno, FDA v USA v podstate otvorila dvere, aby umožnila každému výrobcovi dostať sa do testovacej hry (americké regulačné agentúry boli najprv príliš prísne, teraz sú príliš zhovievavé a dúfajú, že majú na to právo). V čase písania tohto textu na trh naskočilo viac ako 70 výrobcov. Od 13. apríla je ich v globálnej databáze FIND uvedených viac ako 250! Nie je šanca, aby všetky tieto spoločnosti vyrábali dokonalé testy. Existuje vysoká pravdepodobnosť, že niektoré z týchto metód, ktoré sa rýchlo dostali na trh, nebudú veľmi kvalitné. Žiadajte lepšiu kvalitu, viac dát o validačných štúdiách, o citlivosti a špecifickosti. Vykonajte validácie aj vo vašom vlastnom laboratóriu. Podelte sa o ne so svojimi kolegami. Pridajte čo najskôr kontroly tretích strán. Ak sú kontroly výrobcu reagensí vždy v poriadku, nie je všetko v poriadku (!) a výrobca vám pravdepodobne povie, že takéto kontroly nie sú dostatočne citlivé. Zapojte sa do programu skúšok spôsobilosti a externého hodnotenia kvality pre tieto metódy. V krátkodobom horizonte zväzťe aspoň porovnávacie

skúšky s nemocnicami (laboratóriami) vo vašom okolí.

Nepreceňujte silu testovania. Nemali by sme nadhodnocovať schopnosť testov diagnostikovať pacienta. Ak vírus prekročil komunitu, testovanie sa môže stať sekundárnym, musíte predpokladať, že ho má pravdepodobne každý, a nesnažte sa sledovať chorobu natoľko, aby ste rozlíšili chorých od menej chorých. Diagnostický test nemusí byť taký dôležitý ako všetky ostatné testy, ktoré monitorujú zdravie pacientov a klinickú manifestáciu. Tiež vieme, že existujú významné predanalytické výzvy s tampónmi, ako aj falošne negatívne skúšky u metód RT-PCR. Budú aj falošne pozitívne a budú existovať aj falošne negatívne výsledky. Uistite sa, že dávate správne výsledky a rady.

A nakoniec, **NEBOJTE SA!** Nehanbite sa. Laboratóriá príliš dlho znášali znižovanie nákladov, krátenie zdrojov, prepúšťanie personálu a iné strádania. **Niektoré z výziev, ktorým dnes čelíme vírusu, sú preto priamymi dôsledkami tejto krátkozrakosti.** Hoci je lákavé o tom hovoriť práve teraz, keď sa zaoberáme tým ako prekonať krízu, musíte si **nastaviť latku**. Buďte odvážni. **Vyžadujte zdroje**, ktoré potrebujete - to, čo pacienti potrebujú, aby ste sa mohli vyrovnáť nielen s bezprostrednou krízou, ale aj na dlhý boj dopredu. **Nedovoľte** exekutívam, aby vás odvedli späť do suterénu rozpočtovania a zdrojov“.

Navštívte nás a čítajte viac... celé znenie prekladu nájdete na <http://www.sskb.sk/portal/vzdelavanie/>.

Pár slov k profesionálnej charakteristike samotného autora.



Prof. James Westgard je jedným z najuznávanejších odborníkov v oblasti zabezpečovania, riadenia a kontroly kvality v klinických laboratóriách na svete. Časopis *The Pathologist* ho zaradil na popredné miesto najvplyvnejších svetových osobností laboratórnej medicíny. Je emeritným profesorom na Katedre patológie a laboratórnej medicíny Lekárskej fakulty Univerzity vo Wisconsin. Je spoluzakladateľom a riaditeľom spoločnosti Westgard QC, Inc., ktorá poskytuje laboratóriám technológie a školenia pre riadenie a kontrolu kvality. Spočiatku sa venoval hodnoteniu a validácii metód. Svoju profesionálnu kariéru začal ako klinický chemik a stal sa prvým predsedom oblastného výboru Ústavu pre klinické a laboratórne normy (Clinical and Laboratory Standards Institute). Počas stáže na Uppsal-

skej univerzite sa začal zaujímať o kontrolu kvality a začal s vývojom viacstupňového postupu kontroly, dnes medzinárodne známej pod jeho menom „Westgardove pravidlá“. Tieto sú dnes súčasťou každého laboratórneho protokolu kontroly kvality. Jeho rozsiahlu prácu v oblasti riadenia kvality dokumentuje viac ako 60 publikácií, kníh a monografií s vysokým citačným indexom v oblasti riadenia kvality, základných postupov kontroly kvality, validácie metód, pravidiel CLIA (Clinical Laboratory Improvement Amendments) pre riadenie kvality, správnych laboratórnych postupov na overovanie zamýšľanej kvality laboratórnych výsledkov, Six Sigma techník, biologickej variability a žiaducej úrovne kvality. Prof. James Westgard pokračuje v práci na Wisconsinkej univerzite, kde vyučuje v Programe klinických laboratórií a je riaditeľom online programu certifikácie absolventov v oblasti manažmentu kvality. Naďalej sa venuje výskumu kvantitatívnych techník pre riadenie analytickej kvality.

1. 7. 2020 v spolupráci s partnerom s podporou edukačného grantu a spoločnosťou EDUprofiPHARM sa uskutočnila I. časť vzdelávacích webinárov realizovaných Slovenskou spoločnosťou klinickej biochémie (SSKB) pod názvom SARS-CoV-2 a in Vitro Diagnostika.

Prihlásených bolo 122 účastníkov, a to nielen z odboru klinickej biochémie, laboratórnej medicíny, ale aj z odboru všeobecného lekárstva.

Záznam je prístupný pre prihlásených používateľov na <https://www.eduprofipharm.sk/webinare-live-uskutocnene/>.

17. 7. 2020 sa uskutočnilo **Valné zhromaždenie EFLM** prostredníctvom videokonferencie.

Európska federácia klinickej chémie a laboratórnej medicíny (EFLM) bola založená v júni 2007 na kongrese Euro-medlab v Amsterdame. Vznikla zlúčením Fóra európskych spoločností klinickej chémie (FESCC) a Konfederácie európskych spoločenstiev pre klinickú chémiu (EC4).

EFLM je európskym lídrom v klinickej biochémií a laboratórnej medicíne, ktorý združuje národné spoločnosti klinickej biochémie a laboratórnej medicíny a vytvára platformu pre všetkých európskych „špecialistov v laboratórnej medicíne“, národné profesijné asociácie, diagnostický priemysel, vládne a mimovládne organizácie s cieľom slúžiť verejnému záujmu v oblasti zdravotnej starostlivosti.

Slovenská spoločnosť klinickej biochémie (SSKB) je

riadnym členom EFLM. Členmi EFLM sa môžu stať všetky národné spoločnosti v Európe. Riadnymi členmi EFLM sú národné spoločnosti 41 nasledujúcich krajín: Albánsko, Rakúsko, Belgicko, Bosna a Hercegovina, Bulharsko, Chorvátsko, Cyprus, Česká republika, Dánsko, Estónsko, Fínsko, Francúzsko, Gruzínsko, Nemecko, Grécko, Maďarsko, Island, Írsko, Izrael, Taliansko, Kosovo, Lotyšsko, Litva, Luxembursko, Macedónsko, Čierna Hora, Holandsko, Nórsko, Poľsko, Portugalsko, Rumunsko, Rusko, Srbsko, Slovenská republika, Slovinsko, Španielsko, Švédsko, Švajčiarsko, Turecko, Ukrajina a Spojené kráľovstvo. Ďalej má EFLM 7 pridružených členov z Francúzska, Írska, Kazachstanu, Španielska, Srbska a Rumunska a jedného dočasného člena, ktorým je Slovenská spoločnosť laboratórnej medicíny.

Organizačnú štruktúru EFLM tvorí prezídium (výkonná rada, EB) a päť výborov (komisií, C), ktoré vykonávajú svoje úlohy prostredníctvom pracovných skupín (WGs). Výkonnú radu EB tvoria výkonný prezident, bývalý prezident, zvolený prezident, tajomník, pokladník a dvaja členovia, ktorí sú volení valným zhromaždením na dvojročné funkčné obdobie. Členstvo v komisiách a pracovných skupinách je otvorené pre nominácie národnými spoločnosťami.

Oficiálnym vedeckým časopisom EFLM je Klinická chémia a laboratórna medicína (Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, CCLM) s ukazovateľom priemernej citovanosti (Impact factor) = 3,595.

EFLM je právne zaregistrovaný v Belgicku a sídlo má spoločne s Medzinárodnou organizáciou klinickej chémie a laboratórnej medicíny (IFCC) v Miláne.

Najvyšším orgánom EFLM je Valné zhromaždenie, (GM, General meeting), tvoria ho prezidenti a národní reprezentanti členských národných spoločností. Valné zhromaždenie EFLM sa zvoláva najmenej raz za dva roky. Posledné Valné zhromaždenie EFLM sa uskutočnilo 17. júla 2020 prostredníctvom videokonferencie so správmi v reálnom čase a zdieľaním obsahu medzi členmi VZ s hlasovacím právom. GM sa zúčastnilo 42 oprávnených zástupcov odborných spoločností združených v EFLM, zo Slovenska MUDr. Hedviga Pivovarníková, prezidentka SSKB a Ing. Ján Balla, národný reprezentant SSKB.

Na úvod predstavila členov nového výkonného výboru EFLM jeho prezidentka Prof. Ana-Maria Šimundić, ktorá spolu s Prof. Giuseppe Lippim vo funkcii vedeckého sekretára sprevádzali jednotlivými bodmi programu. Valné zhromaždenie (VZ) odsúhlasilo správu Prof. G. Lippiho, vedeckého sekretára EFLM za predchádzajúce obdobie,

prijalo Gruzínsko za riadneho člena a 3 spoločnosti z Írska, Srbska a Rumunska za pridružených členov. Prof. Ana-Maria Šimundić, prezidentka EFLM, ktorá viedla rokovanie videokonferencie, predstavila nové projekty EFLM. Ďalej boli prednesené správy pokladníka o hospodárení za posledný rok a finančné porovnanie s rokmi 2017-2018, správy predsedov Vedeckej komisie, Profesionálnej komisie, Komisie pre akreditáciu a kvalitu, Komisie pre vzdelávanie a Komisie pre (vonkajšiu) komunikáciu. Správu o činnosti a projektoch IFCC predniesol jej nedávno novo zvolený prezident IFCC Prof. Khosrow Adeli. Záverečná diskusia takmer o polhodinu predĺžila plánovaný čas videokonferencie. Podrobnú správu GM 2020 zverejní EFLM na svojej web stránke <https://www.eflm.eu/site/page/a/1058>.

Najbližšie osobné stretnutie všetkých prezidentov národných odborných spoločností je plánované pred medzinárodnou akciou EuroMedLab 2021 v termíne **16.–20. mája 2021**, kedy by sa mal uskutočniť **24. IFCC-EFLM Európsky kongres klinickej chémie a laboratórnej medicíny v Mníchove**.

Výbor SSKB sa v týchto dňoch obrátil na všetkých členov odbornej spoločnosti s výzvou o spoluprácu pri realizácii projektu v rámci medzinárodnej iniciatívy **Choosing wisely** alebo **Vyberaj rozumne** formou dotazníka uverejneného na webovej stránke SSKB. Prosíme všetkých členov, aby venovali svoj čas tejto odbornej téme a uplatnili tak svoje cenné odborné vedomosti a skúsenosti pri návrhu a zlepšení racionálnej laboratórnej diagnostiky.

Cieľom je upozorniť na nevhodné postupy pri indikácii laboratórnych vyšetrení, s ktorými sa stretávame vo svojej praxi. V princípe sa môže jednať o dve situácie:

- Vyšetrenie sa **požaduje často**, aj keď v danej klinickej situácii **nie je opodstatnené**.
- Vyšetrenie sa **požaduje minimálne**, aj keď v danej situácii **môže výrazne prispieť** k zefektívneniu diagnosticko-terapeutického procesu.

Pri návrhoch môžu odborníci vychádzať z osobných skúseností, odporúčenie by malo byť vždy podložené v duchu evidence-based medicine (odporúčania odborných spoločností, metodické pokyny MZ SR, odborná literatúra, atď.).

Dovoľujem si aj touto cestou osloviť všetkých členov SSKB s výzvou na publikovanie v odbornom časopise „Laboratórna diagnostika“. Redakcia časopisu víta celý rad možných foriem publikácií: kazuistiky popisujúce zaujíma-

vú skúsenosť z praxe; porovnanie analyzátorov alebo metód; pôvodné práce, prehľadové články, prípadne správy z kongresov, konferencií atď.

Hlavný odborník Ministerstva zdravotníctva SR pre odbor klinická biochémia prof. MUDr. Stanislav Oravec, CSc. zabezpečil v tomto roku menovanie krajských odborníkov pre odbor klinická biochémia. Do funkcie krajských odborníkov Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky pre **odbor klinická biochémia** boli s účinnosťou **od 15. 5. 2020** menovaní za jednotlivé kraje SR tieto odborníci:

- **Bratislavský kraj – MUDr. Katarína Daňová, PhD.**
Národný ústav srdcových a cievnych chorôb, Oddelenie laboratórnej medicíny, Pod Krásnou hôrkou 1, 833 48 Bratislava 37
- **Trnavský kraj – MUDr. Jarmila Ambrušová**
AnalytX, s. r. o., ul. Andreja Žarnova 11, 917 01 Trnava
- **Trenčiansky kraj – MUDr. Ján Vindiš**
Fakultná nemocnica, Oddelenie klinickej biochémie, hematológie a mikrobiológie
Legionárska 28, 911 71 Trenčín
Aktuálne – SZŠ, Veľkomoravská 14, 911 05 Trenčín
- **Nitriansky kraj – MUDr. Daniel Magula, CSc.**
Špecializovaná nemocnica sv. Svorada, Kláštorská 134, 949 88 Nitra
- **Žilinský kraj – MUDr. Jela Schudichová**
Univerzitná nemocnica, Ústav klinickej biochémie, Kollárova 2, 036 01 Martin
- **Banskobystrický kraj – MUDr. Peter Sečník st.**
SK-LAB, s. r. o. Júliusa Szabóa 2, 984 01 Lučenec
- **Prešovský kraj – MUDr. Hedviga Pivovarníková**
synlab slovakia, s. r. o., Sládkovičova 25, 080 01 Prešov
- **Košický kraj – MUDr. Eva Ďurovcová, PhD.**
Medirex, a.s., Magnezitárska 2/C, 040 01 Košice
Aktuálne – Lekárska fakulta Univerzity Pavla Jozefa Šafárika, Trieda SNP 1, 040 11 Košice

Ustanovenie týchto osobností ako krajských odborníkov odboru vytvorí jeden zo základných organizačných predpokladov pre ďalší odborný rozvoj segmentu a aktivizáciu v oblasti laboratórnej diagnostiky, ktoré si doba vyžaduje.

Všetky aktuálne informácie vždy nájdete na webovej stránke www.sskb.sk.

A na záver by som sa chcela poďakovať členom výboru SSKB, členom dozornej rady a aj národnému reprezentantovi a všetkým vám, ktorým na budúcnosti odboru ešte záleží a majú snahu ho rozvíjať, a to za neúnavnú spoluprácu, vynaložené úsilie, trpezlivosť a čas, ktorý spoločne venujeme príprave vzdelávacích aktivít aj v tejto náročnej dobe pandémie koronavírusu.

Poďakovanie patrí aj partnerovi, ktorý podporuje kontinuálne vzdelávanie v našom odbore.

*Hedviga Pivovarníková
prezidentka SSKB*



MNOHOPOČETNÁ ENDOKRINNÁ NEOPLÁZIA TYPU 2A A 2B

Blažiček, P.^{1,2}, Lángoš, J.², Weismanová, E.³

¹Ústav chémie, klinickej biochémie a laboratórnej medicíny LF SZU, Bratislava

²Nemocnica ministerstva obrany Bratislava

³Onkologický ústav sv. Alžbety, Bratislava

e-mail: blazicekp@seznam.cz

SÚHRN

MEN 2 je dedičný syndróm s dvoma vyhranenými klinickými variantami. Najzávažnejšiu chorobnosť vytvára medulárny tyreoidálny karcinóm (MTC) pri MEN 2B, menej agresívny je pri MEN 2A a familiárny MTC sa zaraďuje do syndrómu preto, aby sa nezabudlo na skrining feochromocytómu. Včasná diagnostika umožnila dosiahnuť výrazné liečebné úspechy. Genetická analýza RET protoonkogénu umožňuje spoznať nosiča patologického génu pred jeho klinickou expresiou, vytvára možnosť prežívania pacienta pri včasnom odstránení cieľových orgánov (tyreoidey, paratyreoidey) a umožňuje prevenciu vývinu malígneho tumoru alebo jeho rekurenciu. Biochemický skrining sa má periodicky vykonávať celoživotne, aby sa včas odhalila recidíva operovaného alebo novovzniknutého tumoru.

Kľúčové slová: mnohopočetná endokrinná neoplázia typu 2A a 2B; catecholové amíny; diagnostika; liečba

ABSTRACT

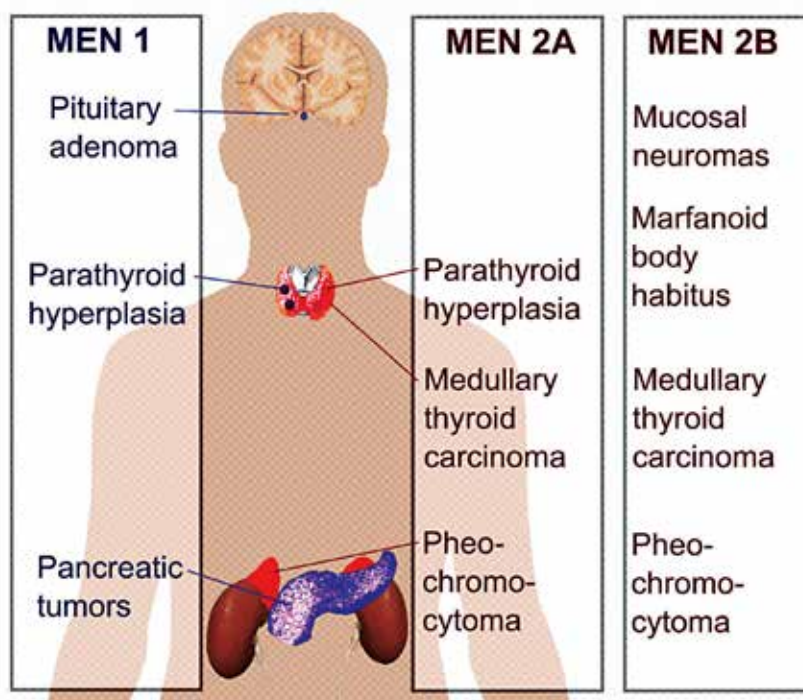
MEN 2 is an inherited syndrome with two distinct clinical variants. The most severe morbidity is medullary

thyroid carcinoma (MTC) in MEN 2B, less aggressive in MEN 2A, and familial MTC is included in the syndrome so as not to forget pheochromocytoma screening. Early diagnosis made it possible to achieve significant therapeutic success. Genetic analysis of the RET proto-oncogene allows to identify the carrier of the pathological gene before its clinical expression, creates the possibility of survival of the patient with early removal of target organs (thyroid, parathyroid) and allows prevention of malignant tumor development or recurrence. Biochemical screening should be performed periodically throughout life to detect early recurrence of the operated or newly developed tumor.

Key words: Multiple Endocrine Neoplasia – type 2A and 2B; catecholamines; diagnostic; therapy

ÚVOD

Mnohopočetnú endokrinnú neopláziu (MEN) delíme na typ 1 (MEN 1, Wermerov syndróm) a na dva typy 2, na MEN 2A (Sippleov syndróm) a MEN 2B. Ide o dominantný autozomálny endokrinný neoplastický syndróm s postihnutím štítnej žľazy, sympatikoadrenálneho systému a paratyreoidey.



Obr. 1. Multiple endocrine neoplasia (MEN)
(<https://www.Lecturio.com>)

Diagnóza syndrómu sa akceptuje, ak sú u pacienta postihnuté aspoň dva endokrinné systémy z troch a za familiárny sa považuje vtedy, ak sa v rodine vyskytol aspoň jeden z tumorov syndrómu u jedného člena prvého stupňa. Do variantu MEN 2A sa zaraďujú aj chorí s familiárnym MTC (FMTC), ak sa tumor vyskytol v rodokmeni najmenej u štyroch (Mulligan et al., 1955), alebo viac ako desiatich nosičov nad 50 rokov v rodokmeni (Brandi et al., 2001) s adekvátnou anamnézou bez feochromocytómu a hyperparatyreózy a aj kombinácie so zriedkavým kožným lichen amyloidosis a Hirschprungovou chorobou, ktoré sú podmienené extracelulárnymi mutáciami na RET onkogéne.

MEN 2B sa prejavuje MTC, feochromocytómom a slizničnými adenómami, ganglioneuromatózou gastrointestinálneho traktu a Marfanovým syndrómom bez hyperparatyreózy u pacienta a v rodine.

Klinický obraz MEN 2A

Klinický obraz syndrómu MEN 2A je mnohotvárný. Závisí od druhu neoplázie, produkcie hormónu a od pôsobenia tumoru útlakom na jeho okolie. Variabilita príznakov je závislá aj od vzájomnej kombinácie patologických syndromologických zoskupení.

Tab. 1. Klinické syndrómy pri MEN 2

FENOTYP	KLINICKÉ RYSY
MEN 2A (1)	MTC, feochromocytóm a paratyroidálna hyperplázia, alebo adenóm potvrdený histologicky
MEN 2A (2)	MTC a feochromocytóm bez HPT a bez HPT u pacienta i u príbuzných
MEN 2A (3)	MTC s HPT a bez feochromocytómu aj u príbuzných
FMTC	aspoň 4 MTC v rodokmeni bez feochromocytómu a HPT
MEN 2B	MTC s alebo bez feochromocytómu spolu s typickými príznakmi na tvári a s ganglioneurómami čreva

Na V. medzinárodnom minisympóziu konzorcium zatriedilo pacientov do syndrómu MEN 2 vtedy, ak mali príznaky uvedené na tabuľka č. 1 (Mulligan et al., 1955). Najčastejším prejavom je MTC, ktorý secernuje kalcitonín, dobrý marker tumoru. Zvýšené hodnoty bazálne alebo po stimulácii pentagastrínom, resp. kalcinom svedčia o prítomnosti tumoru alebo znamenajú rekurenciu po operácii MTC. Vyskytuje sa takmer u všetkých pacientov s MEN 2.

Plne rozvinutý tumor je veľkosti priemerne 1 cm, býva viacpočetný v štítnej žľaze, ale veľmi skoro preniká aj do okolia a metastazuje do lymfatických uzlín v bližšom

alebo vzdialenejšom okolí. Spravidla už v rannom detskom veku sa vyvíja hyperplázia C buniek tyreoidy secernujúcich kalcitonín a po 6. roku života bývajú prítomné aj metastázy. Je najčastejšou príčinou smrti.

Feochromocytóm sa vyskytuje asi v 50 % MEN 2. Zvyšuje TK, vyvoláva palpitácie, bolesti hlavy, potenie, neurotické ťažkosti. Asi u polovice pacientov býva obojstranný a po jednostrannej adenektómii sa aj po niekoľkých dekadách vytvára v ponechanej nadobličke. Asi v 10 % býva malígny. Feochromocytóm sa nachádza spolu s MTC, ale nie vždy súčasne. Asi v 25 % sa diagnostikuje pred, v 35% súčasne a v 40 % po diagnostike MTC (M o d i g l i a n i et al., 1955).

HPT sa vyskytuje takmer v 20–30 % pri syndróme MEN 2A a klinicky sa prejavuje v 3.–4. dekáde. Príznaky sa nelíšia od prejavov primárnej HPT alebo syndrómu MEN 1. Diagnóza je potvrdená hyperkalcémiou, hypofosfatémiou a zvýšenou hladinou parathormónu v sére. Hyperplázia alebo adenómy príštitných teliesok sú konštantné nálezy. Malignita je zriedkavá.

Klinický obraz MEN 2B

Je tvorený prítomnosťou MTC, feochromocytómu, ale bez príznakov HPT. Mutácia na kodóne 918 je prítomná vo vyše 90 %. MTC sa vyvíja skôr a je agresívnejší ako u MEN 2A. Metastázy sa pozorovali už v prvom roku života a k exitu dochádza už v 2.–3. roku života. Feochromocytóm sa vyskytuje častejšie ako u 50 % pacientov.

Slizničné neurómy a marfanoidné somatické príznaky sú najvýraznejšie v detstve. Neurómy sú pravé (nie neurofibrómy) a bývajú na špičke jazyka, pod mihalnicami a sú tiež roztrúsené na sliznici po črevnom trakte. U detí sa prejavujú plynatosťou, zápchou a hnačkami.

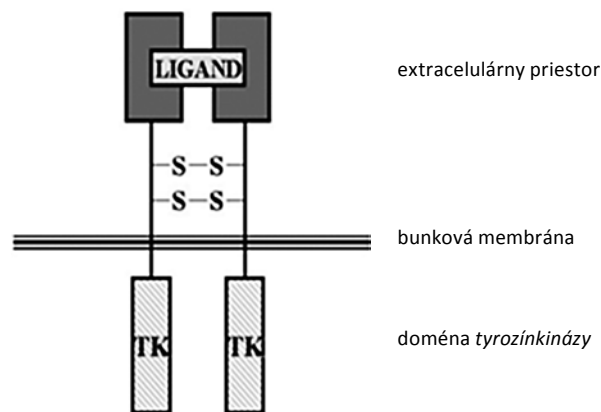
Diagnostika MEN 2

Skoré stanovenie diagnózy MEN 2A je obtiažne. Ako prvý syndróm je MTC, zistiteľný palpačne alebo zvýšenou hladinou kalcitonínu v krvi. Tumor peneteruje spravidla už v detskom veku a keď sa stáva viditeľný alebo hmatný, často už aj metastazoval. Skôr sa klinicky prejavuje a laboratorne diagnostikuje feochromocytóm a to prevažne medzi 14.–60. rokom života. Pokroky v jeho skríningu umožnili, že ani jeden pacient zo súboru veľkej rodiny nezomrel následkom feochromocytómu (L i p s et al., 1955). Neskoró býva objavená aj HPT pre veľmi rozmanité a necharakteristické ťažkosti. Samotný syndróm sa vyskytuje v po-

pulácii zriedka, preto sa málokedy naň myslí a vedomosti lekárov, najmä prvého kontaktu, sú malé. Nápadnejšie sú klinické príznaky pri MEN 2B súvisiace s jeho marfanoidnými symptómami a črevnými ťažkosťami, najmä u detí. Spoznanie ochorenia sa zrýchľuje, ak je pozitívna rodinná anamnéza. Veľké zrýchlenie a skvalitnenie diagnostiky priniesli pokroky v genetickej diagnostike, ktoré umožňujú predklinickú ba aj prenatálnu diagnostiku nosiča patologického génu.

Genetické mutácie génu RET a ich vplyv na vývoj syndrómu MEN 2

Gén RET sa nachádza v pericentromerickej oblasti chromozómu 10 (oblasť 10q11.2). Skladá sa z 21 exónov – úsekov DNA, ktoré kódujú proteínový produkt. Mutácie v exónoch (germinatívne alebo somatické) spôsobujú syntézu poškodeného proteínového produktu, čo vedie v konečnom dôsledku k vývoju nádorového ochorenia. Proteínový produkt génu RET plní funkciu receptora s tyrozínkinázovou aktivitou (TK). Receptor je lokalizovaný na cytoplazmatickej membráne buniek odvodených z neurálnej platničky (S a n t o r o et al., 1998). Má 3 časti: extracelulárnu, transmembránovú a intracelulárnu (Obrázok č. 2)

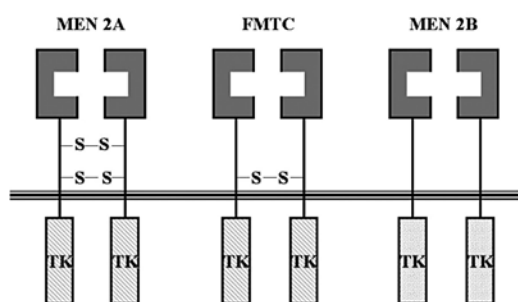


Obr.2. Schématické znázornenie normálneho receptora RET (S a n t o r o et al., 1998)

Na extracelulárnu časť receptora sa viaže špecifický neurotropný rastový faktor (ligand). Špecifickým rastovým faktorom pre stimuláciu buniek odvodených z neurálnej platničky je GDNF (Glial cell Derived Neurotrophic Factor) – rastový faktor produkovaný gliálnymi bunkami. Špecifický ligand aktivuje receptor, čo sprevádza dimerizácia receptora prostredníctvom dvojitej disulfidovej väz-

by. Po dimerizácii receptora sa signál pre bunkové delenie prenáša do vnútra bunky, pričom sa aktivujú mnohé špecifické efektorové molekuly a mnohé metabolické cesty vnútri bunky. Výsledkom fyziologickej aktivácie receptora pomocou ligandu je normálna proliferácia a diferenciácia bunky. Po ukončení normálnej proliferácie a diferenciácie bunky sa ligand odpojí, disulfidové väzby sa prerušia a receptor sa opätovne monomerizuje.

V prípade mutácie v tej časti génu RET, ktorá kóduje extracelulárnu časť receptora (najmä exóny 10 a 11), dochádza k patologickej stimulácii bunky, k proliferácii a to aj bez špecifického ligandu GDNF (Obr. 3). Predpokladá sa, že gén RET mutovaný v exóne 10 alebo 11 kóduje funkčne poškodený receptor. Receptor je poškodený v mieste, kde sa vytvárajú disulfidové väzby a kde zároveň dochádza k dimerizácii normálneho receptora po väzbe s ligandom. Poškodený receptor tak „predstiera“ väzbu s ligandom a trvalo funguje ako dimér. Bunka je trvalo stimulovaná k proliferácii, čo napokon vedie k vývoju nádorovej choroby. Mutácie v exónoch 10 a 11 v géne RET sa vyskytujú u členov rodín s MEN 2A a FMTC.



Obr. 3. Poruchy receptora RET v nádorových bunkách – schématické znázornenie (Santoro et al., 1998)

V prípade mutácie v géne RET, ktorá kóduje intracelulárnu časť receptora (najmä exóny 13–16), dochádza k nesprávnemu prenosu signálu pre bunkové delenie z extracelulárnej časti k intracelulárnym efektorovým molekulám (vzniká strata substrátovej špecificity) (pozri obrázok č. 3). Strata substrátovej špecificity znamená, že mutovaný receptor neprenáša signál pre bunkové delenie na správne efektorové molekuly vnútri bunky, ale mitogénny signál prenesie na rôzne nešpecifické efekторы. Aktivujú sa nesprávne metabolické cesty, čo vedie k vývoju nie len nádorovej choroby ale aj rôznych vývojových porúch. Z tohto

dôvodu sa mutácie v géne RET, ktoré kódujú intracelulárnu časť receptora, považujú za najzávažnejšie. Mutácie v exónoch 13–16 v géne RET sa vyskytujú u členov rodín s MEN 2B. Napriek strate substrátovej špecificity zostáva receptor schopný viazať sa s ligandom, čo taktiež môže ovplyvňovať klinický fenotyp pacientov s MEN 2B.

Úloha DNA analýzy v diagnostike mutácií v géne RET

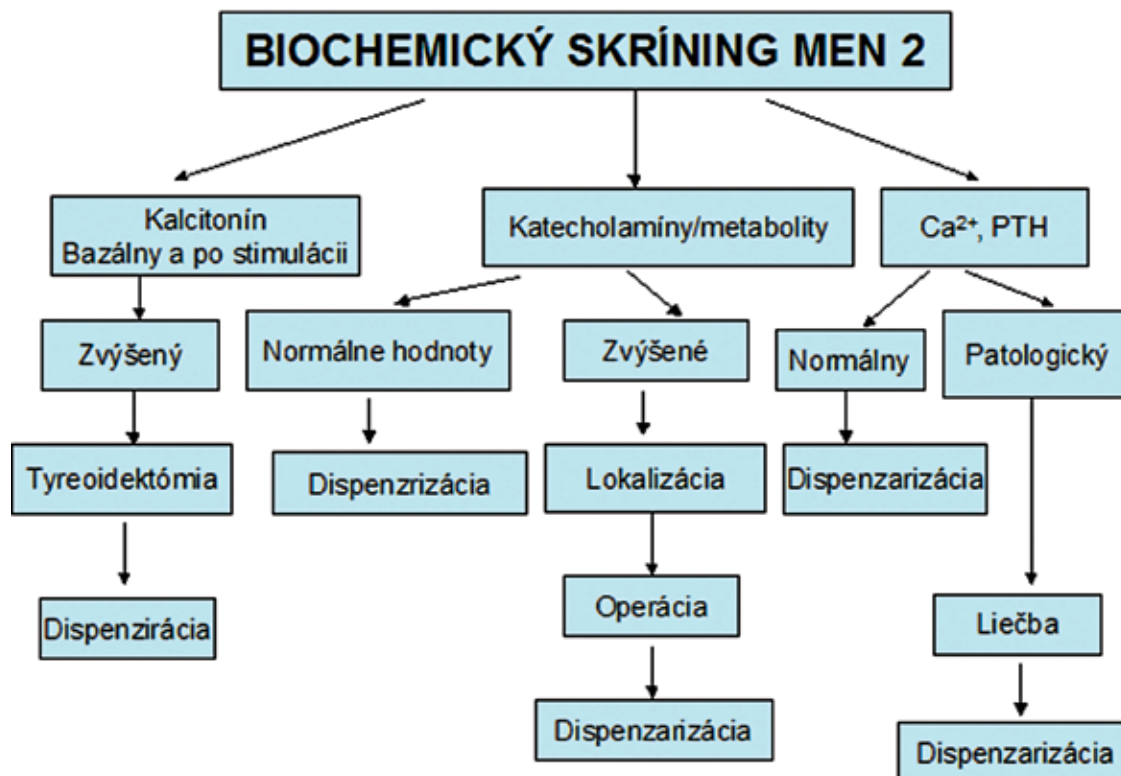
Presymptomatický test založený na DNA analýze má niekoľko výhod. V prvom rade umožňuje včasný záchyt tých členov rodiny, ktorí sú nositeľmi germinatívnej mutácie, čím sa zabezpečí optimálny manažment vysoko rizikových probandov. Na druhej strane, pomocou metód DNA analýzy sa dá vylúčiť riziko vývoja hereditárnej formy nádorovej choroby u tých členov rodiny s MEN 2, ktorí nositeľmi mutácie nie sú. Vylúčenie rizika vývoja nádorovej choroby u tých členov rodiny s MEN 2, u ktorých sa nedokáže prítomnosť germinatívnej mutácie v géne RET, má nesporne vysoko pozitívny psychický benefit pre probandov.

Treba však spomenúť niektoré zaujímavé štatistické údaje publikované v zahraničnej literatúre (Berndt et al., 1998):

1. Približne u 8 % rodín s MEN 2A a FMTC doposiaľ nebola dokázaná žiadna germinatívna mutácia v géne RET. Aby sa dala získať odpoveď na otázku, čo je rozhodujúcim etiopatogenetickým faktorom tejto jednoznačne hereditárnej nádorovej choroby, bude potrebné analyzovať ďalšie časti génu RET a zároveň poznať ďalšie gény kooperujúce s génom RET. Horúcim kandidátom sa stal gén pre GDNF ale aj iné gény.
2. U niektorých probandov aj napriek tomu, že u nich dokázali prítomnosť germinatívnej mutácie v géne RET, sa v priebehu celého života (viac ako 70 rokov) nevyvinula nádorová choroba. Tento fakt je neobvyčajný, pretože hereditárna forma MTC sa klinicky manifestuje okolo 35. roka života.

Na základe týchto informácií je dôležitá presná charakterizácia typu a polohy mutácie v rôznych exónoch génu RET a zároveň je potrebné poznať mutácie aj v ďalších génoch, ktoré kooperujú s génom RET pri stimulácii bunky ku proliferácii a diferenciácii.

Nezanedbateľnou výhodou etablovania metód DNA analýzy do rutínnej klinickej praxe je možnosť uskutoč-



Obr. 4. Multiple endocrine neoplasia (MEN2) – doporučený postup biochemického skrínungu

ňovať tzv. diferenciálnu diagnostiku, pomocou ktorej je možné rozlíšiť, či v danom prípade medulárneho karcinómu štítnej žľazy ide o jeho hereditárnu alebo sporadickú formu, pretože zo štatistických údajov vyplýva, že hereditárna forma MTC tvorí viac ako 25 % zo všetkých prípadov MTC.

Skríning syndrómu MEN 2

Pokroky v laboratórnych vyšetrovacích metódach dovoľujú vyšetriť DNA na molekulárnej úrovni. To umožňuje identifikovať bodovú zmenu na géne a potvrdiť možnosť ochorenia ešte pred klinickými prejavmi choroby. U jedinca s rizikom postihnutia MEN 2 treba vyšetriť RET protoonkogén. Ak sa nenájde patologická mutácia, vylúči sa z dispenzarizácie.

Ak je nález pozitívny, treba ihneď začať s biochemickým skríningom (Obr. 4).

Sleduje sa hladina kalcitonínu v krvi za bazálnych podmienok alebo po stimulácii pentagastrínom, alebo infúziou kalcia. U ležiaceho pacienta sa odoberie zo zakanylovej vény krv na stanovenie bazálnej hodnoty kalcitonínu. Po

tom sa vstriečne do žily 0,5 µg/kg pentagastrínu v 2 ml 0,9 % NaCl /10 sek. alebo 2,5 mg/kg Ca v roztoku počas 30 sek. a odoberú sa vzorky krvi po 2 a 5 min/30 sek. Zvýšené hodnoty svedčia o prítomnosti MTC.

Súčasne treba sledovať tvorbu katecholových amínov (KA) a vylučovanie vanilmandľovej kyseliny (VMK) a/alebo aj metanefrínov. Opakovane namerané zvýšené hodnoty KA alebo ich metabolitov svedčia o prítomnosti feochromocytómu v organizme. Po operácii je potrebné zaradiť pacienta do skrínungu, stanoviť KA aspoň raz za rok a okolo 15. roka života začať so skríningom tumoru prítomných teliesok. Stanovuje sa parathormón (PTH) tak bazálny, ako aj po stimulácii, a koncentrácia Ca²⁺ v plazme. Ak sú hodnoty zvýšené, ide o adenóm, karcinóm alebo hyperpláziu v prítomných telieskach a následne v trojročných intervaloch treba sledovať kalcitoninémiu a kalcémiu.

Všetci príbuzní chorého sa majú podrobiť skríningu, pretože MEN 2 je dominantný dedičný typ ochorenia. Včasnou diagnostikou možno predísť klinickým prejavom choroby a malígnemu zvrhnutiu tumoru a metastázam.

Každý vyšetovaný s pozitívnym nálezom by sa mal

podrobiť opätovnému vyšetreniu na špecializovanom pracovisku, aby sa potvrdil nález a vylúčila zámena vzorky.

Na 7. workshope (Lips, 1998) došlo ku konsenzu, že sekvenovanie DNA na RET-e je výhodnejšie ako stanovenie CT. Odhalenie mutácie je špecifickejšie ako stanovenie CT, (5–10 % falošne pozitívnych) a genetická metóda odhalí viac skutočne pozitívnych a menej falošne negatívnych nálezov. Sekvenovanie DNA odhaľuje bodové mutácie na géne a mutované kodóny na RET onkogéne korelujú s variáciami a agresivitou tumorov MEN 2 a poskytuje možnosť plánovať čas operácie.

U MTC sa stanovili tri rizikové stupne:

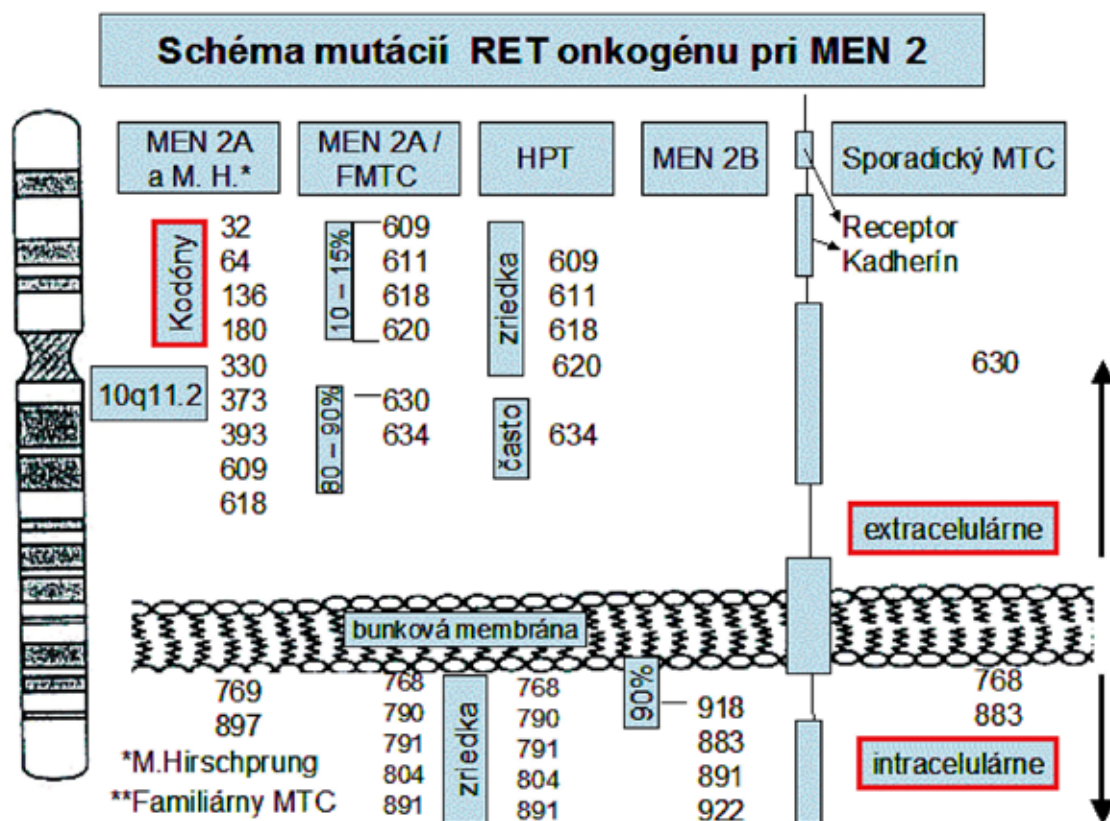
- **III. stupeň** najagresívnejší u detí s MEN 2B, alebo s mutáciou na kodóne 883, 918, 922. Operovať treba počas prvých 6 mesiacov života, najlepšie v prvom mesiaci s extirpáciou regionálnych lymfatických uzlín.
- **II. stupeň** s mutáciou na kodóne 611, 618, 620, 634. Totálnu tyreoidektómiu je potrebné vykonať

pred 5. rokom života. V názoroch na rozsah operácie nie je jednotnosť. Za šetrnejší výkon sú interнисти pre vyhnutie sa hypoparatyreoidizmu a lézii n. recurrentis.

- **I. stupeň** s mutáciami na kodónoch 609, 768, 790, 791, 804, 891 je najmenej rizikový. Názory na termín tyreoidektómie sa líšia. Tumor rastie pomalšie a operačný zákrok niektorí autori indikujú základe stanovovania kalcitonínu.

Feochromocytóm sa vyskytuje pri všetkých mutáciách okrem kodónu 609, 768, 804 a 891. Pri mutácii na kodóne 634 dochádza ku klinickej expresii tumoru medzi 5.–10. rokom života, preto treba robiť skrining každoročne.

HPT pri mutácii na kodóne 634 sa objavuje často, skrining treba robiť každoročne. Pri zmene na kodónoch 609, 611, 618, 620, 790, 791 skrining je potrebné robiť každé 2–3 roky, penetrácia pri mutáciách na kodónoch 768, 804, 891 sa prejaví zriedka a na tripletoch 883, 918, 922 nikdy (Obr. 5).



Obr. 5. Multiple endocrine neoplasia MEN2; schéma mutácie RET onkogénu (upravené podľa Lips, 1998)

Liečba ochorení MEN 2

MTC je multicentrické ochorenie, preto je nutná totálna tyreoidektómia s odstránením regionálnych uzlín pred 6. rokom života, lebo dáva väčšiu nádej na prežitie. Ak u pacienta v tomto období a neskôr sa vyvinie MTC o priemere 1 cm, obyčajne už tumorové bunky metastázovali do regionálnych uzlín alebo inam v organizme. Až asi u 90 % pacientov sa podarí vyhnúť rekurencii MTC. U pacientov s početnými metastázami ožiarenie môže redukovať veľkosť tumoru. Cytostatiká (Adriamycin, Vincristin, Cyclophosamid) predstavujú len paliatívnu liečbu.

Cieľom včasnej liečby feochromocytómu je predísť komplikáciám z hyperkatecholamínémie a exitu. Racionálna liečba je len odstránenie tumoru. Pred chirurgickým zákrokom treba vyšetriť obe nadobličky, aby sa vyhlo potrebe reoperácie, lebo feochromocytóm býva bilaterálne častejšie u MEN 2 ako u polovice pacientov. V prípade bilaterálnej adenektómie treba nasadiť substitučnú liečbu glukokortikoidmi a mineralokortikoidmi. Alternatívnou liečbou je odstránenie drene a ponechanie kôry nadobličky.

Topickej diagnostike treba venovať pozornosť, pretože asi v 10 %-ách feochromocytóm býva malígny a nezriedka tieto nádory majú extraadrenálnu lokalizáciu.

V prípade malígneho feochromocytómu prichádza do úvahy aktinoterapia, ktorá býva málo úspešná (5-fluorouracyl, cyclophosphamid). Rádiojódom značený metajódbenzylguanidín (123 MIBG) má lepší paliatívny efekt. Pri symptomatickej liečbe sa podávajú α blokátory, pri tachykardii aj malé dávky β blokátorov, alebo α – metylparatyrozín, ako blokátor syntézy KA.

Liečenie HPT je chirurgické. Sú dva varianty. Pri jednom sa robí subtotálna paratyreoidektómia, ktorou sa odstráni všetky prítštné telieska okrem jedného, z ktorého sa ponechá asi 50–60 mg tkaniva. Pri druhom sa najmenšie prítštné teliesko odstráni, upraví sa jeho veľkosť a transplantuje sa obyčajne na predlaktie. Výhoda druhého variantu spočíva v tom, že ak sa ukáže potreba reoperácie, dá sa urobiť v lokálnej anestézii ambulantne. Nevýhodou neujatia sa transplantátu je potreba trvalej substitúcia parathormónu a kalcia. Odporúča sa zachovať časť telieska kryoprezerváciou na možnosť implantácie pri neujatí sa prvého transplantátu.

HPT u MEN 2 sa vyskytuje asi v 20.–30. % a je miernejšia ako u syndrómu MEN 1. Indikácia na operáciu je ako pri sporadickej primárnej HPT. Konsenzus o potrebe chirurgickej liečby je pri klinických prejavoch HPT a subkli-

nických nálezoch (hyperkalcémia nad 3 mmol/l, kalcúria nad 400 mg/24 h, znížená denzita kosti – Z skóre viac ako 2,5 SD pre daný vek, nevysvetliteľná renálna insuficiencia a prekonaná hyperkalcemická kríza).

O konzervatívny postup v liečbe HPT sa možno pokúsiť u starých pacientov s miernou hyperkalcémiou s operačným rizikom a bez výraznejších príznakov HPT. Určitá nádej sa vkladá do kalcimimetík, ktoré sú v klinickom výskume. Znižujú vylučovanie PTH azda aj rast tumoru (Silverberg et al., 1997).

HPT u MEN 2A je často asymptomatická s miernou hyperkalcémiou. V liečbe môže postačiť resekcia len jednej paratyreoidálnej žľazy (Rau et al., 1995)

ZÁVER

Pri genetickom ochorení je potrebné oboznámiť nosiča patologického génu a jeho príbuzenstvo o rizikách genetických ochorení. Poučenie má zahrňovať oboznámenie s prenosom a pravdepodobnosťou dedičnosti autozomálnych dominantných ochorení, informáciu o riziku, vrátane diskriminácií v zamestnaní, poistení, súkromných záležitostiach, aj medzi príbuznými, informáciu o genetickom testovaní a možných chybách pri genetickom testovaní. Je potrebné získať písomný súhlas na odber materiálu na genetické vyšetrenie. Je potrebné poučiť chorého alebo rodiča o liečbe a o potrebe celoživotného sledovania. Prípadná odborná pomoc psychológa môže byť potrebná a užitočná.

LITERATÚRA

- Berndt, I. et al. (1998):** A new hot spot for mutations in the ret protooncogene causing familial medullary thyroid carcinoma and multiple endocrine neoplasia type 2A. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. doi: 10.1210/jc.83.3.770.
- Brandi, M.L. et al. (2001):** Consensus: Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. doi: 10.1210/jcem.86.12.8070.
- Lips, C. J. M. et al. (1995):** From medical history and biochemical tests to presymptomatic treatment in a large MEN 2A family. *Journal of Internal Medicine*. doi: 10.1111/j.1365-2796.1995.tb01209.x.

4. **Lips, C. J. M. (1998):** Clinical management of the multiple endocrine neoplasia syndromes: Results of a computerized opinion poll at the Sixth International Workshop on Multiple Endocrine Neoplasia and von Hippel-Lindau Disease. *Journal of Internal Medicine*. doi: 10.1046/j.1365-2796.1998.00375.x.
5. **Modigliani, E. et al. (1995):** Pheochromocytoma in multiple endocrine neoplasia type 2: European study. *Journal of Internal Medicine*. doi: 10.1111/j.1365-2796.1995.tb01211.x.
6. **Mulligan, L. M. et al. (1995):** Genotype-phenotype correlation in multiple endocrine neoplasia type 2: Report of the International RET Mutation Consortium. *Journal of Internal Medicine*. doi: 10.1111/j.1365-2796.1995.tb01208.x.
7. **Raue, E. et al. (1995):** Primary hyperparathyroidism in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Journal of Internal Medicine*. doi: 10.1111/j.1365-2796.1995.tb01212.x.
8. **Santoro, M. et al. (1998).** Molecular biology of the MEN2 gene. *Journal of Internal Medicine*. doi: 10.1046/j.1365-2796.1998.00330.x.
9. **Silverberg, S. J. et al. (1997):** Short-term inhibition of parathyroid hormone secretion by a calcium- receptor agonist in patients with primary hyperparathyroidism. *New England Journal of Medicine*. doi: 10.1056/NEJM199711203372104.



CYSTICKÁ FIBRÓZA – POKROKY V LIEČBE NAJČASTEJŠEJ MONOGÉNOVEJ CHOROBY

Rácz, O.¹, Somoš, A.², Feketeová, A.³, Knapková, M.⁴

¹Ústav patologickej fyziológie UPJŠ Lekárska fakulta Košice

²Klinika pneumológie a ftizeológie UNLP Košice

³Detská fakultná nemocnica Košice

⁴Centrum novorodeneckého skríningu, Banská Bystrica

e-mail: olliracz@gmail.com

SÚHRN

Prehľad o histórii, klinických príznakoch, genetickom pozadí a molekulovej podstate cystickej fibrózy. Opis celoplošného skríningu cystickej fibrózy u novorodencov a možností vyhľadávania nosičov mutácií génu pre CFTR. Najnovšia možnosť liečby cystickej fibrózy pomocou modulátorov a potenciátorov chybnej bielkoviny.

Kľúčové slová: cystická fibróza, Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, ivafactor, lumafactor, elxafactor, tezafactor.

ABSTRACT

An overview of history, clinical symptomatology, genetic background and molecular pathogenesis of cystic fibrosis. Description of neonatal screening method and the possibilities of CFTR mutation carrier identification. The latest actual possibilities of cystic fibrosis treatment with modulators and potentiators of the damaged protein.

Key words: Cystic fibrosis, Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, ivafactor, lumafactor, elxafactor, tezafactor.

História a epidemiológia choroby

O tom, že choroba bola známa už dávno, svedčí laický výrok z XVIII. storočia: „*Woe to that child which when kissed on the forehead tastes salty. He is bewitched and soon must die*“. Prvé vedecké opisy cystickej fibrózy pochádzajú z prvej polovice XX. storočia (A n d e r s, 1938 – cystic fibrosis of pancreas; F a r b e r, 1945 – mukoviscidosis) a z tejto doby pochádza aj jej mierne zavádzajúci názov – cysty a fibróza pankreasu sú len následky choroby, infekcií a poškodené sú mnohé orgány ľudského tela, nielen pankreas [1–3].

Cystická fibróza (CF) je monogénové ochorenie, ktoré postihuje jedno dieťa z 2000–2500. Z toho vyplýva, že počet zdravých heterozygotov v našej populácii je vysoký – 1 z 22 až 26 ľudí (4–5 % populácie) a približne jeden mužský pár z 400–500 môže mať postihnuté dieťa podľa pravidiel recesívnej dedičnosti (chlapci a dievčatá rovnako)¹. Celosvetový výskyt CF je okolo 70–90 tisíc chorých. Podľa registra CF na Slovensku bolo koncom roka 2018 – 336 chorých (135 detí a 201 dospelých).

Klinické príznaky choroby

Postihnuté deti majú koncentráciu NaCl v pote viac

¹Skutočné čísla podľa správy Centra pre skrínung novorodencov [4] sú u nás nižšie, ale to na podstate a význame problému nemení nič.

ako $60 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (norma je do $40 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) a husté sekrety exokrinných žliaz. Hustý hlien v dýchacích cestách predisponuje k opakovaným infekciám. Následkom je progresívne bronchopulmonálne ochorenie a nakoniec respiračná insuficiencia. Okrem toho je porušená exokrinná činnosť pankreasu, trávenie, rezorbcia vitamínov rozpustných v tukoch. U chlapcov sa často vyskytuje infertilita a u novorodencov aj mekóniový ileus (Tab. 1). Príznaky sú priamo úmerné koncentrácii NaCl v pote po podaní pilokarpínu, čo sa dnes stanovuje presnými štandardizovanými metódami typu POCT.

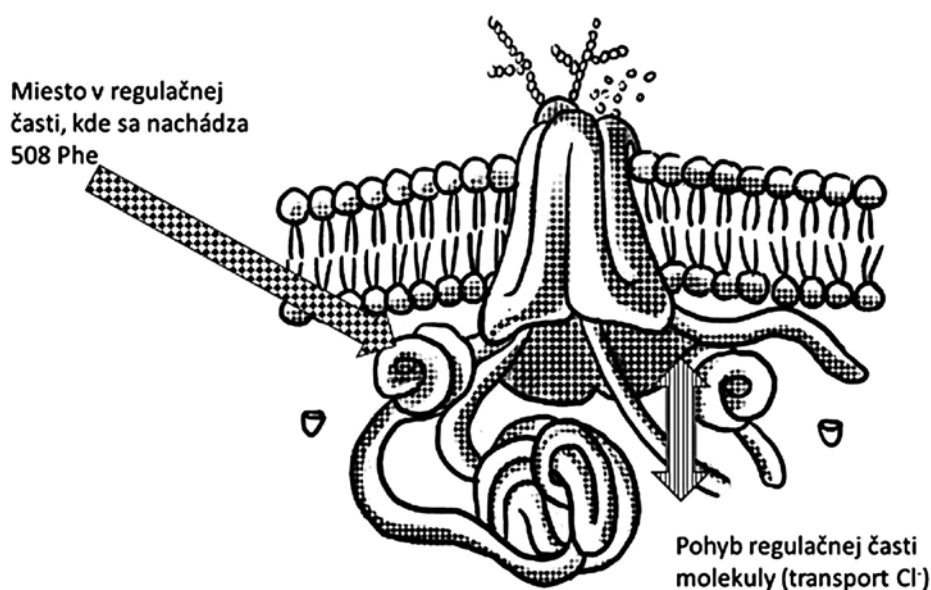
Tab. 1. Príznaky cystickej fibrózy

TYPICKÉ PRÍZNAKY	ATYPICKÉ PRÍZNAKY
Progresívne bronchopulmonálne ochorenie	Ikterus
Nosové polypy	Distálna obštrukcia čriev
Poškodenie pankreasu	Poškodenie pečene a žlčových ciest
Prolaps rekta	Pankreatitída
Mekóniový ileus (u novorodencov)	Chronické rinosinusitídy
Mužská infertilita (azoospermia)	Diabetes mellitus
Malnutrícia	
Neprospievanie	

Genetika CF

Identifikácia genetickej podstaty choroby musela ísť inou cestou, ako pri učebnicovom príklade kosáčikovej anémie², pri ktorej bola známa ľahko dostupná bielkovina pre analýzu. V prípade kosáčikovej anémie sa našla chybná aminokyselina v molekule hemoglobínu chorých a na základe toho bola spätne vydedukovaná príslušná bodová mutácia v géne pre beta reťazec hemoglobínu. Pri CF nebola známa chybná bielkovina, len podozrenie na chybný sodíkový alebo chloridový transportér v epiteloch potných žliaz a v bunkách slizníc postihnutých orgánov. Nebolo k dispozícii ani tkanivo na analýzu chybnéj bielkoviny. Metódami klasickej genetiky sa zistilo, že chybný gén sa nachádza na 7. chromozóme a neskôr sa identifikovala tá časť chromozómu 7, kde sa hľadaný gén nachádza. V konečnom štádiu výskumu v roku 1989 podozrivé ostali 4 gény, z ktorých jeden kodoval chloridový transportér. Gén nájdený a identifikovaný skupinou vedenou Lap Chee Tsui dostal názov CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene) [5]. Je to veľký gén, obsahuje 27 exónov a kóduje transmembránovú bielkovinu zo skupiny ABC transportérov o molekulovej hmotnosti 170 kD (Obr. 1). Transportér v potných žľazách má za úlohu spätný transport chloridu z potu do krvi. Ak je gén mutovaný a bielkovina nefunkčná, vedie to ku vyššej koncentrácii NaCl v pote [6].

²Za čo Linus Pauling dostal Nobelovu cenu v roku 1954.



Obr. 1. Štruktúra chloridového transportéra CFTR
Pri chýbaní fenylalanínu na mieste 508 molekula sa nedostane do membrány,
je rozložená v endoplazmatickom retikule

Dve tretiny chorých detí majú deléciu tripletu v 10. exóne na obidvoch chromozómoch číslo 7, čo má za následok chýbanie aminokyseliny fenylalanín (Phe) na 508. mieste v bielkovine (klasická forma CF). Ide o miesto, ktoré je pre transportnú funkciu bielkoviny dôležitá. Chybná bielkovina nemá správnu priestorovú štruktúru a je rozložená už v endoplazmatickom retikule. V géne však nechýba triplet pre fenylalanín číslo 508, ale ide o vypadnutie 3 nukleotidov v dvoch susedných tripletoch: Pôvodné triplet ATC TTT kódujú aminokyseliny Ile a Phe. Po vypadnutí „C“ z prvého a dva „T“ z druhého (ATC TTT) z dvoch tripletov ostane ATT, čo je druhý možný kód pre Ile, ktorý tým pádom je na správnom mieste, ale vypadol kód pre Phe.

Molekulová podstata CF je zložitejšia. Modernými metódami analýzy sa v géne CFTR našlo až 2000 rôznych mutácií všetkého typu (nie len bodové mutácie, malé delécie a inzercie), a to nie len v kódujúcich častiach, ale aj v intrónoch [7]. Sú aj také, ktoré nemenia štruktúru bielkoviny (silent – tiché mutácie).

Delenie týchto mutácií podľa ich účinku na funkciu CFTR je v tabuľke 2.

Výskyt rôznych mutácií a následných funkčných zmien kódovanej bielkoviny je v populácii nerovnomerný. Najčastejšia sa vyskytuje klasická mutácia (u 80–90 % chorých, homozygotov na del508 je približne 67 %). 20 iných mutácií sa vyskytuje približne u 15 % detí s CF. Iné sú veľmi zriedkavé a sú aj také, ktoré nevedú k chorobe. To znamená, že choré deti môžu byť aj miešaní heterozygoti alebo homozygoti s „neklasickými“ mutáciami. Klinický význam genetickej heterogenity (jedna choroba – viac možných mutácií) spočíva v tom, že nosiči iných mutácií majú spravidla menej závažný klinický priebeh, ako homozygoti s klasickou mutáciou (Tab. 3).

Patogenéza príznakov CF

Hlavnou príčinou ťažkých príznakov choroby (husté

Tab. 3. Rôzne mutácie v géne CFTR a ich vplyv na prejavy choroby

Mutácie	Δ508/Δ 508	Δ508/iné	Iné/iné
Počet a %	151 (52 %)	117 (40 %)	25 (8 %)
Nedostatočnosť pankreasu	99%	72%	36%
Vek manifestácie, roky	1,8	4,4	8,4

viskózne sekréty, atď) nie je zvýšená koncentrácia kuchynskej soli v sekrétoch, ako sa to predtým myslelo³. Chloridový transportér v epiteliach slizníc má totiž inú funkciu, ako v potných žľazách a navyš spolupracuje s inými transportérmi (Obr. 2) V epiteliových bunkách exokrinných žliaz v slizniciach rôznych orgánov chloridový transportér pumpuje chlorid von z bunky a brzdí spätný transport vody zo sekrétu do bunky. Ak CFTR vypadne, zvýši sa resorpcia vody zo sekrétov, ktoré sa zahusťujú.

Diagnostika CF

V minulosti k indikáciám na vyšetrenie na cystickú fibrózu patrilo klinické podozrenie, zvýšená hodnota NaCl v pote (pilokarpínový test) a stolica na elastázu menej ako norma (príznak pankreatickej insuficiencie). Tieto vyšetrenia majú aj dnes význam, ale od roku 2009 sa u nás robí celoplošný skrining novorodencov [9–11]. Začína sa stanovením aktivity trypsinogénu zo suchej kvapky krvi (v rámci Guthrieho testu). Vyšetrenie poskytuje informáciu o funkčnom stave tráviaceho traktu⁴. V prípade pozi-

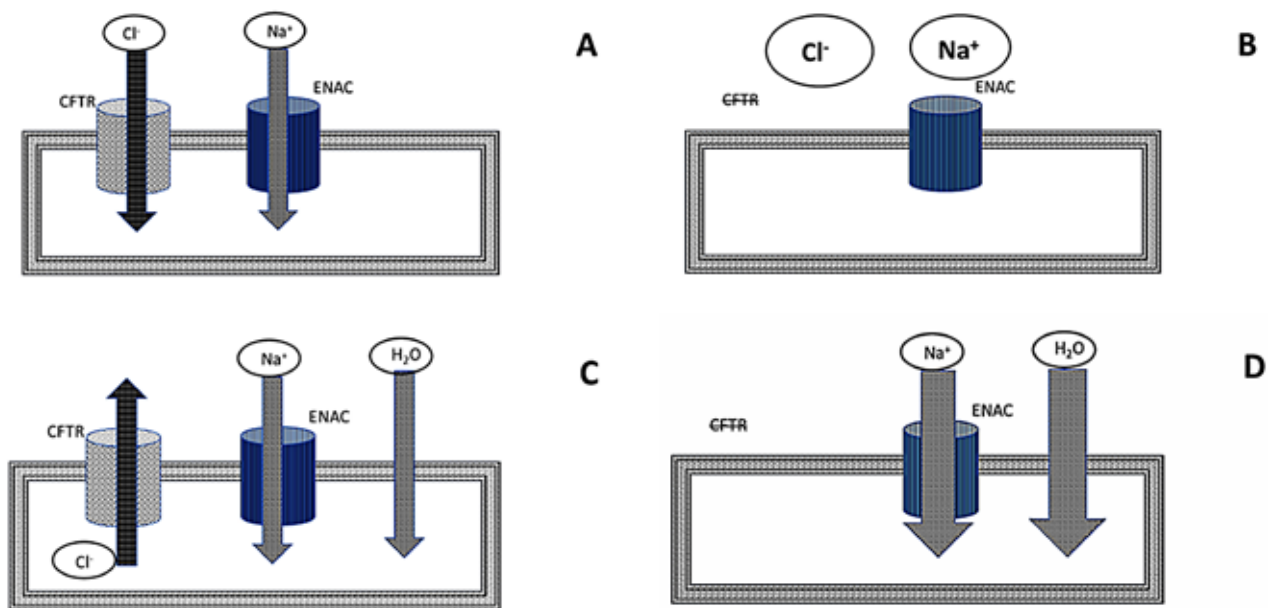
Tab. 2. Triedy mutácií v bielkovine CFTR podľa funkcie

TRIEDA	ANGLICKÝ NÁZOV	VYSVETLENIE
I	No protein	Gén je vyradený, žiadna bielkovina sa netvorí
II	No traffic	Bielkovina nemá správnu štruktúru a je rozložená v endoplazmatickom retikule a nedostane sa do membrán Klasická del508 mutácia patrí do tejto skupiny
III	No function	Bielkovina sa tvorí, dostane sa do membrány, ale nefunguje (chloridový kanál sa neotvára). Mutácia, G551D, pri ktorej ivafactor účinkuje patrí do tejto skupiny
IV	Less function	Chloridový kanál funguje nedostatočne alebo nesprávne
V	Less protein	Tvorí sa málo bielkoviny
VI	Less stable	Bielkovina je labilná, rozloží sa v membráne predčasne

Poznámka: Funkčné delenie na triedy nezodpovedá typom mutácií. Tieto je možné nájsť v genetických databázach [8].

³Ak vo vode rozpustíme NaCl, nestane sa hustou, ale slanou.

⁴Čo svedčí o tom, že orgány sú poškodené už počas intrauterinného rozvoja. Na druhej strane je praradoxné, že potné žľazy, ktoré majú funkčnú poruchu transportu chloridu, nie sú poškodené



Obr. 2. Funkcia chloridového transportéra kódovaného génom CFTR v potných žľazách a v epitelových bunkách dýchacích ciest

- A–B. Bunka potnej žľazy.** A. CFTR spolupracuje so sodíkovým kanálom a spolu znižujú koncentráciu NaCl v pote. B. CFTR chýba, v pote je vysoká koncentrácia NaCl.
C–D. Exokrinné žľazy. C. CFTR pumpuje chlorid von z bunky, spolupracuje so sodíkovým kanálom a transportom vody. Sekréty majú normálnu hustotu. D. CFTR nefunguje, zvýšená rezorbcia vody a sodíka, Sekréty sú husté.

tivity nasleduje genetická analýza. Počet mutácií, ktoré sa stanovujú v jednotlivých dostupných DNA testoch je rôzny (50–60, ale aj viac). V sporných prípadoch sa robí sekvenovanie génu. Pri správnom postupe, k čomu patrí aj stanovenie koncentrácie NaCl v pote, je špecifita a senzitivita celkového algoritmu skríningu veľmi vysoká [12].

Molekulová diagnostika mutácií je dnes prístupná, môže sa robiť aj u zdravých heterozygotov v rámci genetického poradenstva. Metóda odporúčaná americkými odborníkmi (základný panel) identifikuje 23 rôznych mutácií. V prípade potreby je k dispozícii rozšírený panel (191 mutácií) alebo sekvenovanie génu [13]. Prenatálny skrining sa však zatiaľ nerobí celoplošne, len v prípade podozrenia na nosičstvo. O jeho širšom zavedení sa diskutuje na odborných fórach rôznych krajín.

Liečba CF

Súčasná cielená antibiotická liečba, podávanie tráviacich enzýmov, liečebná diéta a intenzívna fyzioterapia zmiernuje príznaky choroby, zlepšuje kvalitu života postihnutých detí a predlžuje ich život. Pred 30–40 rokmi bola priemerná dĺžka života detí s CF okolo 10–14 rokov, dnes

je to okolo 44 rokov (v krajinách s primeranou úrovňou zdravotnej starostlivosti). Pacienti môžu mať aj transplantáciu pľúc, čo ďalej zlepšuje ich prežívanie a kvalitu života. Príkladom dlhého života je Howell Graham narodený v roku 1962. Vo veku dvoch rokov mu diagnostikovali CF. Mal ťažké príznaky a lekári mu dávali šancu žiť do veku 6 rokov. Dnes má 58 rokov, je po transplantácii pľúc, má rodinu a pracuje. Najstarším žijúcim chorým je pravdepodobne Jerry Cahill (64 rokov, CF od veku 10 rokov), ktorý prežil už viac svojich doktorov a odporúča ostatným chorým, aby sa nevzdávali a bojovali proti chorobe [14]. Zaujímavou perspektívou boja proti infekciám pri rezistencii na antibiotiká je liečba bakteriofágmi [15,16].

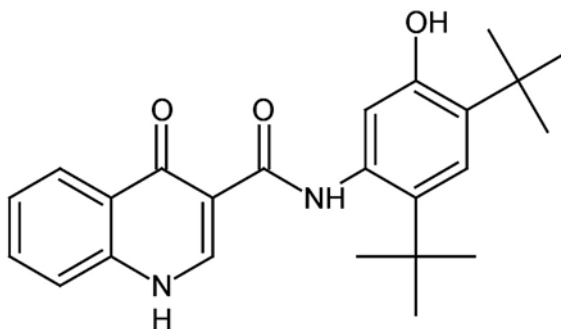
Génová terapia CF

Prvé pokusy so somatickou génovou terapiou CF spočívali v infekcii epitelu dýchacích ciest neškodným vírusom, ktorým mal vo svojom genóme zabudovaný gén CFTR. Výsledky boli slabé a dočasné – po niekoľkých deleniach buniek nový gén zmizol z epitelových buniek [17].

K účinnejším a bezpečným spôsobom génovej terapie CF vedie ešte dlhá cesta, a to napriek tomu, že expe-

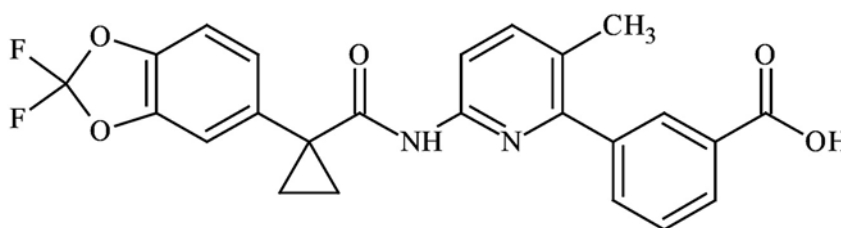
IVAFACITOR

N-(2,4-ditert-butyl-5-hydroxyphenyl)-4-oxo-1H-quinoline-3-carboxamide



LUMAFACITOR

Ácido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzoldioxol-5-il)ciclopropencarboxamido)-3-metilpiridin-2-il)benzóico



Obr. 3. Chemická štruktúra ivafaktoru a lumafaktoru

rimentálne výsledky sú sľubné. Najviac nádejí sa vkladá do metodiky CRISPR-Cas, ktorá umožňuje cielejšiu opravu mutácii [18]. Opravu by však bolo potrebné vykonať na zárodočných bunkách, alebo v oplodnenom vajíčku, ale na to ešte táto metóda nedozrela⁵. Je tu veľké nebezpečenie, že ku zmene génov dôjde na nesprávnom mieste a podľa najnovších údajov aplikácia metódy môže zapríčiniť aj ťažké zmeny chromozómov zárodočných buniek a oplodneného vajíčka.

Najnovšia forma terapie CF pomocou modulátorov a korektorov činnosti bielkoviny CFTR

To, že činnosť enzýmov (ale aj hemoglobínu a iných bielkovín) je modulovaná aktivátormi a inhibítormi, je základný poznatok klasickej biochémie. Činnosť mnohých bielkovín závisí aj od prítomnosti exogénnych látok – vitamínov a stopových prvkov a mnohé lieky účinkujú aktivá-

ciou alebo blokádou enzýmov (príkladom je inhibícia syntézy prostaglandínov kyselinou acetylsalicylovou). Z toho pohľadu nie je až také ťažké pochopiť, že chybná molekula CFTR by mohla byť aspoň čiastočne „opravená“ organickými zlúčeninami.

Napriek tomu, syntéza prvej takejto látky pre liečbu CF v roku 2012 znamenala revolúciu. Liek, ktorého štruktúra je na obr. 3, dostal pomenovanie „ivafactor“ (VX-770)⁶ [19]. Je to organická zlúčenina, ktorá zlepšuje činnosť chloridového transportéra (potenciátor) u nosičov niektorých konkrétnych mutácií (mutácia G551D⁷ a 8 iných z triedy III.). Tieto sa vyskytujú približne u 4 % zo všetkých chorých na CF, ale ivafactor nie je účinný u ostatných chorých. Vývoj sa nezastavil a k ivafactoru boli postupne pridané tri ďalšie zlúčeniny, ktoré v rôznych kombináciách (podľa mutácii a iných indikácií) sú účinné aj u detí s klasickou mutáciou. Ide o zlúčeniny „lumafactor“, „elexafactor“ a „tezafactor“, ktoré fungujú ako korektory činnosti bielkoviny (VX-661, VX-770) [20, 21]. V liečbe sa

⁵ Čínsky vedec He Jiankui v roku 2018 použil túto metódu bez povolenia. Modifikoval gény dvojčiat počas embryonálneho vývoja tak, aby boli rezistentné na HIV. Jeho čin bol vedeckou komunitou jednoznačne odsúdený, bol prepustený z univerzity v Shenzhen a odsúdený na 3 roky väzenia.

⁶ V molekule je namiesto glycinu kyselina aspartátová.

môže použiť dvojkombinácia alebo trojkombinácia týchto liekov. Použitie ivafactoru bolo schválené u nás v roku 2012 a od 1. 9. 2020 je schválená aplikácia lieku Orcambi (kombinácia ivafactor a lumacaftor) a už sa podáva pacientom, homozygotom na klasickú del508 mutáciu a miešaným heterozygotom.

ZÁVER

Objav a vývoj modulátorov a potenciátorov činnosti CFTR je ozajstnou revolúciou nielen v liečbe cystickej fibrózy, ale má obrovský význam aj zo širšej perspektívy. Vedecká komunita to právom považuje za vysoko inovatívny a kreatívny krok, klinici sú o niečo menej optimistickí. Zlepšenie klinického stavu liečených detí je zrejmé, ale v každodennej praxi sa objavujú aj problémy s touto formou liečby. Vysoká cena prípravkov je dôležitým, ale nie neprekonateľným problémom. Zrejme je aj to, že tieto látky nie sú účinné na nápravu ireverzibilných zmien orgánov po dlhodobom trvaní choroby a nenahradzujú klasickú liečbu. Prípravky (okrem ivafactoru) sú zavedené do liečby len nedávno a nikto nie je schopný predpovedať ich dlhodobý účinok. Je jasné, že definitívne riešenie monogénových dedičných chorôb prinesie nakoniec génová terapia, ale cesta od výskumu po bežnú klinickú prax bude ešte dlhá.

LITERATÚRA

1. **Vávrová, V. et al. (2003):** *Cystická fibróza v praxi*, 2.vyd., Praha: Professional Publishing, 2003, s. 152, ISBN 80-86419-32-0.
2. **Fila, L. (2014):** Cystická fibróza u dospelých. *Interní Medicína*, 16, pp. 54–60.
3. **Vávrová, V. (2019):** Historie cystickej fibrózy u nás – editorial. *Čes.-slov. Pediat.*, 74, pp. 379–380.
4. **Knapková, M., Dluholucký, S. (2019):** *Ročná správa novorodeneckého skríningu za rok 2019*. Centrum novorodeneckého skríningu SR, Banská Bystrica, 15 p.
5. **Riordan, J. R. et al. (1989):** Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, 245, pp. 1066–1073.
6. **Rácz, O., Ništiar, F. (v tlači):** Genetika a genomika. In **Beňacka R. (Ed.):** *Všeobecná patologická fyziológia*. UPJŠ Košice.
7. **Cystic Fibrosis Mutation Database.** Available at <http://www.genet.sickkids.on.ca/Home.html>.
8. **The Clinical and Functional Translation of CFTR (2013):** US CF Foundation. Johns Hopkins University. *CFTR2 Mutation List, 2013 version*. Available at <http://www.cfr2.org>.
9. **Lysinová, M. et al. (2015):** Novorodenecký skrínung v súčasnosti. *Pediatr. Prax*, 16, pp. 188–191.
10. **Dluholucký, S., Knapková, M., Revťáková, A. (2019):** Desiat rokov novorodeneckého skrínungu cystickej fibrózy na Slovensku. *Čes.-slov. Pediat.*, 74, pp. 387–391.
11. **Bartošová, J. et al. (2019):** Novorodenecký screening cystickej fibrózy a diagnostika CFSPID. *Čes.-slov. Pediat.*, 74, pp. 381–386.
12. **Sontag, M. K. et al. (2009):** A new cystic fibrosis newborn screening algorithm: IRT/IRT /DNA. *J. Pediat.*, 155, pp. 618–622.
13. **Committee opinion Number 486 (2011):** *The American College of Obstetricians and Gynecologists*. Update on Carrier Screening for Cystic Fibrosis. Available at: <https://www.acog.org/Resources-And-Publications/Committee-Opinions/Committee-on-Genetics/Update-on-CarrierScreening-for-Cystic-Fibrosis>.
14. **Khamsi, R. (2020):** Living proof, breathing proof. *Nature*, 583, S16.
15. **Svoboda, E. (2020):** Phages could help when antibiotics fail. *Nature*, 583, S8.
16. **Górski, A. et al. (2019):** The fall and rise of phage therapy in modern medicine. *Expert Opin. Biol. Ther.*, 19, pp. 1115–1117.
17. **Dolgin, E. (2020):** The sooner the better. *Nature*, 583, S6–S7.
18. **De Weert, S. (2020):** Cystic fibrosis drugs target the malformed proteins at the root of disease. *Nature*, 583, S2–S4.
19. **Southern K. W., et al. (2018):** Correctors (specific therapies for class II CFTR mutations) for cystic fibrosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews 2018*, Issue 8. Art. No.: CD010966. DOI: 10.1002/14651858.CD010966.pub2.
20. **Middleton, P. G. et al. (2019):** Elexacaftor-Tezacaftor-Ivacaftor for Cystic Fibrosis with a Single Phe508del Allele. *New England J. Med.*, 38, pp. 1809–1819.
21. **Veit, G. et al. (2020):** Allosteric folding correction of F508del and rare CFTR mutants by elexacaftor-tezacaftor-ivacaftor (Trikafta) combination. *JCI insight*, 5, (18): e139983.



ŠTANDARDIZOVANÉ POROVNÁVANIE ROVNÍC NA STANOVENIE LDL CHOLESTEROLU – METODICKÁ ŠTÚDIA

Gaško, R.^{1,2}, Hefler, M.²

¹Oddelenie klinickej biochémie a hematológie
Psychiatrická Nemocnica Michalovce, n. o., Michalovce

²Klinická epidemiológia a bioštatistika, Košice

e-mail: biostatistikakosice@gmail.com

SÚHRN

LDL cholesterol (LDL-C) sa môže získavať meraním priamou metódou alebo výpočtom z iných, nameraných parametrov, najčastejšie celkového cholesterolu (TC), HDL cholesterolu (HDL-C) a triglyceridov (TAG). Ak je predmetom porovnávania dvoch metód LDL-C porovnanie dvoch takýchto vypočítaných metód, je toto porovnanie možné vykonať nie na veličinách získaných z reálnych pacientov, ale na umelo vytvorenom súbore s tak zostavenými parametrami, ktoré spĺňajú aj kritérium reálnosti aj ideálne matematicko-štatistické kritériá.

Predmetom tejto práce je popis metódy vytvárania umelého súboru zloženého z TC, HDL-C a TAG s požadovanými parametrami, poukázanie na rozdiely medzi reálnymi súbormi a umelým súborom, a nakoniec vykonanie štúdie porovnania viacerých metód na umelom súbore s rovnicou Martin ako referenčnou s rovnicami Sampson, Friedewald a Cordova.

Kľúčové slová: LDL cholesterol; porovnanie metód; umelý súbor; Martinova rovnica; Sampsonovej rovnica

ABSTRACT

LDL cholesterol (LDL-C) can be obtained by direct measurement or calculation from other, measured parameters, most commonly total cholesterol (TC), HDL cholesterol (HDL-C) and triglycerides (TAG). If the subject of the comparison of two LDL-C methods, reference measurement procedure and candidate measurement procedure, is the comparison of two calculated methods, this comparison can be performed not on quantities obtained from real patients, but on an artificially created synthetic data set with such compiled parameters that meet both the criterion of reality and ideal mathematical-statistical criteria.

In this methodical study we describe the method of creating an synthetic data set composed of TC, HDL-C and TAG with the required parameters. We point out the differences between real files and the artificial file, and finally we compare several methods for determining LDL-C on an artificial file with Martin equation as reference with Sampson equation, Friedewald equation and Cordova equation.

Key words: LDL cholesterol; method comparison; synthetic data set; Martin equation; Sampson equation

MATERIÁL A METODIKA

Metodiky stanovenia koncentrácie cholesterolu v lipoproteínoch s nízkou hustotou (LDL-cholesterolu, LDL-C) v krvnom sére majú od publikovania Friedewaldovej rovnice* už takmer 50-ročnú históriu vývoja. Vývoj ide dvoma smermi. **Jeden** – meranie – sa snaží vyvinúť a vyrobiť primerane, resp. dostatočne harmonizované a štandardizované diagnostiká na priame meranie LDL-C, čo sa zatiaľ nie celkom darí. Tejto problematike sa v tomto príspevku nebudeme venovať. **Druhý** – stanovenie výpočtom – je postavený na predpoklade, formulovanom už vo vyššie uvedenej necitovanej práci, že LDL-C je možné s dostatočnou presnosťou vypočítať z iných, v sére nameraných lipidových parametrov, najčastejšie z celkového cholesterolu (TC), HDL-cholesterolu (HDL-C) a triacylglycerolov (triglyceridov, TAG).

Friedewaldova rovnica sa stala najbežnejšie používanou metódou stanovenia LDL-C v klinických laboratóriách na celom svete a stále ňou zostáva. Európskou federáciou laboratórnej medicíny bol v období marec – august 2019 vykonávaný dotazníkový prieskum, zameraný na manažment dyslipidemií, ktorého sa zúčastnilo 452 laboratórií z 28 štátov Európy. Zo zverejnených anonymizovaných výsledkov (De Wolf et al, 2020) okrem iného vyplýva: 44 % laboratórií používa Friedewaldov výpočet, 0 % výpočet inou rovnicou, 34 % rutinne u všetkých patientskych vzoriek meranie niektorou priamou metódou, 22 % aj výpočet aj meranie, podľa rôznych kritérií. Tieto údaje ani okrajovo nepopisujú stav na Slovensku, pretože prieskumu sa nezúčastnilo žiadne naše laboratórium. Paralelne bol však vykonaný v auguste 2019 obdobne koncipovaný dotazníkový prieskum ktorého sa zúčastnilo 215 českých a slovenských laboratórií (Friedecký et al, 2019). Podľa jeho výsledkov 24 % laboratórií používa iba Friedewaldov výpočet, 59 % iba priame meranie, 11 % výpočet aj meranie.

Obmedzenia Friedewaldovej rovnice sú dobre popísané (Gaško, Sánchez-Meca, 2009). V snahe zlepšiť validitu výpočtu bolo postupne odvodených niekoľko desiatok iných matematických rovníc na výpočet LDL-C. Ich

úplný výpočet do roku 2010 bol publikovaný v systematickom prehľade v tomto časopise (Gaško, 2011). Prehľady niektorých z nich z novej doby sú uvedené napr. v prácach Rim et al, 2016, ktorá uvádza 10 rovníc; Pallazola et al, 2018, ktorá uvádza 12 rovníc; Cordova et al, 2018, ktorá uvádza 8 rovníc; Karkhanavala et al, 2019, ktorá uvádza 8 rovníc. Pribúdajú stále ďalšie pokusy o lepšie rovnice, napr. Ghasemi et al, 2018; Huchegoda et al, 2019; Molavi et al, 2020.

V roku 2013 bol publikovaný veľmi dobre doložený výpočet novej rovnice, ktorej názov sa ustálil, po prvotnom označení Novel method, na Martin/Hopkins, alebo Martin formula (Martin et al, 2013). Už v tom istom roku sme predpovedali úspech Martinovej rovnice (Gaško a spol, 2013) a vykonali sme jej prepočet z jednotiek mg/dl na mmol/l. Verifikáciu Martinovej rovnice vykonával pôvodný autorský kolektív (Martin et al, 2018) aj iní (Chaen et al, 2016; Petridou, Anagnostopoulou, 2019; Palmer et al, 2019). Aktuálne je táto rovnica odporúčaná na použitie novými guidelinemi, Európskymi (Langlois et al, 2020), aj národnými (Solnica et al, 2020). V USA je skutočne používaná na niekoľkých pracoviskách (Elkhoury et al, 2019), u nás ešte nie.

V rovnakom roku 2013 bol publikovaný výpočet novej rovnice (Cordova, Cordova, 2013), ktorá je pozoruhodná tým, že vstupnými pre výpočet sú iba dva parametre, TC a HDL-C. Aj táto rovnica bola verifikovaná (Cordova et al, 2018; Cordova et al, 2020).

V tomto roku bola publikovaná ďalšia, sofistikovaná rovnica (Sampson et al, 2020), ktorá okamžite vzbudila veľké očakávania a publikačné odozvy (Kholi-Lynch et al, 2020; Wolska, Remaley, 2020; Zafir et al, 2020).

Z metodologického hľadiska možno identifikovať dve slabé stránky porovnávania metód, ktorými konkretizovane/aplikovane na stanovenie LDL-C sú:

1. Každá publikácia má uvedenú vetu „merania boli vykonané na našom súbore pacientov“. Tieto súbory sú veľmi rôznorodé čo do počtu členov, do zastúpenia (rozpätia) a hustoty (denzity) prítomnosti hodnôt TC, HDL-C a TAG. Výsledky porovnania závisia od štruktúry súboru, na ktorom sa merania robia (inkluzívne a exkluzívne kritériá pre pacientov, veľkosť súboru, najnižšia a najvyššia hodnota lipidu v súbore, medián hodnôt, atď.) Preto porovnanie tých istých dvoch metód môže na dvoch rôzne zo-

* (Friedewald, Levy et Fredrickson, 1972 – túto chronicky známu publikáciu, s aktuálne podľa PubMed vyše 33300 citáciami, my v zozname literatúry neuvádzame; citovať zdroje de iure treba ale de facto sa nemusí, v štáte plagiátorov kvalifikačných vysokoškolských prác)

stavených a definovaných súboroch priniesť veľmi rozdielne výsledky.

2. Nová metóda sa neporovnáva s metódou zlatého štandardu, ktorou je preparatívna ultracentrifugácia s kvantifikáciou LDL častíc, ale vo veľkej časti prác buď s niektorou z priamych metód merania alebo s niektorou inou výpočtovou metódou. Do roku 2010 bolo identifikovaných spolu 63 porovnávacích štúdií, z nich 27 % porovnávalo beta kvantifikáciu s rôznymi rovnicami, 48 % niektorú z priamych metód s rôznymi rovnicami a 25 % rôzne rovnice medzi sebou (G a š k o, 2011). Tým samozrejme dochádza ku porovnávaniu novej metódy s metódami zaťaženými oproti zlatému štandardu rôzne veľkou systematickou chybou.

V monografii (G a š k o, 2015) bol s cieľom potlačiť uvedené dve slabé stránky predstavený a odôvodnený koncept vytvorenia umelého súboru trojíc hodnôt TC, HDL-C a TAG a jeho použitia pri porovnávaní niekoľkých vzorcov stanovenia – výpočtu lipoproteínu B. V tejto práci stručne zopakujeme tento koncept, predvedieme základné výpočty pre porovnanie rovnice Martin s rovnicami Friedewald, Sampson a Cordova, a ukážeme na ňom závis-

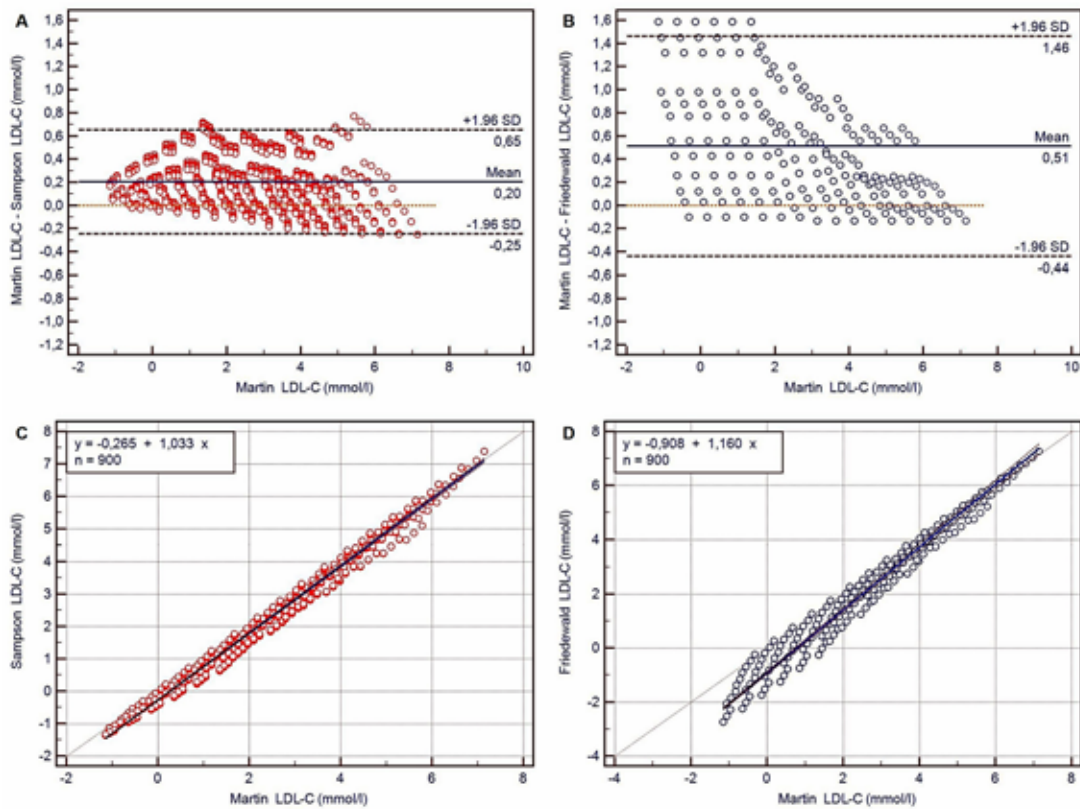
losť výsledkov výpočtu LDL-C akýmkoľvek vzorcom na zložení súboru.

Vytvorenie umelého súboru TC, HDL-C a TAG

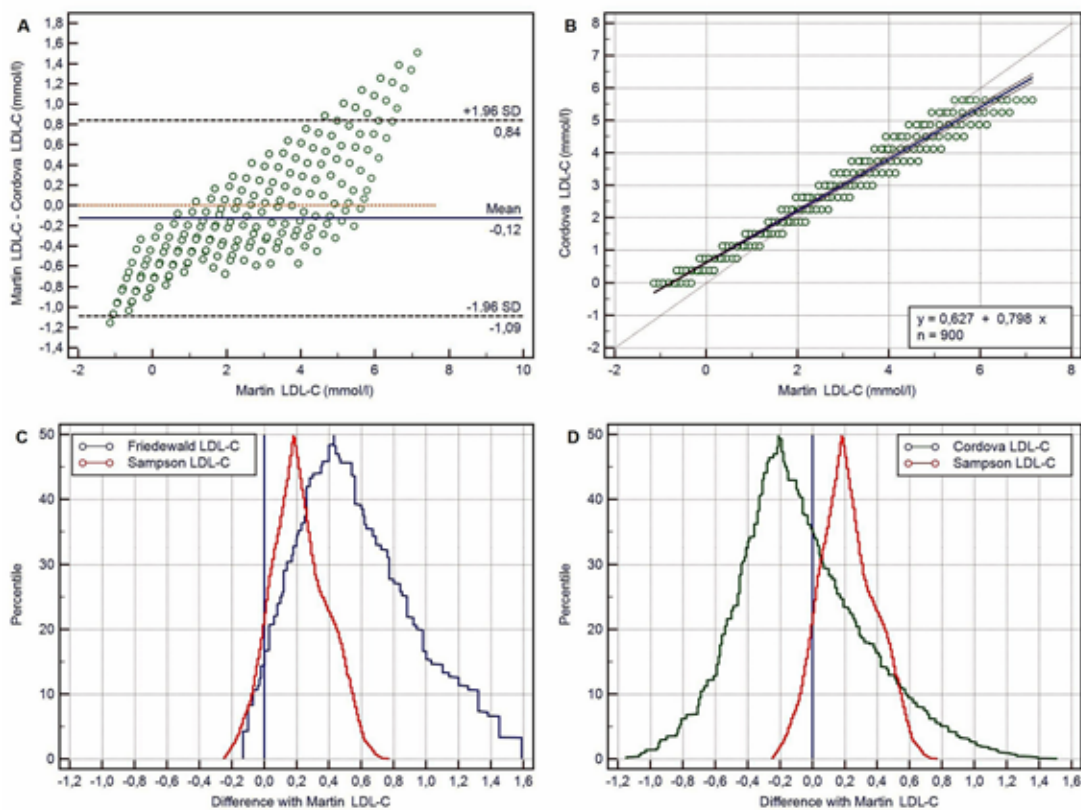
Navrhli sme vytvorenie umelého súboru (synthetic data set), v ktorom sú po jednom zastúpení „probandi“ s rovnomerne rozloženými hodnotami cholesterolu, HDL-cholesterolu a triglyceridov v odstupe 0,5 mmol/l, v rozpätí, ktoré zahŕňa hraničnú oblasť medzi fyziologickými a patologickými hodnotami. Po rozbore 4 veľkých reálnych súborov pacientov, ktoré boli použité v dobre dokumentovaných lipidologických štúdiách (podrobnosti vid' G a š k o, 2015) bolo rozpätie hodnôt zvolené tak, aby zahŕňalo 95 až 99 % hodnôt týchto súborov. Rozsah hodnôt sme teraz zisťovali na 3 ďalších štúdiách na dospelaj populácii, ktorých údaje sú dostatočne podrobne popísané – holandskej (B a l d e r et al, 2017), kórejskej (L e e et al, 2019) a írskej (H u g h e s et al, 2020). Vo všetkých troch boli populačné, resp. referenčné hodnoty TAG nižšie než v predošlých 4 súboroch. Znížili sme preto dolnú hranicu TAG o jeden stupeň na 0,5 mmol/l. Po takejto úprave umelý súbor zahŕňa 96,5 % hodnôt holandského súboru, 97,0 % kórejského súboru a 97,4 % írského súboru. Výsledná matica hodnôt je uvedená v tabuľke 1.

Tab. 1. Matica hodnôt cholesterolu, HDL-cholesterolu a triglyceridov v umelom súbore. Prvé 3 stĺpce – hodnoty v mmol/l, následné 3 stĺpce – prepočítané hodnoty v teda mg/dl, teda mg%

TC [mmol.l ⁻¹]	HDL-C [mmol.l ⁻¹]	TAG [mmol.l ⁻¹]	TC (mg/dl) [mg.dl ⁻¹]	HDL-C [mg.dl ⁻¹]	TAG [mg.dl ⁻¹]
2,0	0,5	0,5	77,3	19,3	44,2
2,5	1,0	1,0	96,7	38,7	88,5
3,0	1,5	1,5	116,0	58,0	132,7
3,5	2,0	2,0	135,3	77,3	177,0
4,0	2,5	2,5	154,7	96,7	221,2
4,5	3,0	3,0	174,0	116,0	265,5
5,0	-	3,5	193,3	-	309,7
5,5	-	4,0	212,7	-	354,0
6,0	-	4,5	232,0	-	398,2
6,5	-	5,0	251,4	-	442,5
7,0	-	5,5	270,7	-	486,7
7,5	-	6,0	290,0	-	531,0
8,0	-	-	309,4	-	-
Rozpätie hodnôt			Rozpätie hodnôt		
2,0–8,0	0,5–3,0	0,5–6,0	77,3–309,4	19,3–116,0	44,2–531,0



Obr. 1. A: Bland-Altmanov graf pre vzťah LDL-cholesterolu stanoveného rovnicami Martin a Sampson; B: Bland-Altmanov graf pre vzťah LDL-cholesterolu stanoveného rovnicami Martin a Friedewald; C: Passing a Bablokov graf pre vzťah LDL-cholesterolu stanoveného rovnicami Martin a Sampson; D: Passing a Bablokov graf pre vzťah LDL-cholesterolu stanoveného rovnicami Martin a Friedewald



Obr. 2. A: Bland-Altmanov graf pre vzťah LDL-cholesterolu stanoveného rovnicami Martin a Cordova; B: Passing a Bablokov graf pre vzťah LDL-cholesterolu stanoveného rovnicami Martin a Cordova; C: Horský graf pre vzťah LDL-cholesterolu stanoveného rovnicami Friedewald a Sampson voči rovnici Martin; D: Horský graf pre vzťah LDL-cholesterolu stanoveného rovnicami Cordova a Sampson voči rovnici Martin

Tab. 2. Sumárna štatistika hodnôt LDL-cholesterolu vypočítaných z umelého súboru štyrmi rôznymi rovnicami. SD = smerodajná odchýlka, P = hodnoty príslušných percentilov

	Martin LDL-C	Sampson LDL-C	Friedewald LDL-C	Cordova LDL-C
N	900	900	900	900
Minimum	-1,150	-1,350	-2,740	0,000
Maximum	7,140	7,390	7,270	5,630
Mean	2,435	2,231	1,923	2,557
Median	2,420	2,180	1,880	2,630
SD	1,8120	1,8702	2,0936	1,4548
2.5 - 97.5 P	-0,710 to 5,960	-0,890 to 5,870	-1,830 to 5,860	0,000 to 5,250
5 - 95 P	-0,460 to 5,465	-0,615 to 5,365	-1,370 to 5,360	0,380 to 4,880
10 - 90 P	-0,0600 to 4,860	-0,195 to 4,815	-0,830 to 4,770	0,750 to 4,500
25 - 75 P	1,040 to 3,830	0,720 to 3,625	0,295 to 3,490	1,500 to 3,750

Matrica $13 \times 6 \times 12$ poskytuje 936 možných kombinácií. Z nich 36 kombinácií znamená negatívnu hodnotu non-HDL-cholesterolu, preto boli ako nereálne vynechané. Zostávajúcich 900 kombinácií predstavuje 900 členov umelého súboru.

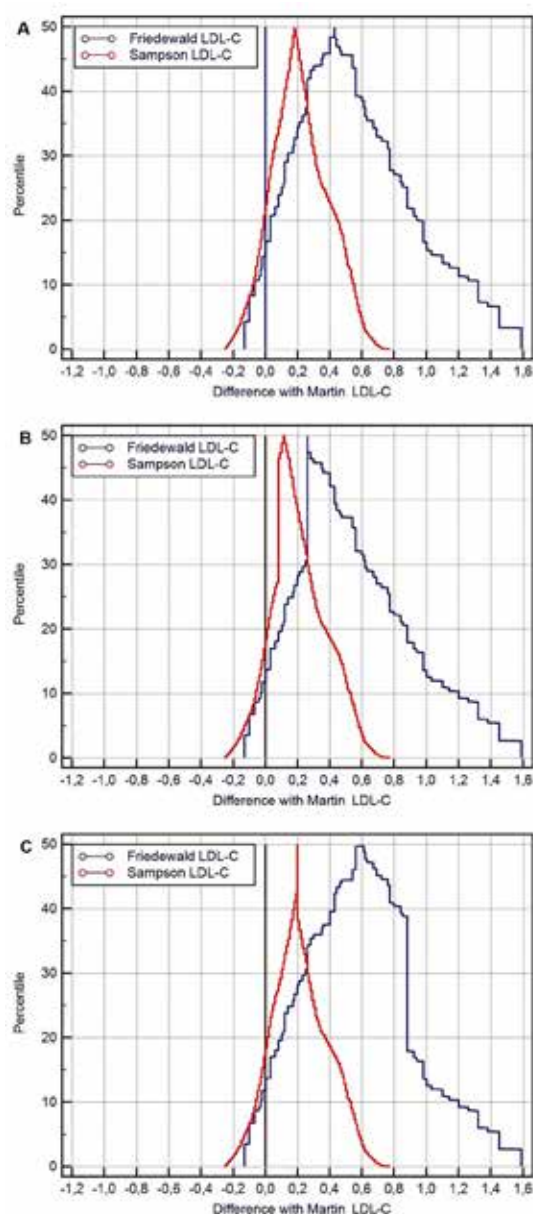
Základné porovnania rovnice Martin s rovnicami Friedewald, Sampson a Cordova

Pomocou štandardných štatistických numerických a grafických postupov, ktorých interpretácia je podrobne popísaná napr. v monografii (G a š k o, 2017) prezentujeme porovnanie LDL-C vypočítaného rovnicou Martin s LDL-C vypočítaným postupne rovnicami Friedewald, Sampson a Cordova. Rovnicu Martin sme zvolili za základnú metódu pre jej opakovanými štúdiami overenú najlepšiu zhodu s metódou zlatého štandardu, v porovnaní so všetkými ostatnými rovnicami.

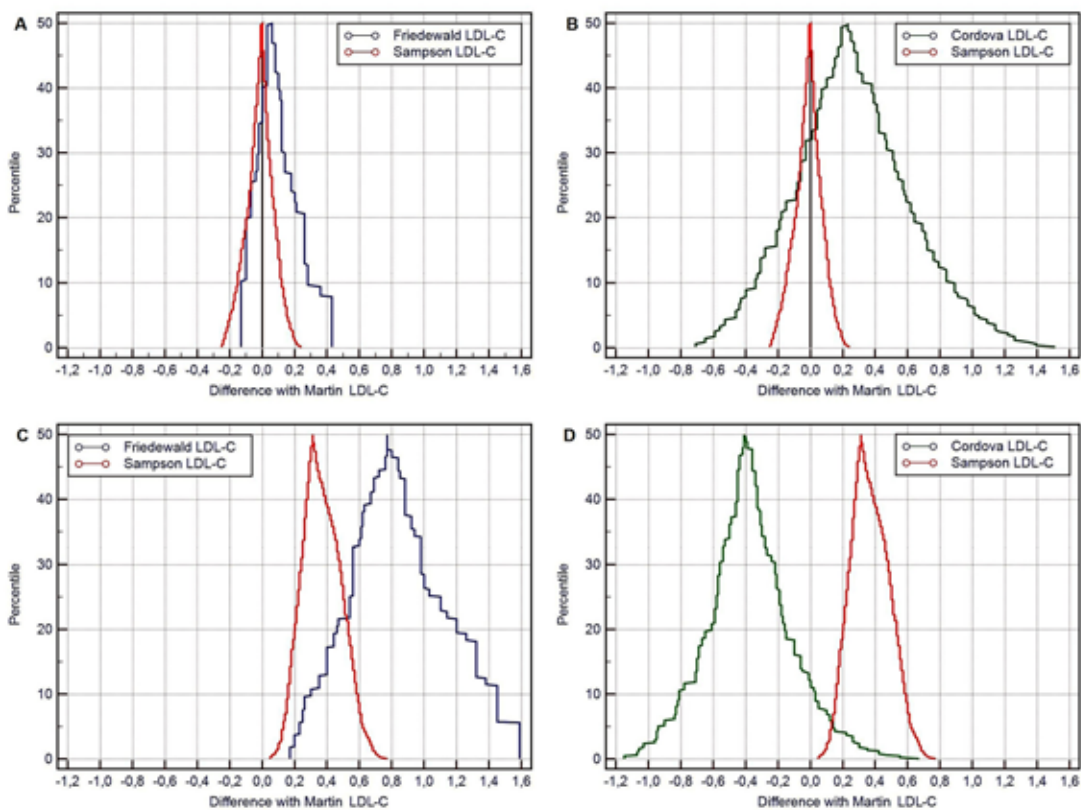
Na obrázkoch 1 a 2 sú vykreslené Bland-Altmanove grafy, Passing a Bablokove grafy a horské grafy (známe aj ako zložené empirické kumulatívne distribučné grafy) pre všetky 3 porovnania. Všetky typy grafov ukazujú, že najlepšia je zhoda rovnice Martin s rovnicou Sampson. Rovnice Friedewald a Cordova dávajú horšie, vzájomne podstatne rozdielne výsledky. V hornej časti tabuľky č. 3 sú uvedené hodnoty concordance correlation coefficient (CCC), najvyššiu hodnotu má rovnica Martin s rovnicou Sampson. V tabuľke č. 2 je základná deskriptívna štatistika LDL-C vypočítaných rôznymi rovnicami.

Demonštrácia závislosti vypočítaných hodnôt LDL-C na zložení súboru

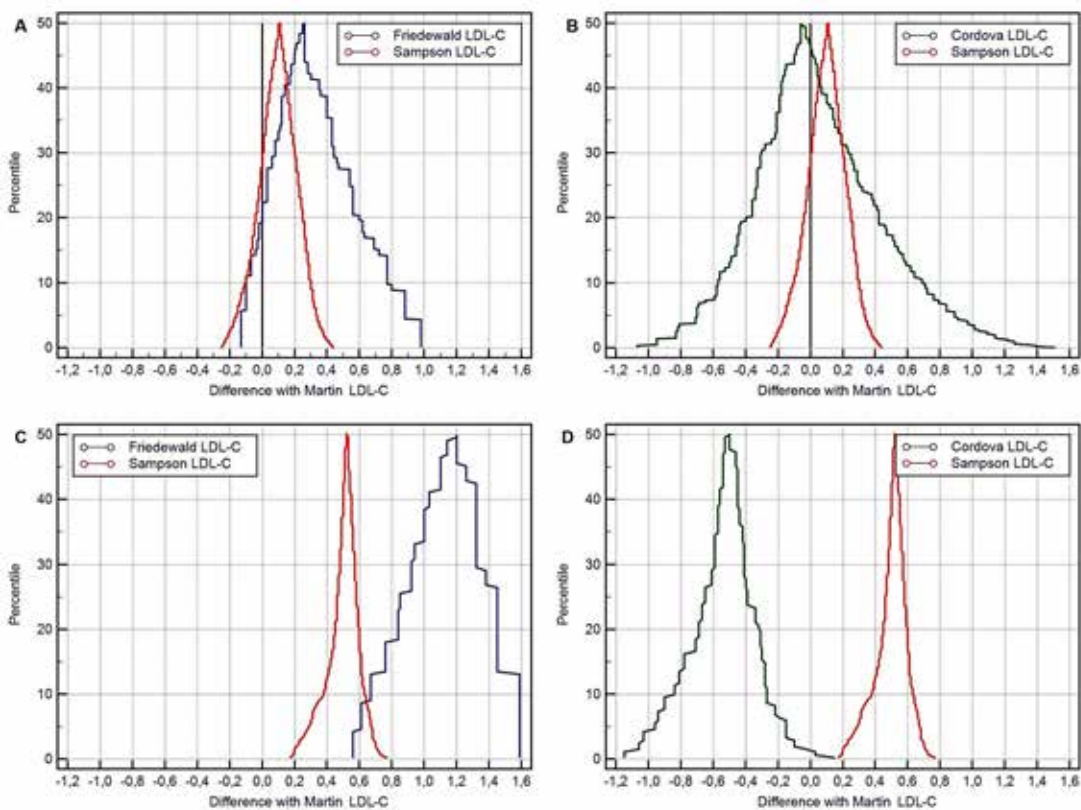
Na obrázku 3 sú horské grafy pre vzťah LDL-cholesterolu stanoveného rovnicami Friedewald a Sampson voči rovnici Martin v 3 umelých súboroch. Zloženie základ-



Obr. 3. Horské grafy pre vzťah LDL-cholesterolu stanoveného rovnicami Friedewald a Sampson voči rovnici Martin v 3 umelých súboroch. A: Súbor 900; B: Súbor 900 zväčšený o 200 členov s hodnotami TC = 2 mmol/l, HDL-C = 1 mmol/l, TAG = 2 mmol/l; C: Súbor 900 zväčšený o 200 členov s hodnotami TC = 4 mmol/l, HDL-C = 3 mmol/l, TAG = 4 mmol/l



Obrázok 4. Horské grafy pre vzťah LDL-cholesterolu stanoveného rovnicami Friedewald, Sampson a Cordova voči rovnici Martin v umelých súboroch. A a B: Súbor s hodnotami TAG pod 2,8 mmol/l, n = 375; C a D: Súbor s hodnotami TAG nad 2,8 mmol/l, n = 525



Obr. 5. Horské grafy pre vzťah LDL-cholesterolu stanoveného rovnicami Friedewald, Sampson a Cordova voči rovnici Martin v umelých súboroch. A a B: Súbor s hodnotami TAG pod 4,52 mmol/l, n = 675; C a D: Súbor s hodnotami TAG nad 4,52 mmol/l, n = 225

ného umelého súboru je uvedené v tabuľke 1 (obrázok 3A). Tento súbor bol zväčšený o 200 členov s hodnotami TC = 2 mmol/l, HDL-C = 1 mmol/l, TAG = 2 mmol/l (obrázok 3B). Alternatívne bol tento súbor zväčšený o 200 členov s hodnotami TC = 4 mmol/l, HDL-C = 3 mmol/l, TAG = 4 mmol/l (obrázok 3C). Už takto veľmi simplificovane pozmenené 3 súbory majú iné tvary horských grafov, a samozrejme, aj iné numerické a grafické výstupy.

Medzi dobre popísané limity Friedewaldovej rovnice patrí, že je zvýšene nepresná pri hodnotách TAG nad 2,82 mmol/l, a pri hodnotách TAG nad 4,52 mmol/l sa kvôli vysokej nepresnosti jej použitie už neodporúča (W o l s k a, R e m a l e y, 2020). Umelý súbor sme podľa hodnôt TAG rozdelili na dva podsúbory: súbor s hodnotami TAG pod 2,82 mmol/l, n = 375, a súbor s hodnotami TAG nad 2,82 mmol/l, n = 525. Na obrázku 4 sú horské grafy pre porovnanie rovnice Martin s rovnicou Friedewald v týchto podsúboroch.

Umelý súbor sme ďalej podľa hodnôt TAG rozdelili na dva iné podsúbory: súbor s hodnotami TAG pod 4,52 mmol/l, n = 675, a súbor s hodnotami TAG nad 4,52 mmol/l, n = 225. Na obrázku 5 sú horské grafy pre porovnanie rovnice Martin s rovnicou Friedewald v týchto podsúboroch. Porovnaním grafov na obrázkoch 4 a 5 sú jasne viditeľné zväčšujúce sa rozdiely medzi hodnotami LDL-C získanými oboma rovnicami pri zvyšujúcich sa hodnotách TAG. Tieto zvyšujúce sa rozdiely sa prejavujú aj znižovaním hodnôt CCC, a platia aj pre rovnice Sampson a Friedewald (tabuľka 3).

Na všetky výpočty a vykreslenia všetkých grafov bol použitý MedCalc Statistical Software verzia 19.4.0 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2020).

DISKUSIA

Nové poznatky medicíny založenej na dôkazoch v patofyziológii, diagnostike a manažovaní aterosklerózy viedli, popri iných guidelineoch (L a n g l o i s et al, 2018; F e r e n c e et al, 2019; L a n g l o i s et al, 2020), za ostatné desaťročie ku vydaniu 3 verzií doporučených postupov k diagnostike a liečbe dyslipoproteínemii autorov zastupujúcich Európsku kardiologickú spoločnosť (ESC) a Európsku spoločnosť pre aterosklerózu (EAS) – verzie 2011, 2016 a 2019 (M a c h et al, 2020). Vo všetkých je LDL-C

Tab. 3. Hodnoty concordance correlation coefficient CCC pre porovnanie rovnice Martin LDL-C s rovnicami Sampson LDL-C, Friedewald LDL-C a Cordova LDL-C v rôzne zložených umelých súboroch

Celý umelý súbor, n = 900		
Variable X	Variable Y	CCC
Martin LDL-C	Sampson LDL-C	0,986
Martin LDL-C	Friedewald LDL-C	0,937
Martin LDL-C	Cordova LDL-C	0,952
TAG < 2,82 mmol/l, n = 375		
Martin LDL-C	Sampson LDL-C	0,999
Martin LDL-C	Friedewald LDL-C	0,996
Martin LDL-C	Cordova LDL-C	0,953
TAG > 2,82 mmol/l, n = 525		
Martin LDL-C	Sampson LDL-C	0,974
Martin LDL-C	Friedewald LDL-C	0,891
Martin LDL-C	Cordova LDL-C	0,952
TAG < 4,52 mmol/l, n = 675		
Martin LDL-C	Sampson LDL-C	0,995
Martin LDL-C	Friedewald LDL-C	0,974
Martin LDL-C	Cordova LDL-C	0,958
TAG > 4,52 mmol/l, n = 225		
Martin LDL-C	Sampson LDL-C	0,951
Martin LDL-C	Friedewald LDL-C	0,821
Martin LDL-C	Cordova LDL-C	0,936

uvádzaný ako kľúčový laboratórny parameter. Ako zaujímavosť možno uviesť, že práca porovnávajúca najnovšie Európske odporúčania s najnovšími odporúčaniami USA odborných spoločností (S i n g h et al, 2020) na 17 stranách textu spomína LDL-C až 90-krát. Klinický výskum dáva dôkazy pre znižovanie jeho hodnôt. Výstižne to zhrnuli vo svojom komentári v časopise Lancet B e r b e r i c h, H e g e l e (2020) LDL cholesterol: lower, faster, younger (B e r b e r i c h, H e g e l e, 2020), teda čím nižšie, čo najskôr a od čo najmladšieho veku. Klinický výskum LDL-C vchádza aj do nových odborov medicíny (W a g n e r et al, 2019). Záujem o „nájdanie“ čo najpresnejšej v praxi použiteľnej metódy stanovenia LDL-C je preto pochopiteľný.

Popísali sme dve metodologicky slabé stránky porovnávania metód stanovenia LDL-C. Navrhli sme spôsob, ktorým možno prvú z nich eliminovať. Ak sa budú výpoč-

tové metódy stanovenia LDL-C, popísané v minulosti či novo navrhované, porovnávať na štandardnom umelom súbore, odpadne veľký prvok neistoty merania vyplývajúci zo zloženia výskumného súboru pacientov, na ktorom je porovnávanie vykonávané. Porovnanie bude kedykoľvek a kdekoľvek reprodukovateľné. Presnejšie povedané, raz vykonané výpočty budú nemenné a platné kdekoľvek. Druhú slabú stránku tento postup úplne eliminovať nedokáže. Z jasných dôvodov nemôžeme vykonať meranie LDL-C na umelom súbore metódou preparatívnej ultracentrifugácie. Navrhujeme preto ako „kvázi gold standard“ (reference measurement procedure) pre porovnávacie štúdie metódu, ktorá je, podľa dnešného stavu poznania, najspoľahlivejšou výpočtovou metódou stanovenia LDL-C, rovnicu Martin. Eliminuje sa tým aspoň prvok neistoty spočívajúci v tom, že sa ako „náhradný gold standard“ v rôznych výskumoch a rôznych publikáciách používa buď široká škála priamych metód merania LDL-C – nedostatočne vzájomne harmonizovaných a zaťažených rôzne veľkými chybami; alebo – zo zotrvačnosti či zo zvyku – Friedewaldova rovnica, ktorej podstatne vyššia miera nepresnosti oproti Martinovej rovnici je overená.

Stručne sme popísali zdôvodnenie práve takej matrice hodnôt lipidov TC, HDL-C a TAG, aké je uvedené v tabuľke 1 a vylúčenie 36 kombinácií znamenajúcich negatívnu hodnotu non-HDL-cholesterolu. Výsledný umelý súbor má 900 členov. Elimináciu ďalších kombinácií, napríklad 88 kombinácií, u ktorých vyšli hodnoty LDL-Martin negatívne, s výsledným súborom o 812 členoch, nepokladáme za potrebnú. Podľa nášho názoru ani ďalšie rozširovanie súboru o extrémne vysoké či extrémne nízke hodnoty niektorého z trojice týchto lipidov nie je zmysluplné. Je však pravdou, že v niektorých, pre nás exotických, štátoch môžu byť populačné hodnoty iné. Nižšie hodnoty, s vyšším percentuálnym zastúpením hodnôt pod rozpätím popísanej matrice, sú u detí (H e n a u w et al, 2014; H i g g i n s et al, 2018). Vyššie hodnoty TC majú pacienti s familiárnou hypercholesterolémiou (FH), v Gréckom registre FH malo z 1423 dospelých pred nasadením liečby 50 % hodnoty nad 8,2 mmol/l (R i z o s et al, 2020). Vyššie percentuálne zastúpenie hodnôt TAG pod 0,5 mmol/l bolo zistené v Rómskej dospeljej populácii (H u b k o v á et al, 2014).

Koncepty neistoty merania sú príliš zložité (B r a g a, P a n t e g h i n i, 2020; F a r r a n c e et al, 2018) a, ako bolo konečne jasne popísané, nepoužiteľné v rutinnej laboratórnej medicíne (M i l i n k o v i č, J o v i č i č, I g n j a

t o v i č, 2020), preto v tejto práci nepoužívame ich terminológiu.

Pre prípadných záujemcov je na vyžiadanie k dispozícii Excel súbor s hodnotami umelého súboru, a ďalší súbor s výpočtami LDL-cholesterolu podľa Martinovej rovnice so 180-poľovou tabuľkou, spracovanou pre jednotky mmol/l.

Podakovanie: Ďakujeme MUDr. Eve Ďurovcovej, PhD, za prečítanie rukopisu a prínosné pripomienky.

Konflikt záujmov: Autori deklarujú, že nie sú v konflikte záujmov. RG bol hlavným riešiteľom výskumného grantu Slovenskej kardiologickej spoločnosti „LDL cholesterol“.

LITERATÚRA

1. **Balder, J. et al. (2017):** Lipid and lipoprotein reference values from 133,450 Dutch Lifelines participants: Age- and gender-specific baseline lipid values and percentiles. *Journal of Clinical Lipidology*, 11, pp. 1055–1064. doi.org/10.1016/j.jacl.2017.05.007.
2. **Berberich, A. J., Hegele, R. A. (2020):** LDL cholesterol: lower, faster, younger? *Lancet, Diabetes and Endocrinology*, 8, pp. 5–7. doi: 10.1016/S2213-8587(19)30389-4.
3. **Braga, F., Panteghini, F. (2020):** The utility of measurement uncertainty in medical laboratories. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. doi.org/10.1515/ccml-2019-1336.
4. **Cordova, C.M.M., Cordova, M. (2013):** A new accurate, simple formula for LDL-cholesterol estimation based on directly measured blood lipids from a large cohort. *Annals of Clinical Biochemistry*, 50, pp. 13–19. doi:10.1258/acb.2012.011259.
5. **Cordova, C. M. M. et al. (2018):** Evaluation of a new equation for LDL-c estimation and prediction of death by cardiovascular related events in a German population-based study cohort. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 78, pp. 187–196. doi.org/10.1080/00365513.2018.1432070.
6. **Cordova, C. M. M. et al. (2020):** Martin's, Friedewald's and Cordova's formulas compared to LDL-C directly measured in Southern Brazil. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 56, pp. 1–6. doi.org/10.5935/1676-2444.20200003.
7. **De Wolf, H. A. et al. (2020):** How well do laboratories adhere to recommended guidelines for dyslipidaemia management in Europe? The CARDiac MARKer Guideline Uptake in Europe (CAMARGUE) Study. *Clinica Chimica Acta*, 508, pp. 267–272. doi:10.1016/j.cca.2020.05.038.

8. **El Khoury, J. M. et al. (2019):** Perspectives on the Changing Landscape of Measuring Cardiovascular Risk Related to LDL. *Clinical Chemistry*, 65, pp. 1487–1492. doi: 10.1373/clinchem.2019.307306.
9. **Farrance, I., Badrick, T., Frenkel, R. (2018):** Uncertainty in measurement and total error: different roads to the same quality destination? *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 56, pp. 2010–2014. doi.org/10.1515/cclm-2018-0421.
10. **Ference, B. A. et al. (2019):** Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *European Heart Journal*, 38, pp. 2459–2472. doi:10.1093/eurheartj/ehx144.
11. **Friedecký, D. et al. (2019):** Stanovení lipidů. Dotazník dle kontrolního programu RFA SEKK 2019. *FONS bulletin*, 29, pp. 14–20.
12. **Gaško, R. (2011):** Systematický prehľad: Porovnanie priamych a nepriamych metód stanovenia LDL-cholesterolu. *Laboratórna Diagnostika*, 16, pp. 37–65.
13. **Gaško, R. (2015):** *Laboratory Method Comparison Studies, nový prístup ku porovnávaniu s použitím umelého súboru*. 2. doplnené vyd. Košice: EduStat, s. r. o., 124 p. ISBN 978-80-972005-5-8.
14. **Gaško, R. (2017):** *Porovnávanie metód merania – „Method Comparison Studies“ – príručka správnych štatistických postupov*. Košice: EduStat, s. r. o., 108 p. ISBN 978-80-972174-1-9.
15. **Gaško, R., Fraňo, L. a Gašková, Z. (2013):** LDL-cholesterol – problém nepresnosti stanovenia vyriešený, Martin nahrádza Friedewalda. *Slovenský Lekár*, 23(37), pp. 189–191.
16. **Gaško, R., Sánchez-Meca, J. (2009):** LDL cholesterol: Kritické hodnotenie analytickej presnosti Friedewaldovej rovnice. Metaanalýza. *Cardiology*, 18, pp. 244–255.
17. **Ghasemi, A. et al. (2018):** New modified Friedewald formulae for estimating low-density lipoprotein cholesterol according to triglyceride levels: extraction and validation. *Endocrinology*, 62, pp. 404–411. doi.org/10.1007/s12020-018-1685-2.
18. **Henauw, S. De et al. (2014):** Blood lipids among young children in Europe: results from the European IDEFICS study. *International Journal of Obesity*, 38, pp. S67–S75. doi.org/10.1038/ijo.2014.137.
19. **Higgins, et al. (2018):** Pediatric reference intervals for calculated LDL cholesterol, non-HDL cholesterol, and remnant cholesterol in the healthy CALIPER cohort. *Clinica Chimica Acta*, 486, pp. 129–134. doi:10.1016/j.cca.2018.07.028.
20. **Hubková, B. et al. (2014):** Assessment of clinical biochemical parameters in Roma minority residing in Eastern Slovakia compared with the majority population. *Central European Journal of Public Health*, Suppl 14, pp. S12–S17.
21. **Hughes, D. et al. (2020):** Lipid reference values in an Irish population. *Irish Journal of Medical Science*, pp. 1–11. doi.org/10.1007/s11845-020-02309-0.
22. **Huchegowda, R. et al. (2019):** Derivation of a new formula for the estimation of low-density lipoprotein cholesterol. *Indian Journal of Health Sciences and Biomedical Research*, 12, pp. 223–227. doi:10.4103/kleuhsj.kleuhsj_86_19.
23. **Chaen, H. et al. (2016):** Validity of a Novel Method for Estimation of Low-Density Lipoprotein Cholesterol Levels in Diabetic Patients. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 23, pp. 1355–1364. doi: 10.5551/jat.35972.
24. **Karkhaneh, A. et al. (2019):** Evaluation of eight formulas for LDL-C estimation in Iranian subjects with different metabolic health statuses. *Lipids in Health and Disease*, 18: 231, pp. 1–11. doi.org/10.1186/s12944-019-1178-1.
25. **Kohli-Lynch, C. N. et al. (2020):** The clinical utility of apoB versus LDL-C/non-HDL-C. *Clinica Chimica Acta*, 508, pp. 103–108. doi.org/10.1016/j.cca.2020.05.001.
26. **Langlois, M. R. et al. (2018):** Quantifying Atherogenic Lipoproteins: Current and Future Challenges in the Era of Personalized Medicine and Very Low Concentrations of LDL Cholesterol. A Consensus Statement from EAS and EFLM. *Clinical Chemistry*, 64, pp. 1006–1033. doi: 10.1373/clinchem.2018.287037.
27. **Langlois, M. R. et al. (2020):** Quantifying atherogenic lipoproteins for lipid-lowering strategies: consensus-based recommendations from EAS and EFLM. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 58, pp. 496–517. doi.org/10.1515/cclm-2019-1253.
28. **Lee, T. et al. (2019):** Deep neural network for estimating low density lipoprotein cholesterol. *Clinica Chimica Acta*, 489, pp. 35–40. doi.org/10.1016/j.cca.2018.11.022.
29. **Mach, F. et al. (2020):** 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *European Heart Journal*, 41, pp. 111–188. doi:10.1093/eurheartj/ehz455.
30. **Martin, S. S. et al. (2013):** Comparison of a novel method vs the Friedewald equation for estimating low-density lipoprotein cholesterol levels from the standard lipid profile. *JAMA*, 310, pp. 2061–2068. doi: 10.1001/jama.2013.280532.
31. **Martin, S. S. et al. (2018):** Comparison of Low-Density Lipoprotein Cholesterol Assessment by Martin/Hopkins Estimation, Friedewald Estimation, and Preparative Ultracentrifugation.

- gation. Insights From the FOURIER Trial. *JAMA Cardiology*, 3, pp. 749–753. doi:10.1001/jamacardio.2018.1533.
32. **Milinković, N., Jovičić, S., Ignjatović, S. (2020):** Measurement uncertainty as a universal concept: can it be universally applicable in routine laboratory practice? *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. doi.org/10.1080/10408363.2020.1784838.
 33. **Molavi, F. et al. (2020):** Comparison common equations for LDL-C calculation with direct assay and developing a novel formula in Iranian children and adolescents: the CASPIAN V Study. *Lipids in Health and Disease*, 19, pp. 1–8. doi.org/10.1186/s12944-020-01306-7.
 34. **Palmer, K. M. et al. (2019):** Comparing a novel equation for calculating low-density lipoprotein cholesterol with the Friedewald equation: A VOYAGER analysis. *Clinical Biochemistry*, 64, pp. 24–29. doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.10.011.
 35. **Pallazola, V. A. et al. (2018):** Time to Make a Change: Assessing LDL-C Accurately in the Era of Modern Pharmacotherapeutics and Precision Medicine. *Current Cardiovascular Risk Reports*, 12, pp. 1–7. doi.org/10.1007/s12170-018-0590-9.
 36. **Petridou, E., Anagnostopoulos, K. (2019):** Validation of the novel Martin method for LDL cholesterol estimation. *Clinica Chimica Acta*, 496, pp. 68–75. doi.org/10.1016/j.cca.2019.06.023.
 37. **Rim, J. H. et al. (2016):** Comparison and Validation of 10 Equations Including a Novel Method for Estimation of LDL-cholesterol in a 168,212 Asian Population. *Medicine*, 95, pp. 1–8. doi.org/10.1097/MD.0000000000003230.
 38. **Rizos, C. V. et al. (2020):** Achieving low-density lipoprotein cholesterol targets as assessed by different methods in patients with familial hypercholesterolemia: an analysis from the HELLAS-FH registry. *Lipids in Health and Disease*, 19:114. doi.org/10.1186/s12944-020-01289-5.
 39. **Sampson, M. et al. (2020):** A New Equation for Calculation of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Patients With Normolipidemia and/or Hypertriglyceridemia. *JAMA Cardiology*, pp. E1–E9. doi:10.1001/jamacardio.2020.0013.
 40. **Singh, M. et al. (2020):** Comparison of Transatlantic Approaches to Lipid Management: The AHA/ACC/Multisociety Guidelines vs the ESC/EAS Guidelines. *Mayo Clinic Proceedings*, 95, pp. 998–1014. doi.org/10.1016/j.mayocp.2020.01.011.
 41. **Solnica, B. et al. (2020):** 2020 Guidelines of the Polish Society of Laboratory Diagnostics (PSLD) and the Polish Lipid Association (PoLA) on laboratory diagnostics of lipid metabolism disorders. *Archives of Medical Science*, 16, pp. 237–252. doi.org/10.5114/aoms.2020.93253.
 42. **Wolska, A., Remaley, A. T. (2020):** Measuring LDL-cholesterol: what is the best way to do it? Review. *Current Opinion in Cardiology*, 35, pp. 405–411. doi:10.1097/HCO.0000000000000740.
 43. **Wagner, C. J. et al. (2019):** LDL cholesterol relates to depression, its severity, and the prospective course. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 92, pp. 405–411. doi.org/10.1016/j.pnpbp.2019.01.010.
 44. **Zafrir, B., Saliba, W., Flugelman, M. Y. (2020):** Comparison of Novel Equations for Estimating Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Patients Undergoing Coronary Angiography. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 27, pp. 1–15. doi.org/10.5551/jat.57133.



HDL PROFIL JEDINCOV S ATEROSKLEROTICKÝM POŠKODENÍM PERIFÉRNÝCH CIEV

Kaško, M., Oravec, S.

I. interná klinika LF UK a UNB, Mickiewiczova 13, 813 69 Bratislava

e-mail: martin.kasko@sm.unb.sk

SÚHRN

Kardiovaskulárne ochorenia predstavujú najväčšie bremeno morbidity a mortality všeobecnej dospelaj populácie vyspelých krajín. Hlavnou príčinou je aterosklerotické postihnutie cievneho systému na podklade vplyvu rizikových faktorov, z ktorých svojou komplexnosťou vyniká dyslipidémia. V klinickej praxi sa účinky HDL triedy merajú prakticky len stanovovaním koncentrácie HDL cholesterolu. Je otáznou, či tento klinický prístup poskytuje dostatočnú relevanciu pri hodnotení tak celkového kardiovaskulárneho rizika, ako i účinku hypolipidemickej liečby. Medzi najčastejšie manifestácie aterosklerózy patrí končatinovocievna artériová choroba (KACH). U jedincov s diagnostikovanou KACH bol v rámci HDL triedy pozorovaný posun v zastúpení HDL častíc od väčších smerom k malým. Tento trend zmeny konštelácie lipoproteínov HDL sa zdá byť patognomický pre dysfunkčný lipoproteínový profil v rámci patologického stavu kardiovaskulárneho systému.

Kľúčové slová: subfrakcie lipoproteínov; ateroskleróza; HDL cholesterol; končatinovocievna artériová choroba

ABSTRACT

In clinical praxis the estimation of the effect of high-density lipoprotein (HDL) is practically based just on the HDL cholesterol concentration measurement. The grounds for increasing clinical interest are whether this approach is enough to evaluate the overall cardiovascular diseases risk burden as well as whether the hypolipidemic therapy is efficient. In this article, there was a focus on to describe the HDL profile in lower extremity artery disease (LEAD). In patients with LEAD was observed a disturbed constellation of particular subpopulations, considered as dysfunctional, in the meaning of shift from large to small HDL particles within the HDL family. This trend of lipoprotein constellation seems to be pathognomonic for dysfunctional lipoprotein profile under pathological state of the cardiovascular system.

Key words: lipoprotein subfractions; atherosclerosis; HDL cholesterol; lower extremity artery disease

ÚVOD

Choroby kardiovaskulárneho (K-V) systému (Gavorník, 2009) majú za dôsledok najviac úmrtí a podieľajú sa najväčšou mierou na chorobnosti populácie celosvetovo (GBD, 2018). Končatinovocievna artériová choroba (KACH; v anglosaskej literatúre – LEAD – Lower Extremity Artery Disease) predstavovala v roku 2017 zdravotnú záťaž obyvateľstva takmer 120 miliónmi prípadov v celosvetovom meradle, a je tak treťou najčastejšou príčinou chorobnosti na aterosklerotické kardiovaskulárne ochorenia (GBD, 2018). Svetová zdravotnícka organizácia si stanovila na obdobie rokov 2015–2020 globálny cieľ číslo 1: 25 % relatívnu redukciu celkovej úmrtnosti na kardiovaskulárne choroby, nádorové choroby, *diabetes mellitus* a chronické respiračné choroby.

Na prvom mieste sa dôvodne uvádzajú K-V choroby, čo si v dobe pandémie angiometabolického syndrómu X (Gavorník et al., 2012) vyžaduje zavedenie nových preventívno-liečebných prístupov. Súčasne sa ukazuje, že dôležitejšie než určovanie hladiny celkového cholesterolu v sére/plazme, je určovanie koncentrácie cholesterolu v lipoproteínových populáciách LDL (low-density lipoprotein) a HDL (high-density lipoprotein) (Oravec et al., 2015; DGAC, 2015). Ukázalo sa, že takzvaný „zlý“ cholesterol má časť, ktorá je aterogénnejšia – malé denzné LDL (small dense LDL – sdLDL) (subfrakcie 3–7), a časť ktorá je menej, respektíve neaterogénna (subfrakcie 1–2) (Arsenaull et al., 2007; Oravec et al., 2011a). Podobne i HDL trieda sa skladá z niekoľkých subfrakcií; ich význam však v procese aterogenézy nie je taký jednoznačný, aký sa ukázal u LDL triedy. Zloženie tejto časti lipoproteínového spektra je predmetom intenzívneho vedeckého výskumu v oblasti porúch metabolizmu lipoproteínov. Z toho vyplýva požiadavka pre klinickú prax: Zaviesť také laboratórne metódy analýzy HDL frakcií, ktoré budú mať vyššiu klinickú výpovednosť o HDL triede vo vzťahu ku kardiovaskulárnemu riziku, kardiovaskulárnym chorobám i pri monitorovaní rizikových pacientov tak v primárnej, ako i sekundárnej prevencii.

Nízke hladiny HDL cholesterolu sa ukázali byť asociované so zvýšeným výskytom kardiovaskulárných chorôb. Teória reziduálneho rizika predpokladá, že napriek dosiahnutiu cieľových hodnôt LDL pri liečbe liekmi ovplyvňujúcimi hladinu lipoproteínov v sére, pretrváva zvýšené riziko, respektíve vysoký výskyt K-V príhod pričinením

nízkych hodnôt HDL cholesterolu. Keďže terapeutické úsilie zamerané na zvýšenie hladiny HDL cholesterolu K-V riziko neznížilo (Keene et al., 2014), objasnenie príčin reziduálneho rizika je naďalej vysoko aktuálne. Experimenty založené na Mendelovskej randomizácii taktiež nepotvrdili kauzalitu HDL → aterosklerotická choroba (Voght et al., 2012). Jedným z vysvetlení sa zdá byť obmedzená výpovedná hodnota aktuálne používaných diagnostických postupov pri vyšetrení HDL v súčasnej klinickej praxi. Testovanie a vyhodnocovanie zmien HDL spektra v jeho komplexnosti bude potrebovať inovatívnejšie diagnostické postupy, než len samotné meranie celkovej koncentrácie HDL cholesterolu. Práve analýza subpopulácií v HDL spektre ponúka takúto možnosť merania, zároveň i objasnenia úlohy HDL v procese (anti)aterogenézy K-V chorôb.

ATEROSKLERÓZA

Ateroskleróza je najrozšírenejším a najzávažnejším kauzálnym faktorom K-V ochorení, na ktoré ľudia zomierajú viac, než na ktorúkoľvek inú príčinu vo svete (WHO, 2018). Ateroskleróza je komplexný patologický proces odohrávajúci sa v stene tepny zahŕňajúci predovšetkým depozíciu lipidov v prostredí zápalu. Veľké štúdie ASCOT, ASTEROID, CARDS, CARE, FIELD, PROSPER, PROVE IT-TIMI 22 jasne preukázali spojitost medzi mierou aterosklerotického poškodenia i prognózy ochorenia s hladinami cholesterolu, zvlášť LDL cholesterolu (Filipová et al., 2006).

Ateroskleróza predstavuje chronický patologický proces cievnej steny, ktorý je sprevádzaný chronickým zápalom. Ten sa hlavnou mierou podieľa na rozvoji endotelovej dysfunkcie. Pôsobením mediátorov chronického zápalu uvoľňovaných predovšetkým z monocytov a T-lymfocytov, ktoré migrujú do subendotelového priestoru, sa iniciuje vznik aterosklerotického plátu. Monocyty sa menia na makrofágy, pohlcujú oxidované lipoproteíny (predovšetkým oxidovaný LDL – oxLDL), a tým z nich vznikajú penové bunky; to opäť stimuluje imunitný systém k tvorbe prozápalových cytokínov a chemokínov (Nyyssönen et al., 2012). V stene cievy sa množia hladké svalové bunky s následným rozvojom fibrózy a vzniku kalcifikátov, intima cievnej steny hrubne. Intenzita zápalu koreluje s instabilitou aterosklerotického plátu. Zápalovom postihnutý aterosklerotický plát je príčinou poškodenia intimy, jej dezintegrácie, čo sa napokon stáva podkladom pre orgánovo-cievnu ischémiu.

Všeobecne preukázané prepojenie hladín markerov zápalu (napríklad interleukínu-6 [IL-6], CRP) s antropometrickými ukazovateľmi, korelujúce s rizikovými faktormi aterosklerotickej choroby naznačujú metabolický status takýchto jedincov, ktorý smeruje k rozvoju proaterogénneho/proaterotrombotického statusu (W e i n e r et al., 2014). Potvrdila sa korelácia BMI (body mass index) so systémovým zápalom, čo sa vysvetlilo objavom produkcie CRP/IL-6 adipocytmi (N i c h o l l s et al., 2006). Preukázaná úloha LDL deponujúceho cholesterolu do periférie, do cievnjej steny, v procese aterogenézy spočíva v oxidačne zmenenom LDL – oxLDL, ktorý po prestupe intimou interaguje s imunokompetentnými bunkami imunitného systému, predovšetkým s makrofágmi. Dochádza k vzniku penových buniek, tie sa hromadia a vytvárajú aterosklerotický plát. Preukázanou funkciou HDL častíc je zabezpečovanie reverzného transportu cholesterolu, teda z periférnych tkanív späť do pečene. Tým sa vysvetľuje jeho potenciálne antiaterogénne pôsobenie. Cievný endotel – výstelka lúmenu ciev – má úlohu tak hemodynamickú, ako i imuno-endokrinnú. Dysfunkcia endotelu závažným spôsobom poškodzuje funkciu ciev a je markerom i akcelerátorom aterogenézy; je prítomná u mnohých predklinických stavov K-V chorôb ako sú inzulínová rezistencia, porucha glukózovej tolerancie, či prediabetes, prehypertenzia a dyslipidémia. Spoločný menovateľ funkčných i organických zmien vaskulárneho poškodenia v zmysle dysfunkcie neuro-endokrinného-imunitného homeostatického systému sa označuje ako angiometabolický syndróm X (G a v o r n í k et al., 2012). Významné je pozorovanie úzkeho prepojenia fajčenia s endotelovou dysfunkciou (C r i t c h l e y, C a p e w e l l, 2004). Poruchu endotelovej funkcie signalizujú zvýšené hladiny markerov v sére, akými sú cytokíny zápalu (IL-6 a CRP). Možno ju objektivizovať pomocou metódy FMD (flow mediated dilatation) – ide o vyšetrenie vazodilatácie navodenej prietokom. Artériová hypertenzia zohráva svoju úlohu jednak hemodynamickým pôsobením – biomechanickým stresom na endotelovú výstelku – jednak je asociovaná s aterogénnym fenotypom B, ktorý akceleruje aterosklerotické deje v stene ciev (O r a v e c et al., 2011c). Možno preto povedať, že ateroskleróza je svojím rozsahom postihnutia vaskulatúry naozaj systémovým ochorením.

Rizikové faktory aterosklerózy sú všeobecne spoločné pre všetky jej klinické koreláty. Patria medzi nich najmä fajčenie, dyslipidémia, artériová hypertenzia, obezita,

i *diabetes mellitus*. Klinické i subklinické prejavy aterosklerózy výrazne skracujú dĺžku života. Liečba aterosklerózy je preto nutná ešte pred vznikom orgánového poškodenia, už v procese počínajúcej aterogenézy – proaterogénnych/prozápalových stavov. Predovšetkým je to prevencia – eliminácia rizikových faktorov – ktorá prináša najvýznamnejší tak zdravotný, ako i ekonomický benefit pre pacienta i spoločnosť.

HDL– LIPOPROTEÍN VYSOKEJ HUSTOTY

Lipoproteíny plazmy predstavujú micelárne komplexy lipidov s proteínmi tvorené heterogénnou zmesou takýchto častíc o špecifickej veľkosti, hustote a flotačných charakteristik. Fyziologicky sprostredkovávajú transport tukov medzi orgánmi a tkanivami, avšak pri nerovnovážnom zastúpení jednotlivých subfrakcií, porušenom metabolizme lipidov, sa podieľajú na degeneratívnom procese v cievach – aterogenéze. HDL predstavuje v rámci lipoproteínového spektra ľudskej plazmy malé denzné na proteíny bohaté častice lipoproteínu (zložené z prevažne polárnych lipidov viazaných apolipoproteínmi) (K o s t n e r, L a g g e r, 1989).

HDL častice sú rôznorodého zloženia, štruktúry, chemických a tým i biologických vlastností. HDL častice varírujú od 7 do 25 nm podľa veľkosti a štádia vývoja, od diskoidného po sférický tvar podľa štruktúry. Vysoko heterogénnu triedu HDL môžeme rozdeliť do viacerých subpopulácií HDL, na základe ich rozdielnych fyzikálno-chemických charakteristík, akými sú hustota prostredia, pri ktorej flotujú, veľkosť, tvar a štruktúrne zloženie častíc. Prvou používanou metódou (z roku 1954) – ultracentrifugáciou, možno HDL deliť na menej denzné (1,063–1,125 g/ml), bohaté na lipidy (HDL2) a viac denzné HDL (1,125–1,21 g/ml), bohaté na proteíny (HDL3) (D e L a l l a, G o f m a n, 1954). Ďalšie delenie je možné použitím polyakrylamidovej gélovej elektroforézy (PAGE – polyacrylamide gradient gel electrophoresis), ktorá umožňuje identifikovať jednotlivé častice na základe ich veľkosti a elektrického náboja do troch podskupín:

1. **HDL1** – ktoré sú identické s HDL získanými ultracentrifugačným delením pri denzite prostredia 1,055–1,085 g/ml,
2. **HDL2** – ktoré sú identické s HDL získanými ultracentrifugačným delením pri denzite prostredia 1,063–1,125 g/ml a

3. HDL3 – ktoré sú identické s HDL získanými ultracentrifugačným delením pri denzite prostredia 1,125–1,21 g/ml.

HDL1 sú najväčšie (13–25 nm) a proteínová zložka tvorí 25 % HDL spektra; HDL2 sú menšie (8–12 nm) s 33–35 % proteínovej zložky; HDL3 majú ≤ 10 nm a tvorí ich 55–60 % proteínu (M a h l e y, 1978). HDL3 sú produkované pečeňou, čiastočne i črevom a do obehu sa dostávajú ako nascentné – nezrelé, respektíve de novo tvoriace sa diskoidné častice (nHDL). Dozrievajú ukladaním esterifikovaného voľného cholesterolu do jadra nHDL, čím získavajú sférický tvar.

HDL častice majú niekoľko úloh:

- reverzný transport cholesterolu – transportný systém CETP (cholesteryl ester transfer proteín) – z periférie do pečene,
- zdroj cholesterolu – ako stavebného prvku bioštruktúr organizmu,
- esterifikácia voľného cholesterolu – kedy ide o kooperáciu LCAT (lecitíncholesterol acyltransferáza) a HDL,
- inhibícia inkorporácie LDL cholesterolu do steny cievy.

Na HDL cholesterol je dobré sa pozerieť v kontexte metabolizmu lipidov, predovšetkým v podobe metabolizmu cholesterolu a triacylglycerolov, keďže tento sa bezprostredne podieľa na homeostáze obehovej sústavy. Pri poruche metabolizmu lipoproteínov – dyslipidémii – dochádza k rozvoju aterosklerózy. Tradične sa cholesterol (respektíve jeho forma transportu) delí na „zlý“ LDL cholesterol a „dobrý“ HDL cholesterol. Dyslipidémia je pojem prilihavejší než hypercholesterolémia vzhľadom ku komplexnej skladbe transportných foriem cholesterolu. V literatúre sa stretáme s delením porúch metabolizmu cholesterolu a lipidov na: izolovanú hypercholesterolémiu, izolovanú hypertriacylglycerolémiu a tzv. kombinovanú dyslipidémiu (zvýšený cholesterol a zároveň aj TAG) a dyslipidémiu pri nízkom HDL cholesterolu. Nízka hladina lipoproteínov o vysokej hustote (HDL) je závažným K-V rizikovým faktorom – známym tiež ako jedna z príčin reziduálneho rizika – a podieľa sa na aterogénnej dyslipidémii. Tá predstavuje poruchu optimálnej rovnováhy spektra lipidov v cirkulácii charakterizovanú nízkym HDL-cholesterolom, vysokými TAG a posunom zloženia LDL častíc k malým denzným časticiam. U zdravého jedinca obsah tukov predstavuje cca 15–30 % celkového energetic-

kého príjmu. Tuk obsiahnutý v lipoproteínoch sa delí na: triacylglyceroly (TAG), fosfolipidy (PL), cholesterol voľný (FCH), cholesterol esterifikovaný/cholesterylester (CHE) a voľné mastné kyseliny (FFA). Hoci sa zvýšený prívod nasýtených tukov a cholesterolu asocioval so zvýšeným rizikom K-V chorôb (S i r i - T a r i n o et al., 2010), nepreukázala sa korelácia medzi príjmom cholesterolu a jeho hladinami v krvi po adjustovaní na výskyt K-V príhod (G e r t l e r et al., 1950; S h i n et al., 2013; DGAC, 2015).

Dôležitejšie než celkové množstvo prijatého cholesterolu/tuku je jeho zloženie, kvalita (V i s h w a n a t h a n et al., 2010) (posun v zastúpení mastných kyselín od nasýtených k nenásýteným) a vyvážená energetická bilancia. Napokon, cholesterol nie je len esenciálnou stavebnou zložkou bunkových membrán a subcelulárnych štruktúr, ale aj zdrojom pre steroidogénu, tvorbu žlčových kyselín a vitamínu D v ľudskom organizme. Väčšina tukov v potrave človeka sa vyskytuje vo forme TAG, zložených z mastných kyselín a glycerolu. Podľa zastúpenia dvojitých väzieb rozlišujeme mononenasýtené mastné kyseliny – monounsaturated fatty acids – MUFA (ω -9 zastúpené najmä v olivovom a repkovom oleji), polynenasýtené – polyunsaturated fatty acids – PUFA (ω -3 zastúpené najmä v ľanovom oleji; ω -6 najmä v slnečnicovom, sójovom a kukuričnom oleji), a bez dvojitých väzieb – nasýtené mastné kyseliny – saturated fatty acids – SFA (najmä v kokosovom a palmovom oleji); kardioprotektívne ω -3 sú dostupné najmä v rybom tuku.

Systémový zápal (hladina CRP/hs-CRP a sieť prozápalových cytokínov) má vplyv aj na HDL pri priamej korelácii s K-V rizikom. Poukazujú na to práce, v ktorých možno pozorovať tzv. dysfunkčný HDL profil (R e n et al., 2010; K r y c h t i u k et al., 2014). To znamená, že napriek nezniženej hladine HDL cholesterolu u jedincov s manifestným K-V ochorením je skladba ich HDL odlišná od zdravých jedincov. HDL cholesterol sa ukázal byť na základe rozsiahlych populačných štúdií významným prediktorom chorôb K-V systému (predpokladala sa protektívita HDL v úlohe reverzného transportu cholesterolu z periférnych tkanív späť do pečene); a prejavili sa aj ďalšie antiaterogénne – antioxidantné a antitrombotické vlastnosti HDL. A hoci epidemiologické štúdie ukázali spojitosť medzi HDL a aterosklerotickou chorobou, štúdie s jedincami s vysokými hladinami HDL a defektným génom pre hlavný enzým metabolizmu HDL – CETP – nepreukázali kardioprotektivitu HDL. Dokonca v intervenčných štúdiách s inhibíciou CETP,

ktoré viedli k značnému nárastu HDL cholesterolu, bol pozorovaný zvýšený výskyt K-V príhod. To viedlo k ďalším pozorovaniam, že pri určitých patologických stavoch dochádza k zmene štruktúry HDL častíc, k zmene HDL spektra, pravdepodobne aj k dysfunkcii HDL a nárastu počtu HDL častíc bez kardioprotektívnych vlastností. Takýto predpoklad by mal priniesť nový prístup k interpretácii úlohy HDL a jeho subfrakcií; mohla by to byť nová éra klinického využitia HDL, kedy rozhodujúcou premisou terapie bude nie celková koncentrácia, ale zloženie/zastúpenie HDL častíc v triede HDL.

KONČATINOVOCIEVNA ARTÉRIOVÁ CHOROBA – KACH

Ateroskleróza nekardiálnych ciev sa v literatúre zvyčajne označuje ako periférne artériové ochorenie (PAO; v anglickej literatúre tiež označované ako PAD – peripheral artery disease). V prípade postihnutia dolných končatín, ide o končatinovocievnu artériovú chorobu (v anglickej literatúre tiež označovanú ako lower extremity artery disease – LEAD). Termín končatinovocievna artériová choroba zdôrazňuje primárny proces vzniku ochorenia – aterosklerózou podmienenú stenotizáciu tepny (G a v o r n í k, 2009). Ukladaním lipidového obsahu a väzivovalením v subintimálnom priestore dochádza k zužovaniu cievneho priesvitu, a tým k nerovnováhe medzi metabolickými požiadavkami končatiny a možnosťami cievneho zásobenia – ischemizácii končatiny. Závažnosť klinických prejavov KACH je daná lokalizáciou a rozsahom artériovej stenózy/obliterácie a rôzni sa od pobolievania končatiny pri fyzickej aktivite (*claudicatio intermittens*) až po nekrotizujúcu ischemiu s nutnosťou amputácie končatiny. KACH sa asocjuje s aterosklerotickým postihnutím ostatného – nekónčatinového artériového cievneho riečiska. Preto sú títo pacienti viac ohrození kardiovaskulárnou morbiditou i mortalitou. Značná časť pacientov, ktorí majú nediagnostikovanú KACH (asymptomatické a včasné štádium) ostáva nedetegovaná (M o u r a d et al., 2009). Preto je žiaduce vytvoriť priestor a podmienky pre lepší skrining KACH v rutinnej klinickej praxi. KACH je ochorenie, ktoré čím skôr je detegované, tým lepšie výsledky liečby sú dosiahnuteľné.

(DYS)FUNKCIA HDL

Lipoproteín vysokej hustoty – HDL sa dostal do centra záujmu, keďže sa preukázalo, že zohráva významnú úlohu v procese aterogenézy, resp. metabolizmu cholesterolu.

Na cholesterol bohaté lipoproteínové častice, najmä LDL, sa deponujú do cievnej steny, pričom sú vystavené oxidačným faktorom zo strany zložiek imunitného systému v cieve, predovšetkým radikálom produkovaným NADPH-oxidázou, NO-syntázou, myeloperoxidázou, lipooxygenázou (S t o c k e r, K e a n e y, 2004). HDL častice vstupujú do procesu oxidácie lipoproteínov svojou schopnosťou brzdiť proces lipoperoxidácie (LPO) LDL a tým chrániť intimu cievnej steny; HDL sú tiež schopné odstraňovať už vzniknuté produkty lipoperoxidácie z LDL (Z e r r a d - S a a d i et al., 2009). Toto sa deje jednak pasívne (priamo prechodom medzi fosfolipidovými membránami lipoproteínov), jednak aktívne za účasti CETP a jednak je prenos lipoperoxidátov facilitovaný apo A-I. Takto vychytené produkty LPO sú inaktivované v red-ox procese, kde kľúčovú úlohu zohráva apo A-I (G a r n e r et al., 1998). Takto sa HDL stávajú mechanizmom spätného transportu vychyteného cholesterolu, resp. molekúl poškodených lipoperoxidáciou; „cieľovou stanicou“ pre takto získaný „nebezpečný“ obsah je pečeň, kde sa selektívne vychytáva cez transportér SR-B1 (scavenger receptor B1).

Na antioxidačnej schopnosti HDL sa podieľa inaktívacia reaktívnych molekúl enzymatickou cestou, a to najmä prostredníctvom (K o n t u s h, C h a p m a n, 2006):

- paraoxonázy 1
- acetylhydroláza-faktoru aktivujúceho trombocyty
- lecitíncholesterol acyltransferázy.

(Apo)lipoproteíny, enzýmy a lipidová zložka, ktoré sú určujúcim faktorom antioxidačných schopností HDL, sú zastúpené naprieč HDL spektrom v rôznom pomere. Preto aj schopnosť chrániť pred oxidačným poškodením (predovšetkým LDL) je pri jednotlivých subpopuláciách rôzna. Je známe, že tieto vlastnosti sú sústredené do malých denzných HDL častíc, ktoré sú schopné dobre odstraňovať oxidované lipidy z povrchu iných lipoproteínových častíc. Ak sa však presiahne schopnosť vychytávania, respektíve inaktívácie produktov oxidačného pôsobenia radikálov, dochádza v HDL časticiach k ich akumulácii. To môže byť jednou z príčin tzv. dysfunkčného HDL profilu, so všetkými konzekvenciami v procese aterogenézy, kedy pozorujeme posun v zložení HDL spektra smerom k subpopuláciám s malými HDL časticami (O r a v e c et al., 2011b; K r y c h t i u k et al., 2014; K a s k o et al., 2014). S ohľadom na najrannejšie štádiá aterosklerózy tento trend badať dokonca už aj u detí (H u b k o v á et al., 2018). Problematika funkčnosti, resp. dysfunkcie lipoproteínových

tried zvlášť zarezonovala poukázaním na fenomén aterogénnej normolipémie a neaterogénnej hyperlipidémie (O r a v e c et al., 2011a; O r a v e c et al., 2014).

MERANIE HDL SUBPOPULÁCIÍ

Stáva sa novým trendom merať subfrakcie jednotlivých lipoproteínových tried. Analýza jednotlivých subpopulácií našla svoje miesto okrem výskumu už aj v rutinnej klinickej praxi – LDL cholesterol. Malé denzné LDL častice – subfrakcie LDL3-7 – sú aterogénne. Meranie HDL subpopulácií poskytuje lepší obraz o funkčnom stave komplexnej HDL triedy. Takéto metódy by mohli lepšie odhadovať riziko aterosklerotickej choroby, než len samotné stanovenie celkového HDL cholesterolu. Klasické stanovenie HDL pomocou inkorporovaného cholesterolu v jeho časticiach využitím precipitácie apo B-lipoproteínov sa stáva prekonané novšími metódami stanovujúcimi HDL cholesterol v sére. Ultracentrifugácia, elektroforéza, chromatografia, špeciálna precipitácia, metóda priameho merania a nukleárna magnetická rezonancia (NMR) medzi sebou súťažia o miesto novej vyšetrovacej metódy nielen v lipidológii, ale aj vo všeobecnej klinickej praxi. Práve taká metóda bude mať najlepšie predpoklady rozšíriť sa do rutinnej klinickej praxe, ktorej jednoduchosť a dobrá aplikovateľnosť bude vyvážená dostatočne validnými meraniami oproti ostatným metódam.

Nedenaturujúca polyakrylamidová gélová elektroforéza – ND-PAGE (Non-denaturing polyacrylamide gradient gel electrophoresis) – bola prvá metóda separácie jednotlivých subfrakcií lipoproteínov na základe ich veľkosti, a použila sa ako štandardná laboratórna metóda. Metóda je považovaná za dostatočne senzitívnu a reprodukovateľnú na kvantifikáciu distribúcie jednotlivých subpopulácií.

Štandardizácia metódy naprieč jednotlivými laboratórnymi diagnostickými pracoviskami sa postupne zlepšuje, náročnosť vykonávania merania je relatívna v porovnaní s ostatnými metódami. Do tejto skupiny analytických metód sa radí aj metóda Lipoprint, ktorej analýza lipoproteínových subfrakcií dobre koreluje s ostatnými metódami (NMR, iné ND-PAGE metódy) (H o e f n e r et al., 2001).

ZÁVER

Výsledky z pozorovaní u jedincov s manifestným aterosklerotickým ochorením (KACH) poukázali na posun smerom k malým vysokodenzným lipoproteínovým časticiam v zastúpení jednotlivých lipoproteínových subfrakcií v HDL spektre. Toto pozorovanie je konzistentné s podobným úkazom v LDL triede, kde aterogenicita sprevádza subpopulácie malých denzných LDL častíc.

Vyššie zastúpenie malých HDL častíc nasvedčuje patologickej konštelácii HDL subpopulácií u jedincov s chorobami K-V systému. Príčinou zvýšeného zastúpenia malých HDL častíc u jedincov s K-V chorobami by mohla byť porušená schopnosť týchto častíc vychytávať a inaktivovať neustále vznikajúce radikály. Nadmernou akumuláciou týchto produktov oxidačného stresu zrejme dochádza k dysfunkcii HDL populácie a k oslabeniu efluxnej kapacity HDL. Veľkosť HDL častíc by tak mohla predstavovať korelát aterogénnej dyslipidémie.

Možno teda predpokladať porušené správanie sa HDL populácie v rámci patologického – v zmysle proaterogénneho a prozápalového – stavu, kedy dochádza k zmene zastúpenia HDL častíc v rámci HDL spektra posunom smerom k malým formám lipoproteínových častíc – dysfunkčný HDL profil.

Pri voľbe a hodnotení účinku liečby sa v budúcnosti zrejme nezaobídeme bez stanovovania jednotlivých subfrakcií lipoproteínov alebo iných markerov, ktoré budú lepšie odzrkadľovať stav lipidového spektra než len celková hodnota LDL, či HDL cholesterolu.

LITERATÚRA

1. **Arsenault, B. J., Lemieux, I., Després, J. P. (2007):** Cholesterol levels in small LDL particles predict the risk of coronary heart disease in the EPIC-Norfolk prospective population study. *Eur Heart J*, 28(22): 2770–7.
2. **Critchley, J., Capewell, S. (2004):** Smoking cessation for the secondary prevention of coronary heart disease. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 1: CD003041.
3. **De Lalla, O. F., Gofman, J. W. (1954):** Ultracentrifugal analysis of serum lipoproteins. In **Glick, D., ed.: Methods of biochemical analysis.** Vol. 1, New York: Wiley.
4. **Filipová, S. et al. (2006):** Aktualizácia Lipidového konsenzu-2. *Cardiol.*, 15(6): 313–6.

5. **Garner, B. et al. (1998):** Oxidation of high density lipoproteins. I. Formation of methionine sulfoxide in apolipoproteins AI and AII is an early event that accompanies lipid peroxidation and can be enhanced by alpha-tocopherol. *J. Biol. Chem.*, 273(11): 6080–7.
6. **Gavorník, P. (2009):** Cílené vysvetľovanie cievnych chorôb. *Vnitř Lék.*, 55(10): 996–7.
7. **Gavorník, P. et al. (2012):** Angiogénna koncepcia metabolického syndrómu. Viacnásobný cievny bludný kruh angio-metabolického syndrómu. *Ateroskleróza*, 16(1–2): 230–7.
8. **GBD (2017):** Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*, 392(10159): 1789–858.
9. **Gertler, M. M., Garn, S. M., White, P. D. (1950):** Diet, serum cholesterol and coronary artery disease. *Circulation*, 2(5): 696–704.
10. **Hoefner, D. M. et al. (2001):** Development of a rapid, quantitative method for LDL subfractionation with use of the Quantimetrix Lipoprint LDL System. *Clin. Chem.*, 47(2): 266–74.
11. **Hubková, B. et al. (2018):** Vplyv nadváhy a obezity na distribúciu cholesterolu v lipoproteínoch u detí. *Laboratórna diagnostika*, 23(1): 88–9.
12. **Kasko, M. et al. (2014):** High-density lipoprotein profile in newly-diagnosed lower extremity artery disease in Slovak population without *diabetes mellitus*. *Neuro Endocrinol. Lett.*, 35(6): 531–5.
13. **Keene, D. et al. (2014):** Effect on cardiovascular risk of high density lipoprotein targeted drug treatments niacin, fibrates, and CETP inhibitors: meta-analysis of randomised controlled trials including 117,411 patients. *BMJ*, 349: g4.
14. **Kontush, A., Chapman, M. J. (2006):** Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis. *Pharmacol. Rev.*, 58(3): 342–74.
15. **Kostner, G. M., Laggner, P. (1989):** Chemical and physical properties of lipoproteins. In **Fruchart, J. C., Shepherd, J., ed.:** *Clinical Biochemistry—Human Plasma Lipoprotein*, Berlin, New York: Walter de Gruyter.
16. **Krychtiuk, K. A. et al. (2014):** Small high-density lipoprotein is associated with monocyte subsets in stable coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 237(2): 589–96.
17. **Mahley, R. W. (1978):** Alterations in plasma lipoproteins induced by cholesterol feeding in animals including man. In **Dietschy, J. M., Gotto, A. M., Jr., Ontko, J. A., ed.:** *Disturbances in Lipid and Lipoprotein Metabolism*, Bethesda: American Physiological Society.
18. **Mourad, J. J. et al. (2009):** Screening of unrecognized peripheral arterial disease (PAD) using ankle-brachial index in high cardiovascular risk patients free from symptomatic PAD. *J. Vasc. Surg.*, 50(3): 572–80.
19. **Nicholls, S. J. et al. (2006):** Effects of obesity on lipid-lowering, anti-inflammatory, and antiatherosclerotic benefits of atorvastatin or pravastatin in patients with coronary artery disease (from the REVERSAL Study). *Am. J. Cardiol.*, 97(11): 1553–7.
20. **Nyyssönen, K. et al. (2012):** LDL oxidative modification and carotid atherosclerosis: results of a multicenter study. *Atherosclerosis*, 225(1): 231–6.
21. **Oravec, S. et al. (2011a):** Hyper-betalipoproteinemia LDL 1,2: a newly identified nonatherogenic hypercholesterolemia in a group of hypercholesterolemic subjects. *Neuroendocrinol. Lett.*, 32(3): 322–7.
22. **Oravec, S. et al. (2011b):** HDL subfractions analysis: A new laboratory diagnostic assay for patients with cardiovascular diseases and dyslipoproteinemia. *Neuroendocrinol. Lett.*, 32(4): 502–9.
23. **Oravec, S. et al. (2011c):** Contribution of the atherogenic lipoprotein profile to the development of arterial hypertension. *Bratisl. Lek. Listy*, 112(1): 4–7.
24. **Oravec, S. et al. (2014):** Atherogenic versus non-atherogenic lipoprotein profiles in healthy individuals. Is there a need to change our approach to diagnosing dyslipidemia? *Curr. Med. Chem.*, 21(25): 2892–901.
25. **Oravec, S. et al. (2015):** The Assessment of the Atherogenic Lipoprotein Profile in Cardiovascular Diseases by Lipoprint System Analysis. In **Chennamesetty, I., ed.:** *The Lipoproteins—From Bench to Bedside*, Rijeka: InTech.
26. **Ren, J., Jin, W., Chen, H. (2010):** oxHDL decreases the expression of CD36 on human macrophages through PPARgamma and p38 MAP kinase dependent mechanisms. *Mol. Cell. Biochem.*, 342(1–2): 171–81.
27. **Scientific Report of the 2015 Dietary Guidelines Advisory Committee (DGAC) (2015):** Washington DC: *Dietary Guidelines Advisory Committee*.
28. **Shin, J. Y. et al. (2013):** Egg consumption in relation to risk of cardiovascular disease and diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.*, 98(1): 146–59.
29. **Siri-Tarino, P. W. et al. (2010):** Saturated Fatty Acids and Risk of Coronary Heart Disease: Modulation by Replacement Nutrients. *Curr. Atheroscler. Rep.*, 12(6): 384–90.

30. **Stocker, R., Keaney, J. F. Jr. (2004):** Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol. Rev.*, 84(4): 1381–478.
31. **Vishwanathan, R., et al. (2010):** Increased consumption of dietary cholesterol, lutein, and zeaxanthin as egg yolks does not decrease serum concentrations and lipoprotein distribution of other carotenoids, retinol, and tocopherols. *Nutr. Res.*, 30(11): 747–55.
32. **Voight, B. F. et al. (2012):** Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: a mendelian randomisation study. *Lancet*, 380(9841): 572–80.
33. **Weiner, S. D. et al. (2014):** Systemic inflammation and brachial artery endothelial function in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Heart*, 100(11): 862–6.
34. **WHO (2019):** *Noncommunicable diseases country profiles 2018*. Switzerland: World Health Organization.
35. **Zerrad-Saadi, A. et al (2009):** HDL3-mediated inactivation of LDL-associated phospholipid hydroperoxides is determined by the redox status of apolipoprotein A-I and HDL particle surface lipid rigidity: relevance to inflammation and atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 29(12): 2169–75.



MALÉ DENZNÉ LDL U OSÔB S PORUCHOU METABOLIZMU LIPOPROTEÍNOV

Oravec, S.¹, Jediná, V.², Žitňanová, I.³, Gruber, K.⁴, Dostal, E.⁵

¹I. Interná klinika LFUK-UNB Staré Mesto, Bratislava

²Medirex a. s., Bratislava

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

⁴TCM Ordination Dr. Gruber, Baden

⁵Krankenanstalten Labor Dr. Dostal, Viedeň

e-mail: stanislavoravec1@yahoo.com

SÚHRN

Malé denzné lipoproteíny nízkej hustoty (mdLDL) tvoria aterogénnu časť lipoproteínového spektra plazmy a sú pravidelnou súčasťou lipoproteínového spektra u osôb s hyperlipoproteinémiou. Potvrdila sa tiež ich vysoká prediktívna hodnota v diagnostike ochorení kardio-vaskulárneho systému ako indexu možnej náhlej kardio-vaskulárnej a cerebro-vaskulárnej udalosti.

V súbore 104 pacientov s hyperlipoproteinémiou sa určovali LDL subfrakcie elektroforetickou metódou delenia lipoproteínov plazmy na polyakrylamidovom géli (PAGE) (Lipoprint LDL, Quantimatrix, USA) a identifikovali sa malé denzné LDL. Koncentrácia mdLDL sa súčasne stanovovala enzymatickou metódou LDL-EX „SEIKEN“ (Randox, GB). Porovnali sme zastúpenie mdLDL v lipoproteínovom spektre plazmy, získané dvomi odlišnými laboratórnymi postupmi. Zistili sme 70%-nú zhodu.

Kľúčové slová: Malé denzné LDL, Lipoprint LDL, enzymatická metóda LDL-EX Seiken

ABSTRACT

Small dense low density lipoproteins (sdLDL) represent an atherogenic part of plasma lipoprotein spectrum and are a regular part of the lipoprotein spectrum in individuals with hyperlipoproteinemia. Their high predictive value was confirmed in diagnosing of cardio-vascular diseases as an emerging risk factor for sudden cerebro-vascular and cardio-vascular events. In the group of 104 hyperlipidemic individuals the sdLDL lipoproteins by an electrophoretic method on polyacrylamide gel (Lipoprint LDL, Quantimatrix, USA) were identified. In the same time a concentration of sdLDL by an enzymatic method LDL-EX „SEIKEN“ (Randox, GB) was analyzed. The results of both different analytical methods were compared and a 70 % agreement between both analytical methods was confirmed.

Key words: small dense LDL, Lipoprint LDL, enzymatic method LDL-EX Seiken

ÚVOD

Malé denzné lipoproteíny nízkej hustoty (mdLDL) reprezentujú aterogénnu časť lipoproteínového spektra a sú u osôb s hyperlipoproteinémiou jeho pravidelnou súčasťou (K o b a a kol., 2002; K r a u s s, 2010). Potvrdila sa tiež ich vysoká prediktívna hodnota v diagnostike aterosklerózou podmienených ochorení kardiovaskulárneho systému (A i a kol., 2010; O r a v e c a kol., 2011; O r a v e c a kol., 2014; V a k k i l a i n e n a kol., 2003). Početné klinické štúdie poukazujú na mdLDL ako na silného prediktora vzniku stenózy koronárnych artérií, vzniku ischemickej choroby srdca, prejavujúcou sa anginóznymi prekordiálnymi bolesťami (*angina pectoris*) (A i a kol., 2010; H i r a y a m a, M i i d a, 2012; H o o g e v e e n a kol., 2014; K o b a a kol., 2002; V a k k i l a i n e n a kol., 2003), ale tiež ako prediktora vzniku novej náhle cerebro-vasculárnej udalosti (Z h a o a kol., 2009). Predpokladá sa tiež kauzálny vzťah medzi zvýšenou koncentráciou triacylglycerolov v krvi a tiež lipoproteínov bohatých na triacylglyceroly na jednej strane, a zvýšenou tvorbou mdLDL na strane druhej (B e r n e i s, K r a u s s, 2002; P a c k a r d 2003; W u, P a r h o f e r, 2014).

Pacienti

Súbor tvorilo 104 osôb s poruchou metabolizmu lipoproteínov; 64 žien s priemerným vekom 55 rokov \pm 20 a 40 mužov s priemerným vekom 50 rokov \pm 20. Pacienti boli nastavení v hypolipemickom režime:

- 1) na hypolipemickej liečbe statínmi – atorvastatin 20 mg, fluvastatin 80 mg s predĺženým uvoľňovaním, alebo
- 2) užívali fibráty: fenofibrát 215 mg s predĺženým uvoľňovaním. Časť pacientov (14 osôb) po cca 6 mesiacoch farmakologickú liečbu pre jej intoleranciu (myalgie, predovšetkým pri liečbe statínmi) odmietlo a riadili sa len dietetickými odporúčaniami. Ostatné testované osoby liečbu dobre tolerovali.

Kontrolnú skupinu tvorilo 20 normolipemických zdravých probandov, 14 žien a 6 mužov s priemerným vekom 42 rokov \pm 20, bez klinických a laboratórnych známkoch ochorenia kardiovaskulárneho systému. Všetky testované osoby boli normotonici, nefajčiari.

Krv sa odobrala súborovým pacientom aj kontrolným vyšetrovaným osobám po 12 hod. lačnení z v. *cubiti* do EDTA-K2 skúmaviek, scentrifugovala pri 2000 \times g po dobu

15 min. v chladenej centrifúge pri 4 °C a získaná plazma sa uskladnila do dňa analýzy pri –20 °C.

METÓDY

V súbore 104 hyperlipoproteinemických pacientov sa analyzoval celkový cholesterol a triacylglyceroly enzymatickou CHOD PAP metódou (Roche Diagnostics, SRN) v EDTA-K2 plazme. Malé denzné lipoproteíny nízkej hustoty (mdLDL) sa analyzovali elfo-metódou delenia lipoproteínov plazmy na polyakrylamidovom géli (Lipoprint LDL, Quantimetrix, CA, USA) (H o e f n e r a kol., 2001), a koncentrácia mdLDL sa súčasne stanovovala enzymatickou metódou LDL-EX „SEIKEN“ (Randox, GB) (H i r a n o a kol., 2005).

Lipoprint LDL metóda deklaruje normálnu hodnotu mdLDL do 6 mg LDL cholesterolu/dl, t. j. 0,155 mmol cholesterolu/l.

Enzymatická metóda LDL-EX, SEIKEN odporúča „cut off“ hranicu pre mdLDL 0,9 mmol/l, t. j. 34,8 mg/dl.

Normálna koncentrácia mdLDL v plazme, meraná metódou LDL-EX Seiken je cca 6-krát (5,8-krát) vyššia než normálna koncentrácia mdLDL, ktorú odporúča metóda Lipoprint LDL.

CIEĽ ŠTÚDIE

Určiť podiel súhlasných a protirečivých výsledkov stanovenia malých denzných LDL pri oboch porovnávaných metódach v súbore liečených pacientov s dyslipoproteinémiou.

VÝSLEDKY

V súbore 104 vyšetrených pacientov sa pri určovaní normálnych a zvýšených hodnôt mdLDL u 31 pacientov zistil diskrepantný výsledok nameraných hodnôt koncentrácie mdLDL v plazme. Tie sa analyzovali dvomi rozdielnymi analytickými metódami. Namerané výsledky boli v 70 % zhodné.

Z počtu 31 pacientov s diskrepantnými výsledkami, sa u 24 vyšetrených pacientov enzymatickou metódou „SEIKEN“ zistili zvýšené hodnoty mdLDL, t. j. nad „cut off“

Tab. 1. Hodnoty lipidov a koncentrácia mdLDL oboch metód v súbore pacientov vs. kontrola

	Celkový cholesterol [mmol.l ⁻¹]	TAG [mmol.l ⁻¹]	mdLDL-Seiken		mdLDL-LipoprintLDL	
			[mmol.l ⁻¹]	[mg.dl ⁻¹]	[mg.dl ⁻¹]	[mmol.l ⁻¹]
norma	do 5.2	do 1.7	do 0.90	34.8	do 6.0	0.155
kontrola n = 20	4.51± 0.1	0.73± 0.06	0.525± 0.06	20.3	2.05± 0.16	0.053
súbor n= 104	6.03±0.15	1.38± 0,12	0.943±0.08	36.5	6.41± 0.15	0.166

Tab. 2. Hodnoty lipidov a koncentrácia mdLDL, kde za zistila dikrepancia výsledkov pri jednotlivých metódach

	mdLDL-Seiken		mdLDL-LipoprintLDL	
	[mmol.l ⁻¹]	[mg.dl ⁻¹]	[mg.dl ⁻¹]	[mmol.l ⁻¹]
norma	do 0.90	34.8	do 6.0	0.155
Hodnoty Seiken v norme, hodnoty Lipoprint zvýšené				
n= 7	0.63±0.12	24.4± 1.3	8.9± 1.24	0.23± 0.06
Hodnoty Seiken zvýšené, hodnoty Lipoprint v norme				
n=24	1.28± 0.14	49.6± 1.4	2.54± 0.16	0.066± 0.006

koncentráciu 0,9 mmol/l. Lipoprint LDL u týchto pacientov stanovil koncentráciu mdLDL do 6 mg/dl = 0,155 mmol/l, teda nezvýšenú hodnotu mdLDL (23 % z celkového súboru testovaných pacientov, Tab. 1, Tab. 2).

U 7 pacientov nameral Lipoprint LDL hodnoty mdLDL v plazme zvýšené, (nad 6 mg/dl), u ktorých enzymatická metóda LDL-EX Seiken nepotvrdila zvýšenú koncentráciu mdLDL (7 % z celkového súboru testovaných pacientov, Tab. 1, Tab. 2).

DISKUSIA

Malé denzné lipoproteíny nízkej hustoty (mdLDL) reprezentujú aterogénnu časť lipoproteínového spektra a sú u osôb s hyperlipoproteinémiou jeho pravidelnou súčasťou [6, 7]. Majú vysokú prediktívnu hodnotu v diagnostike aterosklerózu podmienených ochorení kardiovaskulárneho systému (A i a kol., 2010; K o b a a kol., 2002; O r a v e c a kol., 2011; O r a v e c a kol., 2014; V a k k i l a i n e n a kol., 2003; W u, P a r h o f e r, 2014; Z h a o a kol.,2009). Hľadajú sa preto vhodné klinicko-laboratórne postupy, ktoré by uľahčili identifikáciu a analýzu

mdLDL pre rutinnú klinickú prax (H i r a n o a kol., 2005). Dve dostupné metódy používané dnes v laboratórnej diagnostike predstavuje elektroforetická metóda delenia lipoproteínov plazmy na polyakrylamidovom géli (PAG), systém Lipoprint LDL (fa Quaqntimetrix, USA; H o e f n e r a kol., 2001) a druhá metóda je enzymatická metóda LDL-EX (fa Seiken Randox GB; H i r a n o a kol.,2005). Prekvapivo, tieto dve uvedené laboratórne analytické postupy deklarujú rozdielne „normálne hodnoty“ pre koncentráciu mdLDL v krvi, pričom pri enzýmovej metóde LDL-EX SEIKEN sú povolené koncentrácie pre mdLDL 5,8-krát vyššie, než pri elektroforetickej metóde delenia lipoproteínov a ich subpopulácií na PAG. Ide pritom o určenie koncentrácie rizikového faktora vzniku predčasného ochorenia kardiovaskulárneho systému a nezávislého prediktora možnej náhlej kardiovaskulárnej udalosti s vysokou prediktívnu hodnotou. Prečo je tomu tak - táto otázka zostáva zatiaľ nezodpovedanou.

V našej štúdií sme potvrdili 70 % zhodu v analýze koncentrácie mdLDL dvomi rozdielnymi metódami. V 30 % sa zistila diskrepancia vo vyšetrovaniach (Tab. 1, Tab 2) :

- 1) Keď Lipoprint LDL metóda zisťuje ešte zvýšenú koncentráciu mdLDL (u 7 pacientov, 7 % celkové-

ho počtu vyšetrených pacientov), ale enzymatická metóda SEIKEN už signalizuje normálne hodnoty. Možno sa pokúsiť vysvetliť túto skutočnosť útočnou hypolipemickou resp. aj hormonálnou liečbou (T4-substitúcia) s úpravou metabolických aj lipidových parametrov, pričom približne šesťkrát citlivejšia Lipoprint-LDL metóda registruje naďalej zvýšenú koncentráciu mdLDL.

- 2) U 24 pacientov (23 % celkového počtu vyšetrených pacientov), SEIKEN metóda meria zvýšenú koncentráciu mdLDL, ale Lipoprint-LDL analýzou sa zvýšená koncentrácia mdLDL nepotvrdzuje. Ide o značný počet pacientov a túto diskrepantnosť v analýze medzi oboma metódami, zatiaľ nevieme jednoznačne vysvetliť. Zmena fyzikálno-chemických vlastností mdLDL a tiež elektro-migračných vlastností lipoproteínových častíc pod vplyvom určitého typu liečby (Packard, 2003; Diffenderfer, Schaefer, 2014), by mohlo objasniť nesúlad vo vyšetrení malých denzných LDL rozdielnymi analytickými postupmi. Väčšie počty testovaných pacientov, aj testovaných osôb bez poruchy metabolizmu lipoproteínov, by mohli objasniť nezrovnalosti pri používaní dvoch odlišných analytických metód stanovenia mdLDL.

V kontrolnej skupine 20 normolipemických probandov sa nesúlad vo výsledkoch medzi testovanými metódami nezistil.

Podakovanie: Výskumná práca s publikačným výstupom sa realizovala za finančnej podpory VEGA č. 1/0109/16

LITERATÚRA

1. **Ai, M. et al. (2010):** Small dense LDL-cholesterol and coronary heart disease, results from the Framingham Offspring Study. *Clin. Chem.*, 56, pp. 967–76.
2. **Berneis, K. K., Krauss, R. M. (2002):** Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *J. Lipid. Res.*, 43, pp. 1363–1379.
3. **Diffenderfer, M. R., Schaefer, E. J. (2014):** The composition and metabolism of large and small LDL. *Curr. Opin. Lipidol.*, 25, pp. 221–226.
4. **Hirano, T., Ito, Y., Yoshino, G. (2005):** Measurement of small dense low-density lipoprotein particles. *J. Atheroscler. Thromb.*, 12, pp. 67–72.
5. **Hirayama, S., Miida, T. (2012):** Small dense LDL: An emerging risk factor for cardiovascular disease. *Clin. Chim. Acta*, 414, pp. 215–224.
6. **Hoefner, D. M. et al. (2001):** Development of a rapid quantitative method for LDL subfraction with use of the Quantimetrix Lipoprotein LDL system. *Clin. Chem.*, 472, pp. 266–274.
7. **Hoogeveen, R. C. et al. (2014):** Small dense low-density lipoprotein- cholesterol concentrations predict risk for coronary heart disease: the Atherosclerosis risk in Communities (ARIC) Study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 34, pp. 1069–1077.
8. **Koba, S. et al. (2002):** Significance of small dense low-density lipoproteins and other risk factors in patients with various types of coronary heart disease. *Am. Heart J.*, 144, pp. 1026–1035.
9. **Krauss, R. M. (2010):** Lipoprotein subfractions and cardiovascular disease risk. *Curr. Opin. Lipidol.*, 21, pp. 305–11.
10. **Oravec, S. et al. (2011):** Contribution of the atherogenic lipoprotein profile to the development of arterial hypertension. *Brat. Lek. Listy*, 112, pp. 4–7.
11. **Oravec, S. et al. (2014):** Atherogenic versus nonatherogenic lipoprotein profiles in healthy individuals. Is there a need to change an approach to diagnosing dyslipidemia? *Curr. Med. Chem.*, 21, pp. 2892–2901.
12. **Packard, C. J. (2003):** Triacylglycerol-rich lipoproteins and the generation of small dense low-density lipoproteins. *Biochem. Soc. Trans.*, 31, pp. 1066–1069.
13. **Vakkilainen, J. et al. (2003):** Relationship between LDL lipoprotein particle size, plasma lipoproteins, and progression of coronary artery disease. *Circulation*, 107, pp. 1733–37.
14. **Wu, L., Parhofer, K. G. (2014):** Diabetic dyslipidemia. *Metabolism*, 63, pp. 1469–1479.
15. **Zhao, Ch. X. et al. (2009):** Small dense Low-Density lipoproteins and Associated Risk Factors in Patients with Stroke. *Cerebrovascular Dis.*, 27, pp. 99–104.



VÝVOJ BIOCHEMIZÁCIE EPIDEMIOLOGICKÝCH VÝSKUMOV STAVU VÝŽIVY A PREVALENCIE NEINFEKČNÝCH CHORÔB V OBYVATEĽSTVE SLOVENSKA

Kajaba, Igo

CarnoMed, medicínske centrum, Bratislava

e-mail: igo.kajaba@gmail.com

SÚHRN

V prehľadnej práci je prezentovaný vývoj epidemiologických výskumov výživy a laboratórnych ukazovateľov, ako aj nekontagióznych chorôb na Slovensku.

Epidemiologické výskumy sú cenným zdrojom nových informácií o potvrdených koreláciách medzi sledovanými javmi, avšak potvrdenie ich kauzality a mechanizmus vzniku nie sú schopné objasniť. Prislúcha to až následným experimentálnym a klinickým štúdiám, ako je na to upozornené v súčasnej práci. Integrovanou zložkou epidemiologických výskumov sú biochemické stanovenia. Poukázané je na ich vývoj a rozširovanie podľa tematického zamerania štúdií a pre objektivizáciu nálezov možno očakávať ďalší nárast ich počtu v rámci epidemiologických výskumov klinických a stavu výživy obyvateľstva.

Kľúčové slová: epidemiologický výskum, vývoj, biochemické parametre

ABSTRACT

The review presents the development of epidemiological research on nutrition and laboratory indicators, as well as non-conagenous diseases in Slovakia. Epide-

miological research is a valuable source of new information on confirmed correlations among the observed phenomena, but the confirmation of their causality and the mechanism of origin are no table to explain. This is due to subsequent experimental and clinical studies, as pointed out in the work. Biochemical determinations are an integral part of epidemiological research. Their development and dissemination according to the thematic focus of the studies is pointed, and for the objectification on the findings a further increase in their number can be expected within the epidemiological research of clinical trials, and the nutritional status of the population.

Keywords: epidemiological research, development, biochemical parameters

ÚVOD

História epidemiologických populačných výskumov siaha do rokov po druhej svetovej vojne, ako reakcia na zvyšujúcu sa chorobnosť a úmrtnosť na kardiovaskulárne choroby u obyvateľstva, najmä v USA ale aj v ďalších prosperujúcich štátoch. Prvá dnes už klasická štúdia sa začala v roku 1947 s názvom: „Framingham Heart Study“ [1] a mala trvať 20 rokov. Pre cenné nové poznatky

o rizikových faktoroch kardiovaskulárnych chorôb a zásluhou jej úspešného vedenia riaditeľom Thomas Royle Dawberom bola štúdia predĺžená a rozdelená do rôznych segmentov alebo kohort a trvá do súčasnosti, ako jej už štvrtá generácia účastníkov. Stala sa tak vzorom pre ďalšie epidemiologické výskumy hlavne prof. Ancel Keysa a spol., ktoré sa popri USA uskutočnili začiatkom 50-tych rokov vo viacerých európskych krajinách a výsledky publikoval pod známym názvom diela: „Seven Countries Heart Study“ [2]. Ako prvý upozornil na benefitnú úlohu olivového oleja v mediterránejskej diéte, kde v kohortách bol jediným zdrojom tuku, zistil nízku úmrtnosť na kardiovaskulárne komplikácie.

Opodstatnene možno tým predpokladať, že framinghamská štúdia slúžila za vzor aj autorom slovenských epidemiologických výskumov, ktoré sú prezentované v ďalšom.

Prehľad epidemiologických výskumov stavu výživy a prevalencie nekontagióznych chorôb v populácii Slovenska

Prvou a hneď grandióznou je štúdia uskutočnená vtedajším riaditeľom Endokrinologického ústavu SAV v Bratislave prof. Juliánom P o d o b o m a kolektívu spolupracovníkov v rokoch 1949–1953 s názvom: „Výskyt endemickej strumy a endemických neuropsychických degenerácií (oligofrénie a kreténizmu) s určením ich výskytu a rizikových oblastí na Slovensku v súvislosti s nedostatkom jódu v strave“ [3]. Vykonaný bol reprezentatívny celoslovenský výskum, pri ktorom sa vyšetrilo 3,2 % obyvateľstva a týkal sa 602 obcí a vyšetrených bolo 157 865 osôb, detí, mládeže a dospelých oboch pohlaví, čo v súčasnosti predstavuje rozsah štúdie priam nepredstaviteľný. Metodicky bola štúdia riešená sledovaním výživy so zameraním na príjem jódu v strave, odborným fyzikálnym vyšetrením štítnej žľazy – strumy a stanovením antropometrických údajov. U klinických prípadov laboratórnym stanovením tyreotropného hormónu adenohipofýzy – TSH a základných hormónov štítnej žľazy T3 (trijódtyronínu) a T4 (tetrajódtyroxínu) v krvi [4]. Venovaná bola pozornosť aj geografickým podmienkam (obsah jódu v pôvode, vo vodných zdrojoch, miestnych potravinách), ako aj socio-ekonomickej situácii obyvateľov. Zistilo sa, že napríklad v oblasti Slovenského rudohoria bol výskyt strumy až u 70 % dievčat vo veku do 10 rokov a u 80 % dospelých žien. Výskyt kreténizmu na Slovensku dosahoval až 3 %, pričom ľahších

poškodení mozgu bolo oveľa viac. Exaktne sa potvrdilo, že hlavnou príčinou tohto stavu bol nedostatok jódu v strave. Splnenie riešenia úlohy prinieslo európske prioritné poznatky a návrh prevencie strumy zavedením jodidácie kuchynskej soli. Táto začala na základe štúdie v roku 1951, najskôr pridaním 7 mg KI (jodidu draselného) na kg kuchynskej soli a od roku 1965 jeho zvýšením na 25 mg KI/kg. V roku 1966 bola uzákonená povinná jódová profylaxia. Docielilo sa tým vymiznutie endemickej strumy a kreténizmu na Slovensku. Tieto výsledky rezonovali nielen v európskom meradle, ale možno uviesť, že dodnes sú celosvetového významu! V súčasnosti je odporúčaná denná dávka jódu na Slovensku takmer u všetkých obyvateľov presne plnená, okrem gravidných žien [5], u ktorých sa zistil v priemere hranične nízky príjem jódu (za ktorým sa u viacerých skrýva deficit jeho príjmu), avšak u niektorých je odporúčaná dávka jódu mierne prekročená.

Ďalším významným počinom bolo uskutočnenie prvého celoslovenského výskumu výživy obyvateľstva v rokoch 1951–1957 B u d l o v s k ý m, S e č a n s k ý m a spol. [6], v rámci ktorého bolo klinicky a somatometricky vyšetrených 10 000 osôb. Odpovedajúca časť štúdie aj laboratórne stanovením základných hematologických ukazovateľov – počtu erytrocytov, množstva hemoglobínu, hematokritu a leukocytov. Výskum výživy sa uskutočnil vo vybraných rodinách.

Celoslovenský výskum poskytol viaceré významné poznatky o značných regionálnych rozdieloch v spotrebe potravín a pripravovaných jedál. Na jeho základe boli vypracované aj prvé údaje priemerných výšok a hmotností oboch pohlaví dospelého obyvateľstva Slovenska, ako aj údaje o rozvíjajúcom sa spoločnom stravovaní, v ďalšom rozšírené o jeho cielený výskum v rokoch 1957–1959 [7].

Z dnešného pohľadu možno uviesť už ako raritný nález z prvého celoslovenského výskumu okolo 1 % prevalenciu obezity u školskej mládeže v okrese Prešov, ako aj údaje o jej rozšírenosti v mestách u 3–5 % detí. Častejšie však pritom boli nálezy výživových deficiencií u detí a dospelých, ktoré sú dnes pri epidemiologických štúdiách, našťastie zriedkavejšími nálezmi.

V ďalšom bola Výskumnému ústavu výživy ľudu (VÚVL) v Bratislave pridelená kľúčová federálna štátna výskumná úloha, ktorá bola riešená aj v rámci medzinárodného Biologického programu so sídlom v Londýne s názvom: „Výskum zdravotne-nutričného stavu obyvateľstva spádovej oblasti VSŽ; novo budovaného sídliska Terasa, mesta Košíc

a okresu Trebišov, s osobitným zameraním na vznik a výskyt vybraných hromadných degeneratívnych chorôb“. Prvá etapa výskumu sa uskutočnila v rokoch 1962–1966 [8] a druhá v rokoch 1967–1971 [9]. Išlo o štúdiu, u ktorej prvýkrát došlo k širokej biochemizácii epidemiologického výskumu na Slovensku. Sledovali sa pôvodné základné hematologické parametre a novo zaradené boli stanovenia klasických markerov KVCH: celkové množstvo cholesterolu, jeho frakcií LDL a HDL, množstvo triacylglycerolov v krvnom sére. Z metabolizmu bielkovín celková protei-
némia a množstvo albumínu v sére. Koncentrácia vitamínu C v sére bola stanovené už v predchádzajúcej etape výskumu, kde sa potvrdila významná inverzná korelácia medzi cholesterolémiou a askorbinémiou u sledovaných súborov [8].

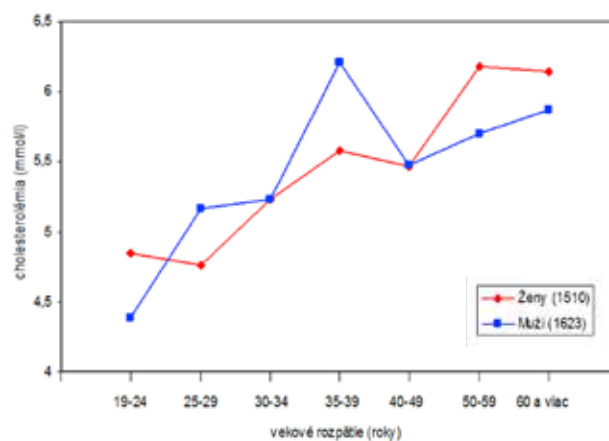
Uvedený poznatok predstavoval základ pre ďalšie experimentálne práce o potvrdení vzťahu cholesterolu a vitamínu C k arterioskleróze [10, 11].

V klinickom vyšetrení sa prvýkrát u nás v somatometrickom vyšetrení zaviedla metóda kaliperometrie a tým stanovenie obezity v súhlase s jej definíciou, podľa abnormálneho množstva tuku v tele [12].

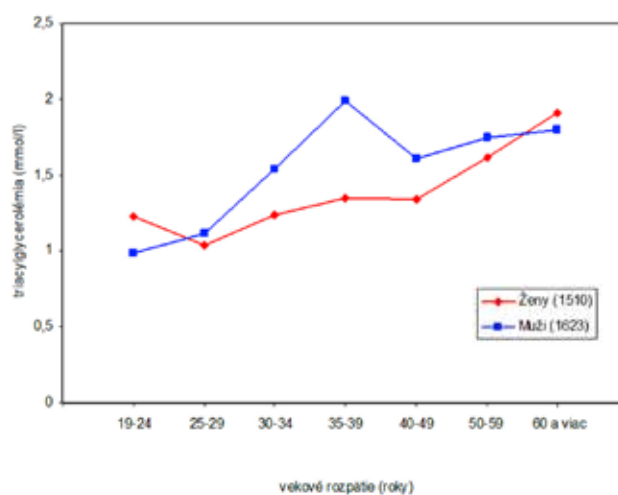
Podstatná časť z dosiahnutých výsledkov výskumu bola prezentovaná na 8. Medzinárodnom kongrese výživy v Prahe, ktorý sa konal v dňoch 28. 8.–5. 9. 1969. Referáty sú publikované v trojdielnom zborníku *VIIIth International Congress of Nutrition, Abstracts of Papers*, 2. diel, K a j a b a et al. 7 epidemiologických prác J–9 a K 1–6, Prague, 1969 [13].

V období rokov 1984–1990 sa uskutočnil 2. reprezentatívny celoslovenský výskum výživy obyvateľstva v dvoch etapách, jesenného a jarného výskumu [14]. Celkovo bolo klinicky vyšetrených 24 000 osôb tzv. zdravej populácie detí a dospelých, polovica z toho aj biochemicky. Spektrum biochemických vyšetrení sa po zadovážení vedeckého prístroja atómového absorpčného analytického spektrometra rozšírilo o stanovenia sérového množstva stopových prvkov zinku a medi [15] a neskôr aj selénu.

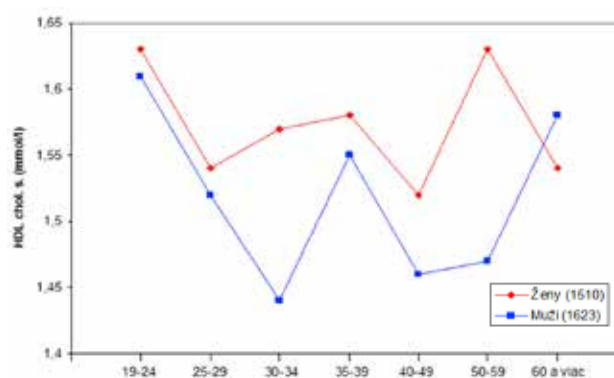
Celoslovenský výskum poskytol aktuálne reprezentatívne somatometrické a klinicko-biochemické údaje, ako aj obraz o prevalencii nekontagióznych chorôb u mladej generácie a dospelých v SR. Týka sa to hlavne obezity, dyslipoproteinémií a artériovej hypertenzie, ktorých údaje dosiaľ predstavujú základnú porovnávajúcu bázu pre posúdenie a porovnanie zmien u daných ukazovateľoch v následných nových epidemiologických štúdiách.



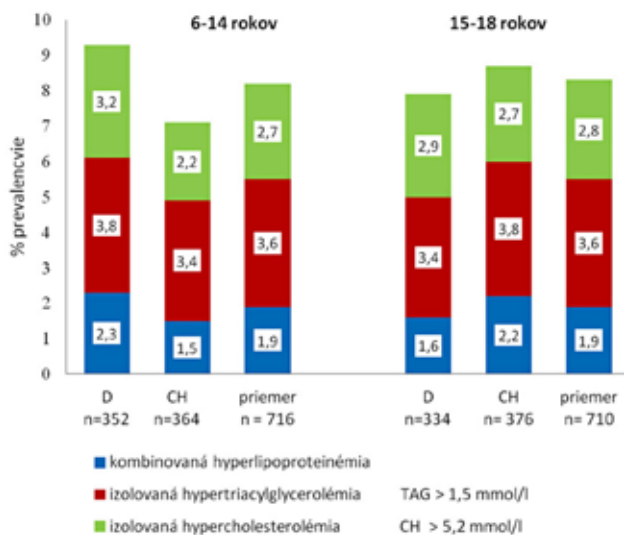
Obr. 1. Priemerné hodnoty cholesterolemie u žien a mužov Slovenska, n = 3133 z celoslovenského reprezentatívneho výskumu výživy obyvateľstva [14]



Obr. 2. Priemerné hodnoty triacylglycerolemie u žien a mužov Slovenska, n = 3133 z celoslovenského reprezentatívneho výskumu výživy obyvateľstva [14]

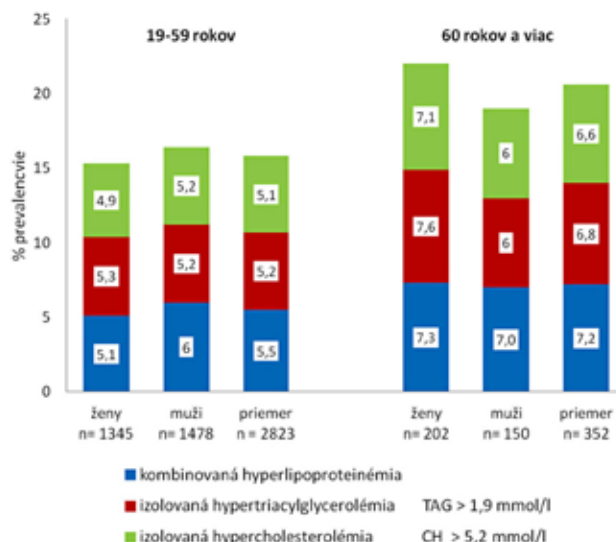


Obr. 3. Priemerné hodnoty HDL-cholesterolu v sére u žien a mužov Slovenska, n = 3133 z celoslovenského reprezentatívneho výskumu výživy obyvateľstva [14]



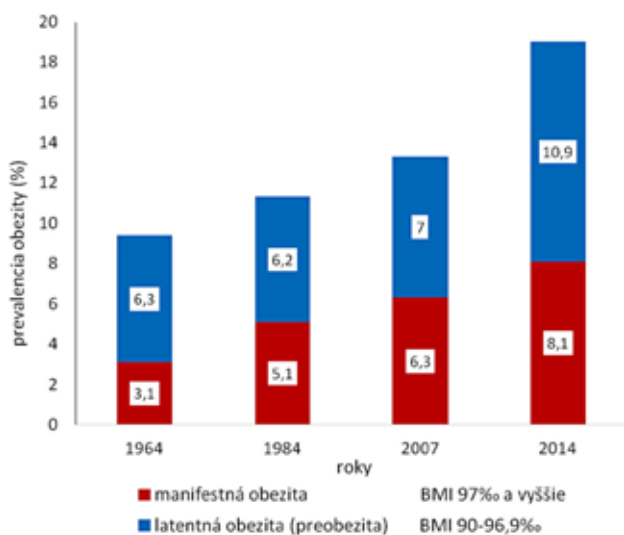
Obr. 4. Prevalencie troch foriem hyperlipoproteinémie u detí a mládeže na Slovensku [14]

Vysvetlivky: D dievčatá, CH chlapci, CH celkový cholesterol, TAG triacylglyceroly v sére

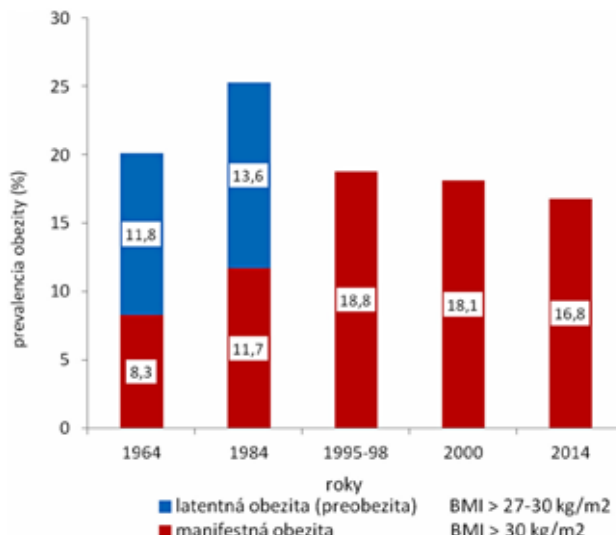


Obr. 5. Prevalencie troch foriem hyperlipoproteinémie u dospelých na Slovensku [14]

Vysvetlivky: CH celkový cholesterol, TAG triacylglyceroly v sére



Obr. 6. Dynamika prevalencie dvoch foriem obezity u detí a mládeže vo veku 7–18 rokov v SR v rokoch 1964–2014 [8, 9, 14]



Obr. 7. Dynamika prevalencie obezity u dospeljej populácie (ženy, muži) vo veku 19–75 rokov v SR v rokoch 1964–2014 [8,9,14]

Niektoré zo základných údajov celoslovenského výskumu prezentujeme v súčasnej práci, obr. 1–7.

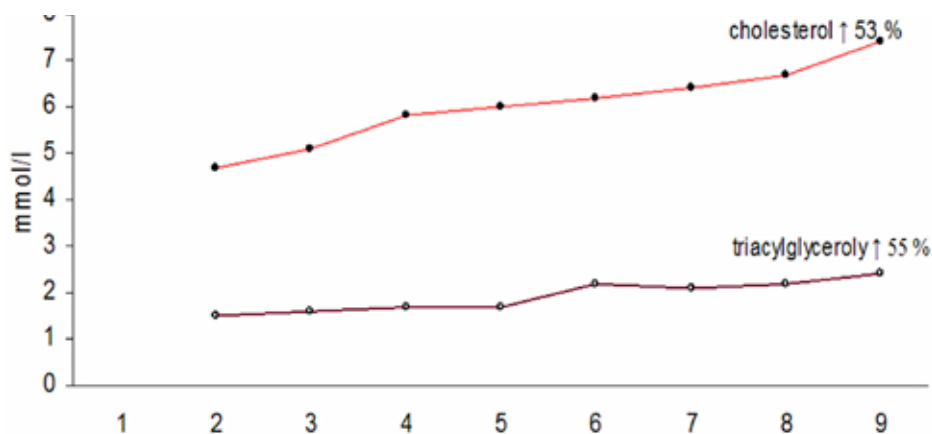
V nadväznosti sa realizoval obdobne metodicky zameraný výskum výživy vo vybraných regiónoch Slovenska v rokoch 1995–1998 [16], ktorý poskytol údaje o zmenách niektorých ukazovateľov, oproti údajom z celoslovenského výskumu.

Nasledovali aj ďalšie epidemiologické výskumy.

V období rokov 1993–2003 sa uskutočnil epidemiolo-

gický výskum prevalencie neinfekčných srdcovocievnych a nádorových chorôb u obyvateľov modelovej oblasti Banská Bystrica a modelovej oblasti Trebišov v rámci projektu CINDI so štandardnou biochemickou časťou, ktorý upozornil na nevyhnutnosť ich primárnej prevencie [17].

Významná epidemiologická štúdia z roku 2002 so súborom 1600 vyšetrených osôb s názvom: „Epidemiologická štúdia vplyvu niektorých habituálnych, nutričných a chorobných faktorov na vznik a rozvoj osteoporózy“



Obr. 8. Trend zmien hladiny cholesterolu a triacylglycerolov v sére počas gravidity [19]

a s rozšíreným biochemickým stanovením množstva kalčia, fosforu, horčíka a vitamínu 25(OH)D v sére [18].

Realizovaný bol tiež epidemiologický klinicko-biochemický výskum spôsobu a stavu výživy žien v SR s fyziologickou graviditou v celkovom počte 2200, u ktorých bola potvrdená fyziologická hyperlipoproteinémia gravidných, obr. 8. [19].

Zistené boli aj zmeny hematologických parametrov: významné zníženie počtu erytrocytov, koncentrácie hemoglobínu, proteinémie a siderémie, ako prejavy fyziologickej hypervolemie v gravidite. Znamená to, že pre posúdenie stavu výživy gravidných musia platiť špeciálne hematologické a biochemické referenčné hodnoty.

V období rokov 2003–2005 bol riešený projekt „Zdravotné aspekty bioaktívnych látok v potravinách rastlinného pôvodu a ich účinky na antioxidačný status organizmu s rozšíreným biochemickým stanovením množstva vápnika, horčíka, vitamínu A a B12, celkových peroxidov, malondialdehydu, homocysteínu a kvercetínu v sére“ [20].

Podnetná je epidemiologická štúdia s názvom „Prevalence and trends of Metabolic syndrome in Slovakia“ riešená v priebehu rokov 2003–2017 s kompletným stanovením lipidového spektra a prínosnými realizačnými závermi [21].

V ďalších epidemiologických štúdiách došlo popri dosiaľ uvedených ukazovateľoch, k rozšíreniu spektra biochemických stanovení o meranie plazmatických koncentrácií vitamínov E, B9 (kyselina listová), β -karoténu, produktov oxidačného poškodenia lipidov, oxidačne modifikované LDL v plazme a oxidačného DNA poškodenia; zlomy, oxidované puríny a pyrimidíny v lymfocytoch [22]. V porovnávajúcej epidemiologickej štúdii 2 súborov, ve-

getariánov versus bežnej populácie boli vyšetrované: glukóza a inzulín v sére, ktorý je stanovený elektro-chemiluminiscenčnou imuno-metódou a inzulínová rezistencia IR/HOMA [23]. Antioxidačné enzýmy: superoxid-dismutáza, kataláza, glutatiónpoxidáza, tripeptid glutatión – všetky v erytrocytoch a konjugované diény v plazme [24]. Reálne možno očakávať, vzhľadom k zameraniu štúdií, ďalšie rozširovanie biochemického stanovenia benefitných látok, najmä stopových prvkov podľa Odporúčaných výživových dávok (OVD) obyvateľstva SR [25], ale tiež rizikových faktorov stavu výživy.

Významné bolo riešenie vedecko-výskumného projektu MŠV VaŠ SR pre štrukturálne fondy EU (ASFEU) s názvom „Výskum zdravotných efektov rastlinnej potravy a možnosti redukcie zdravotných rizík“ v rokoch 2009–2012, pri ktorom v rámci epidemiologického výskumu došlo k stanoveniu imunologických ukazovateľov v sére a množstva vylučovaného cholesterolu a žlčových kyselín v stolici probandov [26]. Projekt bol ukončený úspešnou vedeckou konferenciou SZU v máji 2012 v Bratislave.

ZÁVER

V práci je prezentovaný vývoj epidemiologických výskumov výživy a laboratórnych ukazovateľov, ako aj nekontagióznych chorôb na Slovensku. Epidemiologické výskumy sú cenným zdrojom nových informácií o potvrdených koreláciách medzi sledovanými javmi, avšak potvrdenie ich kauzality a mechanizmus vzniku nie sú schopné objasniť. Prislúcha to až následným experimentálnym a klinickým štúdiám, ako je na to upozornené v práci. Integrovanou

zložkou epidemiologických výskumov sú biochemické stanovenia. Poukázané je na ich vývoj a rozširovanie podľa tematického zamerania štúdií a pre objektivizáciu nálezov možno očakávať ďalší nárast ich počtu v rámci epidemiologických výskumov výživy.

LITERATÚRA

1. **Mahmood, S. S., Levy, D., Vasan, R. S., Wang, Th. (2014):** The Framingham Heart Study and the epidemiology of cardiovascular disease: a historical perspective. *The Lancet*, 2014; 383 (9921): 999–1008.
2. **Keys, A. (1970):** *Coronary Heart Disease in Seven Countries*. Amer. Heart Assoc., INC, monograph. Nu 29, New York, 1970; 211 p.
3. **Podoba, J., Langer, P. (1964):** *Naturally occurring goitrogens and thyreoid function*. Bratislava, Veda SAV, 1964.
4. **Langer, P. (1954):** *Výskum nutričných príčin strumy: hodnotenie možnosti uplatnenia nutričných faktorov v etiológii endemickej strumy na základe vyšetrenia výživy a niektorých biochemických ukazovateľov*. Bratislava, Záverečná správa EÚ SAV, 1954, 245 s.
5. **Podoba, J. jr., Rácová, K., Urbánková, H., Cupaník, V. a spol. (2016):** Význam profylaxie chorôb z nedostatku jódu pre vývoj plodu a intelektu človeka. *Slov. Gynek. Pôr.*, 2016; 23(1): 4–8.
6. **Budlovský, J., Sečanský, I. a spol. (1957):** *Súčasný stav výživy obyvateľstva na Slovensku*. Bratislava, Záverečná správa VÚVL, 1957, 335 s.
7. **Budlovský, J., Sečanský, I. a spol. (1959):** *Stav spoločného stravovania na Slovensku*. Bratislava, Záverečná správa VÚVL, 1959, 257 s.
8. **Kajaba, I. a spol. (1966):** *Výskum aktuálneho zdravotne-nutričného stavu obyvateľstva na východnom Slovensku*. 1. etapa r. 1962–1966. Bratislava, SVTI VÚVL, 1966, 238 s.
9. **Kajaba, I. a spol. (1971):** *Výskum zdravotne-nutričného stavu obyvateľstva spádovej oblasti VSŽ s osobitným zameraním na vznik a výskyt niektorých hromadných degeneratívnych chorôb*. 2. etapa r. 1967–1971. Bratislava, SVTI VÚVL, 1971, 3. diely, 510 s. (poznámka: práca bola 3 profesormi lekármi schválená a odporúčaná k obhajobe DrSc. prác, politickým zásahom zrušená v r. 1972).
10. **Ginter, E., Kajaba, I., Nízner, O. (1969):** *The effect of Ascorbic acid on cholesterolemia in healthy subjects with seasonal deficit of Vitamin C*. VIIIth ICN in Prague—abstracts of papers. IUNS, 1969, 1.vol. G-11.
11. **Ginter, E. (1975):** *Ascorbic acid in Cholesterol and Bile acid metabolism*. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1975; 30 (256): 410–421.
12. **Kajaba, I., Bučko, A. (1968):** Health nutritional status of children in an industrialised and agricultural area of Eastern Slovakia; II. Somatometric investigation. *Rev. Czech Med. Tom.*, 1968; 14(3): 170–179 and III. Investigations of lipid metabolism; 14 (3): 180–191.
13. **Kajaba, I. a spol. (1969):** *7 epidemiol. nutrič. štúdií*. In VIIIth Internatonal Congress of Nutrition – abstracts of papers. 2. vol. J-9 and K 1-6. Prague: IUNS, 1969.
14. **Kajaba, I., Nagy, L., Laluha, I. a spol. (1990):** *2. Celoslovenský reprezentatívny výskum výživy obyvateľstva v rokoch 1984–1989*. 3. diely. Bratislava, SVTI VÚVL, 1990, 505 s.
15. **Magálová, T., Brtková, A., Bederová, A., Kajaba, I., Puchoňová, I. (1994):** Serum copper and zinc in industrial centers in Slovakia. *Biol. Trace Elem. Res.*, 1994; 40 (3): 225–235.
16. **Béderová, A., Babinská, K., Magálová, T. a spol. (2000):** Spôsob výživy detí a mládeže, príjem makro- a mikronutrientov vo vybraných regiónoch SR v r. 1998. *Hygiena*, 2000; 45 (4): 204–213.
17. **Avdičová, M., Hrubá, F., Námešná, J. (2005):** Výskyt rizikových srdcovo-cievnych a nádorových chorôb v modelovej oblasti Banskej Bystrice v r.1993-2003 a Trebišova v r. 1998-2003. In *Surveillance chronických chorôb v Slovenskej republike*. Banská Bystrica, DALI BB, 2005, s. 37–51.
18. **Magula, D., Petříček, Š., Bitter, K., Dvořák, F., Šramková, K. a spol. (2002):** Epidemiologická štúdia vplyvu niektorých habituálnych, nutričných a chorobných faktorov na vznik a rozvoj osteoporózy. *Časopis pre pracovníkov diagnostických laboratórií*, 2002; 7(1): 18–25.
19. **Kajaba, I., Štencel, J., Okša, A., Krátky, A. (2003):** *Klinicko-biochemické parametre zdravých žien s fyziologickou graviditou – Výživa plodu a otázky fetálneho programovania*. Sborník 7. konferencie „Výživa tehotných a kojících žien“, s. 94–107. Praha, Spol. Lék. čes. J. E. Purkyně a OHS Teplice, 2003, 180 s.
20. **Ostrihoňová, T., Rimárová, K., Béréšová, J. et al. (2017):** Prevalence and Trends of Metabolic syndrome in Slovakia during the Period of 2003–2012. *Cent. Eur. Public Healt* 2017; 25(4): 313–320.
21. **Maďarič, A., Kajaba, I., Valachovičová, M., Nagyová, A., Kadrabová, J. a spol. (2005):** *Zdravotné aspekty bioaktívnych látok v tzv. funkčných potravinách rastlinného pôvodu a ich účinky na antioxidačný status súboru probandov*. Záverečná správa riešeného projektu v r. 2003–2005. Bratislava, AK SZU, 2005, 80 s.

22. **Krajčovičová-Kudláčková, M., Valachovičová, M., Mišlanová, C., Příbojová, J. (2013):** Oxidative lipid and DNA damage in relation to nutrition. *Lek. Obz.*, 2013; 62(1): 11-14.
23. **Urbánek, V., Kudláčková, M., Kajaba, I., Babinská, K., Valachovičová, M. a spol. (2013):** Nutričná štúdia u osôb s dominantnou konzumáciou rastlinnej potravy v porovnaní s bežnou populáciou. *Lek. Obz.*, 2013; 62(1): 15–18.
24. **Kajaba, I., Hrušovský, Š., Gazdíková, K. a spol. (2014):** Metabolické poruchy – možnosti ich korekcie prírodnými látkami vo výžive. In *Jurkovičová, J., Štefániková, Z. (Ed.): ŽPaZ 2014 – zborník s. 123–133*. Bratislava: ÚH LF UK, ÚVZ SR, 2014, 476 s.
25. **Kajaba, I., Štencl, J., Ginter, E., Šašínska, A.M. a spol. (2017):** Nové odporúčané výživové dávky (OVD) pre obyvateľstvo SR; New Recommended Dietary Allowances (RDA) for population the Slovak Republic. *Lek. Obzor*, 2017; 66(2): 49–60.
26. **Madarič, A., Kajaba, I., Kudláčková-Krajčovičová, M., Valachovičová, M., Bírošová, L. a spol. (2012):** *Výskum zdravotných efektov rastlinnej potravy a možnosti redukcie zdravotných rizík*. Záverečná správa projektu štrukturálneho fondu EU (ASF EU) riešený v r. 2009-2012. Bratislava, AK SZU, 2012, 50 s.



PROBLÉMY A PERSPEKTÍVA RUTINNEJ NEINVAZÍVNEJ DIAGNOSTIKY NÁDOROV MOČOVÉHO MECHÚRA NA MOLEKULOVEJ ÚROVNI

Sobolová, V.¹, Nagy, V.¹, Dubayová, K.², Mareková, M.²

¹Urologická klinika UPJŠ LF a UNLP Košice

²Ústav lekárskej a klinickej biochémie UPJŠ LF, Trieda SNP 1, 040 11 Košice

e-mail: vladimira.sobolova@upjs.sk

SÚHRN

Nádory močového mechúra (NMM) sú ochorením, pre ktoré je charakteristická rôznorodá klinická manifestácia, morfológia a vzhľadom k rôznym typom tohto ochorenia, je rozličná i prognóza. Včasnú diagnostiku sťažuje často asymptomatický priebeh, prípadne nešpecifické symptómy. Zlatým štandardom v diagnostike je pre pacienta nekomfortné vyšetrenie – cytoskopia. Moč sa javí ako ideálny neinvazívny diagnostický materiál, pretože je v močovom mechúre najdlhšie v styku s tkanivom, a tak obsahuje veľa molekúl uvoľnených z nádorového tkaniva. Štúdium zloženia moču aplikáciou „omických“ prístupov prinieslo mnoho kandidátov na molekulové markery NMM. Článok prináša stručný prehľad nádorových markerov a metód ich detekcie v moči.

Kľúčové slová: nádory močového mechúra; molekulové nádorové markery; moč

ABSTRACT

Bladder tumors are a disease characterized by a diverse clinical manifestation, morphology, and due to the different types of the tumors the prognosis is also dif-

ferent. Early diagnosis is often obstructed by an asymptomatic course of the disease or non-specific symptoms. The gold standard in diagnostics is cytoscopy – which is invasive and can be uncomfortable for the patient. Urine appears to be an ideal non-invasive diagnostic material. In the bladder, it has the longest contact with tissue, and thus contains many molecules released from tumor tissue. The study of urine composition using “omic” approaches has yielded many candidates for bladder tumor molecular markers. The research article provides a brief overview of tumor markers and methods of their detection in urine.

Key words: bladder tumors, molecular markers of bladder tumors, urine

ÚVOD

Nádory močového mechúra (NMM) sú ochorením, ktoré má rôznorodú klinickú symptomatológiu aj morfológiu. Práve z tohto dôvodu majú rôzny priebeh a aj rozličnú prognózu. Nádory močového mechúra sú najčastejšie nádory urotelové, ktorých pôvodom je epitel (B a b j u k a kol., 2017). V rámci nádorov urogenitálneho traktu sa jedná o druhý najčastejší karcinóm a každoroč-

ne je celosvetovo diagnostikovaný u viac ako pol milóna ľudí (W i t j e s a kol., 2017; J e m a l a kol., 2011). Keďže symptomatológia je nešpecifická a častokrát chudobná, ich diagnostika ja výzvou ako pre urológov, tak aj pre laboratórnych diagnostikov.

Tendencia výskytu nádorov močového mechúra ako aj mortalita majú stúpajúcu tendenciu (B r a y a kol., 2018) a preto je nutné zlepšovanie záchytu a diagnostiky tohto ochorenia rovnako ako techniky následného sledovania pri follow – up procedúrach. Obrovská variabilita typu NMM komplikuje aj ich klasifikáciu a staging (S o u k u p a kol., 2020). Momentálne sa diagnostika opiera o histopatologické zhodnotenie vzorky nádoru získaného endoskopickým vyšetrením. Toto vyšetrenie sa dopĺňa o CT urografiu a cytologické vyšetrenie moču. Aj keď zlatým štandardom v diagnostike NMM je cytoskopia, najmä z dôvodu snahy o zabezpečenie čo najvyššieho komfortu pre pacienta vedie k úsiliu hľadania a aplikácie metód, ktoré sú neinvazívne, mali by senzitivitu a špecificitu porovnateľnú s cytoskopiou a navyše diagnostika by nebola ekonomicky náročná.

Vďaka intenzívnemu rozvoju omických disciplín, najmä genomiky, proteomiky či transkriptomiky, boli identifikované mnohé markery z radu rozpustných biomolekúl prítomných v moči

Z dôvodu neinvazivity a jednoduchého získania materiálu je moč ideálnym biologickým materiálom, na ktorý je cielený výskum kandidátov na vhodný diagnostický marker NMM. V súčasnosti už existuje niekoľko komerčných testov, ktoré sú nápomocné v klinickej diagnostike (Tab. 1). Tieto testy sú zamerané buď na markery rozpustné v moči, alebo na markery asociované s bunkami prítomnými v moči.

RUTINNE VYUŽÍVANÁ ANALÝZA MOČU V DIAGNOSTIKE NMM

Cytológia

Cytologické vyšetrenie moču patrí k rutinným vyšetreniam, ktoré sa v klinickej praxi v súvislosti s diagnostikou NMM, využíva ako pomocné. Cytologické vyšetrenie je založené na hodnotení buniek exfoliovaných z močového mechúra do moču. Moč je získaný buď natívne alebo pri endoskopickom zákroku. Vzhľadom na lýzu buniek sa nesmie používať prvý ranný moč

Výhodou je vysoká špecificita (80–100 %) pre lézie vysokého stupňa (high grade) s potenciálom rekurencie, metastazovania a invadovania do tkaniva a vysokou mortalitou. Ďalšou výhodou je nízka cena vyšetrenia a minimálna invazivita v prípade odberu natívneho moči pri mikcii. Nevýhodou je nízka senzitivita, ktorá sa pohybuje medzi 30–90 %, v závislosti od stupňa (grade) lézie. Diagnostika neinvazívnych a nízkostupňových lézií pre ich celulárnu kohezivnosť a malý výskyt dysplázií či atypií má nízky záchyt.

Hematúria

Najčastejší nález u pacientov trpiacich NMM je v rámci štandardného vyšetrenia moču hematúria (až u 90 % pacientov), s ktorou môže byť prítomná i pyúria pri komitantnej uroinfekcii. V rámci vyšetrenia krvného obrazu sú to nálezy anémie z chronickej straty krvi, prípadne azotémie, spôsobenej subrenálnou obštrukciou z poruchy odtoku moču z ureterov z obštrukcie nádorom či lymfadenopatiou. Hematúria nie je nález špecifický len pre NMM. Vyskytuje sa aj u urolitiázy, benígnych hyperplázií prostaty, renálnych karcinómoch, zápalových ochoreniach a pri rôznych stavoch, ktoré sú spojené s krvácaním v urogenitálnom trakte. Rutinná detekcia hematúrie je založená na detegovaní hemoglobínu pomocou diagnostického prúžku. Táto detekcia poskytuje užitočnú prvotníovú informáciu pri diagnostike urologických malignít. Vysokú špecificitu a senzitivitu má mikroskopická analýza červených krviniek, kde sa hodnotí morfológia a objem červených krviniek. Vysokú špecificitu pri nezmenenej senzitivite poskytuje aj analýza červených krviniek prietokovým cytometrom (M u t o a kol., 2014).

PERSPEKTÍVNE MOLEKULOVÉ DIAGNOSTICKÉ MARKERY NMM

Nádorové markery analyzované z moču

Moč je v rámci močových ciest v močovom mechúre najdlhší čas v styku s tkanivom, preto je veľmi pravdepodobné, že bude obsahovať veľa molekúl pochádzajúcich z nádorového tkaniva.

Nádorové biomarkery sú molekuly (najmä proteíny, nukleové kyseliny), ktoré sú detegované v rôznych biologických tekutinách (krv, moč a pod.) a sú produkované priamo nádorom alebo sú odpoveďou naňho. Nádorové biomarkery moču zahŕňajú proteíny a peptidy, exozómy,

voľnú DNA, cirkulujúce nádorové bunky, mRNA, mikro RNA (L o p e z - B e l t r a n a kol., 2020).

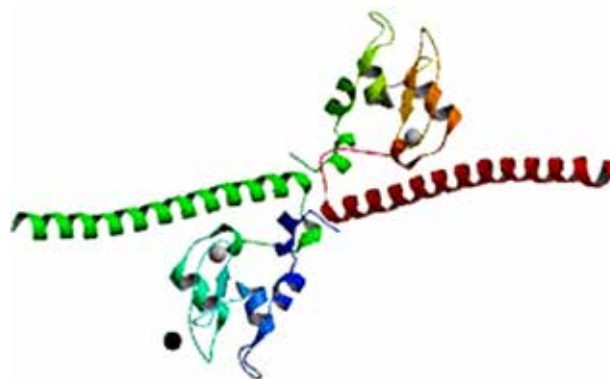
Proteomický výskum priniesol mnohé proteínové markery (Tab. 1), ktorých detekcia komerčnými testami v moči je väčšinou založená na princípe imunoanalýzy v rôznych variáciach (napr. ELISA, EIA, imunochromatografia).

Proteínové inhibítory

Survivín je najmenším členom zo skupiny proteínových inhibítorov apoptózy, ktorý sa podieľa na inhibícii apoptózy, ale aj regulácie bunkového cyklu. Tieto odlišné funkčné atribúty ho robia jedinečným proteínom zapojených do regulácie protichodných procesov: regulácie bunkovej proliferácie a smrti bunky (J a i s w a l a kol., 2015).

Regulačný mechanizmus expresie survivínu zatiaľ nie je celkom jasný. Survivín je exprimovaný vo väčšine ľudských malignít zahrňujúc NMM, nádory pľúc, žalúdka, pečene, prsníka, ovárií aj hematologických malignít. Zvýšená expresia survivínu je u malignít a koreluje s agresivitou ochorenia a prognózou. Survivín nie je detegovateľný v normálnych nenádorových tkanivách. Detekcia survivínu v moči ho stavia do pozície nového potenciálneho

molekulového prediktívneho a prognostického markera NMM. Laboratórna diagnostika survivínu je založená buď na imunochemickej detekcii proteínu (ELISA) alebo mRNA metódou PCR. Nevýhodou je, že nadexpresia survivínu nie je špecifická len pre NMM (M a r g u l i s a kol., 2008). Avšak metódou RT-PCR bola potvrdená expresia survivínu v moči všetkých pacientov s NMM, ale nebola detegovateľná vo vzorkách s normálnym urotelom (M o u s a a kol., 2006).



Obr. 1. Ilustračný obrázok 3D štruktúry molekuly survivínu

Tabuľka 1. Prehľad nádorových proteínových markerov detegovateľných v moči (podľa L o k e s h w a r a kol., 2005)

Test/Marker	Detegovaný marker	Typ markera	Metóda	Senzitivita [%]	Špecifita [%]
Cytológia	Nádorové bunky	Morfológia bunky	Mikroskopia	11–76	> 90
Hematúria	Hemoglobín	Proteín	Diagnostický prúžok (strip)	50–90	nízka
	Červené krvinky	Morfológia červených krviniek	Kontrastná mikroskopia Prietokový cytometer	100	100
Proteínové inhibítory					
Survivín	Inhibítory apoptózy	Antigén	ELISA	100	87-100
BTA	CFHR proteín Faktor H	Antigén	BTA-Stat (kvalitatívny test) Strip imunoanalýza	36–89	50–70
			BTA-TRAK (kvantitatívny test) Sendvič. ELISA	57–83	50 – benígne urol. diagnózy 90 – zdraví
Proteíny bunkového jadra					
NMP22	Proteín mitotického aparátu	Antigén	Sendvič. ELISA	47–100	55–80
BLCA-4	Matrixový proteín	Antigén	ELISA	96,4	87–100 100 zdraví
Intermediárne filamenty					
UBC	Cytokeratín 8 a 18	Antigén	Sendvič. ELISA, POCT	36–79	88–92
CYFRA 21-1	Cytokeratín 19	Antigén	ELISA	75–97	67–71

BTA TESTY sú založené na detekcii proteínov, ktoré sú inhibítormi dráhy aktivácie komplementu, ako sú proteíny príbuzné faktoru H (factor H-related proteins, CFHR), aj faktora H (M b e u t c h a a kol., 2016).

Faktor H (FH) je 150 kDa glykozylovaný plazmatický proteín a hlavný inhibítor alternatívnej cesty aktivácie komplementu. Okrem tejto funkcie sa FH sa viaže aj na epitelové a endotelové bunky, bazálne membrány, ako aj na povrch buniek niektorých nádorov, čím chráni ich štruktúru pred pôsobením komplementu. Povrchové interakcie závisia od väzby FH na polyanionické glykozamínoglykánové štruktúry, nakoľko FH má 3 väzbové miesta pre heparín. (C h e n g a kol., 2005).

Proteíny príbuzné faktoru H (CFHR) predstavujú skupinu piatich plazmatických glykoproteínov proteínov CFHR1-CFHR5, s podobnou štruktúrou a každý sa môže viazať na centrálny komponent komplementu C3b. U CFHR proteínov je predpokladaná funkcia rozpájania komplementovej kaskády a podporovanie selektívnej rastovej výhody nádorových buniek a ich maskovanie pred imunitným systémom (S u n a kol., 2015; L o k e s h w a r a kol., 2005). FH a CFHR sú prítomné vo väčšine telových tekutín vrátane moču. Produkcia CFHR proteínov bunkami nádoru močového mechúra umožňuje nádorovým bunkám uniknúť hostiteľským imunitným mechanizmom. Antigén je vylúčovateľný do moču pacientov s NMM vo významne zvýšenom množstve. Zvýšené hodnoty môžu byť aj u pacientov s benígnymi urologickými ochoreniami, čo znižuje prediktívnu hodnotu BTA testov.

Komerčne sú dostupné BTA-Stat a BTA-TRAK diagnostické testy, BTA stat je kvalitatívny a BTA-TRAK je kvantitatívnym testom. BTA stat je jednoduché a rýchla jedнокroková imunoanalýza (M b e u t c h a a kol., 2016) pomocne používaná pri primozáchyte, záchyte rekurentného karcinómu močového mechúra a karcinómu horných močových ciest, ktorý je tiež urotelového pôvodu (B a b j u k a kol., 2002; S c h r o e d e r a kol., 2004).

BTA-TRAK je založený na sendvičovej ELISA metóde. Pri tomto vyšetrení sa monoklonálna protilátka anti-hCFHRp viaže v moči na svoje cieľové molekuly. Množstvo hCFHRp sa určí porovnaním so štandardizovanou sadou.

V metaanalýze G l a s a a kol. (2003) bola senzitivita a špecificita BTA TRAK testu 66 % a 65 %. U testu BTA stat bola senzitivita 70 % a špecificita 75 %. U oboch testov senzitivita stúpa so znižujúcou sa diferenciáciou nádoru (M a l k o w i c z, 2000). BTA stat test, rovnako ako test



Obr. 2. Ilustračný obrázok diagnostického testu BTA stat

na NMP22 vykazuje nižšiu senzitivitu u rekurentných tumorov ako u prvozáchyto. Keďže má CFH vysokú koncentráciu v krvi, BTA stat aj BTA TRAK testy sa objavujú falošne pozitívne u pacienta s hemtúriou bez ohľadu na to, či je zdrojom tumor alebo niečo iné. Falošná pozitivita testov sa vyskytovala aj u pacientov, ktorí mali v minulosti podávanú intravezikálnu terapiu, stent alebo nefrostómiu, urolitiázu, uroinfekciu alebo iný typ nádoru genitourinárneho traktu, napríklad prostaty (L e y h a kol., 1999).

Proteíny bunkového jadra

Tumorovým markerom pre NMM je **nukleárny matrix proteín (NMP)**, ktorý je súčasťou štruktúry jadra bunky a zabezpečuje oporu jeho tvaru. NMP sa zároveň zúčastňuje transkripcie RNA a regulácie génovej expresie. NMP22 je časťou jadrového mitotického aparátu, ktorý je zodpovedný za distribúciu chromatinu do dcérskych buniek počas mitózy. NMP22 ako proteín mitotického aparátu má vyššiu prevalenciu u malígnych buniek urotelu než u zdravých uroteliálnych buniek. Apoptóza buniek je spojená s uvoľnením NMP22 do moču. To je dôvodom, prečo je hladina NMP22 v moči u pacientov s nádormi močového mechúra signifikantne zvýšená (C a r l s o n, 2006)

Komerčne dostupné laboratórne testy (Alere NMP22 BladderChek, Abbott; NMP22 BladderChek test, Matri-tech) sú založené na princípe imunoanalýzy. Tieto testy sú určené najmä na sledovanie dispenzarizovaných pacientov a na detekciu NMM u pacientov s vysokým rizikom výskytu NMM. V porovnaní s cytológiou moču je senzitivita vyššia, hlavne čo sa týka záchytu viac diferencovaných lézií, je porovnateľná v oblasti menej diferencovaných lézií. Na druhej strane v porovnaní s cytológiou moču je špecificita nižšia. Dáta, ktoré porovnávajú vplyv počtu a veľkosti tumoru na senzitivitu sú kontroverzné. Poulakis



Obr. 3. Ilustračný obrázok diagnostického testu Alere NMP22 BladderChek

a kol. (2001) porovnával s popisovanou senzitivitou 79 %, 90 %, a 97 % u pacientov s 1 ložiskom, v druhej skupine s 2–3 ložiskami, a v poslednej s viac ako troma tumormi. Na druhej strane Sánchez-Carbayo a kol. (1999) hodnotili výsledky s vyššou cut-off hodnotou a popisujú senzitivitu 72 %, resp. 75 % u pacientov s 1, resp. viacerými tumormi v porovnaní. Tento rozdiel môže byť následkom dosiahnutia hraničnej hladiny množstvom apoptických buniek a ich nahromadením v moči nezávisle od počtu a veľkosti nádorov.

Boman a kol. (2002) opisujú, že NMP22 vyššiu senzitivitu pri prvozáchyte ochorenia v v porovnaní s tumormi vzniknutými recidívou.

Nevýhodou testu je, že NMP22 ako proteín mitotického aparátu je uvoľňovaný pri akomkoľvek poškodení, apoptóze a deštrukcii buniek, a teda jeho množstvo môže byť zvýšené aj u pacientov s infekciou urotraktu, litiázou a po instrumentácii v močovom trakte – napríklad po cystoskopii (Sharma a kol., 1999).

Zmeny tvaru bunkového jadra sú typické pre nádorové bunky. Proteomickou analýzou jadrového matrixu bola identifikovaná séria matrixových proteínov charakteristických pre NMM, ktoré sa nenachádzajú u jedincov bez nádorového ochorenia. Do tejto skupiny sa radí aj BLCA-4 (Lokeshwar a kol., 2005).

BLCA-4 je nukleárny matrix proteín homologický ku génu zo skupiny transkripčných faktorov ELK3. BLCA-4 je možné dokázať u pacientov v počiatočných štádiách ochorenia a nie je exprimovaný v zdravom uroteli. Vyšetrenie BLCA-4 využíva ELISA-sendvičovú metódu.



Obr. 4. Ilustračný obrázok imunitestu UBC Rapid

(Van Le a kol., 2004). Senzitivita sa udáva v rozmedzí 89–96,4 % a špecificita v rozmedzí 95–100 % a predbežne sa radí medzi najsenzitívnejšie a najšpecifickejšie markery (Meyers-Irvine a kol., 2005).

Intermediárne filamenty, cytokeratíny, sú cytoskeletálne proteíny, ktoré pomáhajú odolávať bunke mechanickému namáhaniu. V ľudských bunkách je celkovo je 20 typov. Zvýšená expresia cytokeratínov 8, 18, 19 a 20, či už vo forme proteínov alebo mRNA, bola zistená u NMM. Vzhľadom na to, že cytokeratíny sú intracelulárne proteíny, ich detekcia v moči je možná len vtedy, keď sú uvoľnené do moču po smrti bunky. Zvýšená expresia cytokeratínov v bunkách urotelu pri nádorovom procese je výsledkom zvýšeného obratu bunkového cyklu.

Na detekciu cytokeratínov 8, 18 a 19 boli vyvinuté diagnostické testy, ktoré umožňujú ich identifikáciu v moči. UBC testy detegujú cytokeratíny 8 a 18, cytokeratín 19 je detegovaný testom CYFRA 21-1. Test na prítomnosť proteínu cytokeratín 20 zatiaľ nie je, cytokeratín 20 je možné detegovať len v exfoliovaných bunkách z močového mechúra do moču alebo vo výplachu močového mechúra na základe expresie mRNA pomocou RT PCR (Lokeshwar a kol., 2005).

UBC-ELISA a UBC-Rapid sú imunitestami určenými na detekciu cytokeratínu (CK) 8 a 18 v moči. Jedná sa o cytoskeletálny proteín intermediárnych filament a je

špecifickým pre epitelové bunky. Expresia alebo prítomnosť mRNA CK 8, 18, 19 a 20 sú klasifikované ako markery nádorov močového mechúra. Keďže sú intracelulárne, záchyt je možný v prípade, že boli uvoľnené do moču po apoptóze. UBC-Rapid test v ktorom reagujú značené protilátky s CK8 a CK18 za tvorby komplexu a jedná sa o je kvalitatívny test. UBC-ELISA je dvojstupňová kolorimetrická sendvičová metóda. Vzorka, štandarda a kontrolná vzorka sú inkubované s monoklonálnou protilátkou (Sánchez-Carbayo a kol., 1999).

Meta-analýzy UBC-Rapid testu udávajú celkovú špecificitu 86.1 % a senzitivitu 59.3 %. Pre UBC-ELISA štúdie používajú odlišné cutoff hodnoty. V niektorých sa vyrátala indexová hodnota, ktorá je pomerom hodnôt pred prvou transuretrálnou resekcii nádoru močového mechúra verzus hodnôt pri follow-upe. Niektorí autori používajú hodnotu upravenú vzhľadom na hodnoty kreatinínu (Babjuk a kol., 2008).

Cyfra21-1 je vyšetrenie ELISA, pri ktorom sa deteguje cytokeratín 19 v moči dvoma monoklonálnymi protilátkami. Nevýhodou je, že podobne ako pri BTA testoch, litíaza, uroinfekcia a intravezikálna terapia BCG vakcínou spôsobujú falošnú pozitivitu (Nisman a kol., 2002). Dostupné dáta udávajú špecificitu 82% a senzitivitu 85%. Sánchez a kol. (1999 a 2001) senzitivitu a špecificitu porovnateľnú s NMP22. Počet štúdií je však veľmi nízky, cutoff hodnoty nie sú stanovené a tak nemožno určiť vhodnosť markera pre klinickú prax (Huang a kol., 2015).

NÁDOROVÉ MARKERY ANALYZOVANÉ Z BUNIEK V MOČI

Povrchové antigéna buniek

Detekcia bunkových nádorových markerov, ako sú povrchové antigény buniek, využíva na ich detekciu imunocytologické metódy. Imunocytológia je založená na vizualizácii antigénu asociovaného s tumorom v uroteliálnych nádorových bunkách využitím monoklonálnych protilátok. Vzhľadom na ich diagnostický potenciál boli vyvinuté rôzne protilátky na diagnostiku NMM.

DD23 je monoklonálna protilátka, ktorá sa viaže na nádorové bunky močového mechúra, ale nereaguje s normálnymi netransformovanými bunkami v exfoliovanom uroteli (Bonner a kol., 1996)). Detekcia je založená na imunocytochemickej procedúre komplexom avidín-



Obr. 5. Ilustračný obrázok ELISA testu Cyfra 21

-biotín značenou alkalickou fosfatázou. U pacientov s neinvazívnym papilárnym urotelovým karcinómom je touto metódou senzitivita uvádzaná v hodnote 81 % a špecificita len 60 %. Práce sa zhodujú, že metóda by mohla byť vhodným doplnením k cytológii, kvôli lepšiemu záchytu low-grade lézií, ale nie je odporúčaná ako rutinná metóda v klinickej praxi (Gilbert a kol., 2003).

uCYT+ je komerčne vyrábaný test založený na imuno fluorescenčnej mikroskopickej detekcii tumor-asociovaného bunkového antigénu v urotelových bunkách. Používaná je kombinácia protilátok obsahujúca fluorescenčne značené monoklonálne protilátky M344 a LDQ10 proti sulfát-mucínovým glykoproteínom a protilátka 19A211 proti glykozylovanej forme vysokomolekulárnych karcinoembryonálnych antigénov. Metóda je finančne náročná a aj náročná na odbornú znalosť hodnotiaceho personálu, či vybavenie laboratória. Priemerne je senzitivita testu 75 % pre vysoko diferencované lézie a 85 % pre high-gradeové lézie. Špecificita je udávaná v rozmedzí 62-84,2%. Má síce nižšiu špecificitu ako cytológia, avšak pre záchyt low-grade lézií, nádorových lézií močovodov a obličkovej panvičky je táto metóda vhodná ako dopĺňujúca k cytológii. Ani test uCYT+ nie je odporúčaný pre použitie v bežnej klinickej praxi (Green a kol., 2006). Nevýhodou testu je mäťúci výsledok u pacientov s inými ochoreniami urotraktu, podobne ako pri iných testoch (Schmitz-Dräger a kol., 2008).

Genetický materiál ako nádorový marker

Súčasná diagnostika sa sústreďuje na identifikáciu príčin ochorenia na molekulovú úroveň. Rozvoj genomiky a transkriptomiky rozšíril diapazón diagnostických nádorových markerov o detekciu rôznych typov nukleových kyselín využitím technických a metodických možností súčasnej molekulovej genetiky a molekulovej cytogenetiky. Molekulová genetika zaznamenala obrovský rozmach

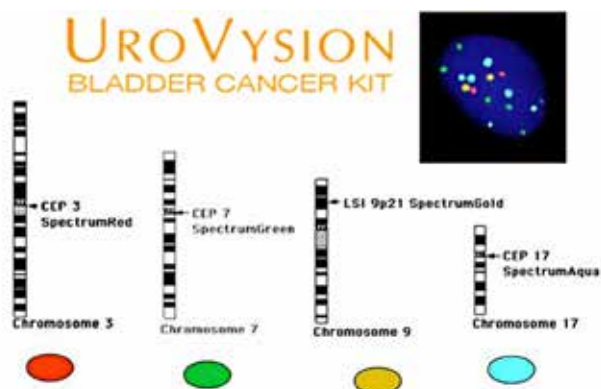
vďaka metodickému skoku v analýze nukleových kyselín zavedením metódy PCR. V súčasnosti je metóda PCR rutinne využívaná v mnohých variantoch, čomu zodpovedá aj sofistikované prístrojové vybavenie. Príklady aplikácie niektorých testov a markerov NMM založených na analýze nukleových kyselín sú uvedené v tabuľke 2

Metóda molekulovej cytogenetiky **FISH** (Fluorescence In Situ Hybridization) má v diagnostike nádorov svoje nezastupiteľné miesto. Metóda FISH elegantne odhaľuje rôzne chromozómové abnormality na úrovni **chromozómálnej DNA**. UroVysion je multifarebné FISH vyšetrenie, ktoré pomocou sondy centromér chromozómov 3, 7 a 17 detegujú ich aneuploidiu a stratu lokusu 9p21. Vyšetrenie je povolené FDA ako diagnostické a aj pri dispenzarizácii a follow-up vyšetreniach pacientov. Nevýhodou je, že podobne ako pri iných testoch litiáza, uroinfekcia a iné nádory urogenitálneho traktu spôsobujú falošnú pozitivitu.

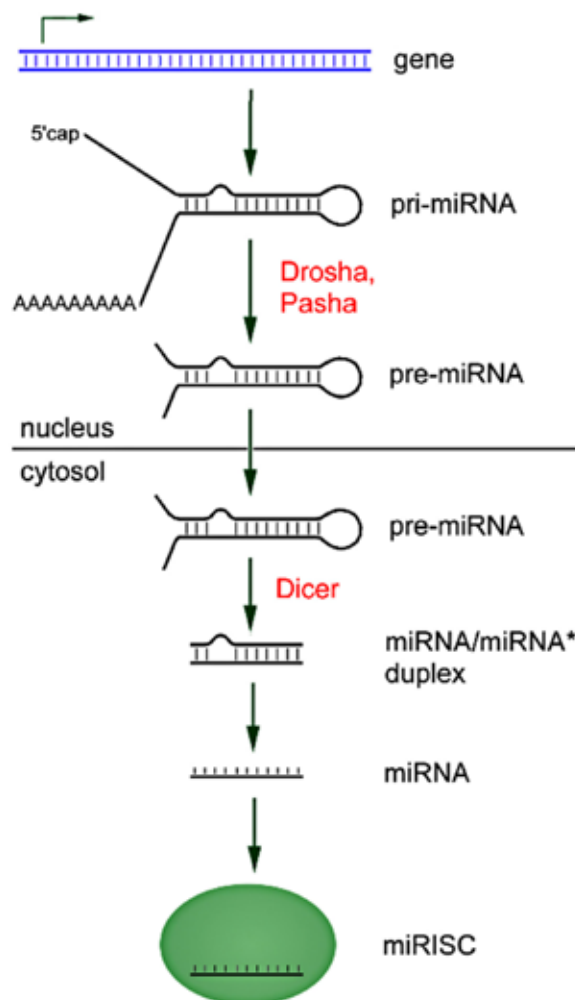
Ďalšou nevýhodou je, že metóda je finančne náročná a aj náročná na odbornú znalosť hodnotiaceho personál či vybavenie laboratória, podobne ako pre uCYT+. Dostupné dáta udávajú špecificitu 82 % a senzitivitu 85. Metaanalýzy udávajú špecificitu približne 80 % a senzitivitu nad 70 %. Obe hodnoty sú však v širokom rozmedzí podľa rôznych štúdií a cut-off hodnoty sú v štúdiách rozličné. Vzhľadom na limitácie testu, jeho náročnosť, vysokú cenu a ostatné faktory tento test nie je odporúčaný (H a j d i n j a k, 2008).

Aktuálnym trendom v molekulovej genetike je výskum nekódujúcich RNA, ako je napr. **mikro RNA** (miRNA). Jednovláknové endogénne molekuly miRNA sú regulátormi gémovej expzie na posttranskripčnej úrovni.

Zmena expzie miRNA má vplyv aj na expziu onkogénov a tumor-supresorových génov. Molekuly miRNA sa vyznačujú okrem špecifických expsioných profilov v nádorovom tkanive aj ďalšími vlastnosťami, napríklad vysokou stabilitou, jednoduchou detekciou, širokým dynamickým rozsahom a koreláciou s už známymi klinicko-patologickými charakteristikami (M a r e k o v á a kol., 2017). Úloha miRNA v patogenéze niektorých nádorových ochorení je dobre preštudovaná, v súvislosti s NMM je známych niekoľko miRNA. Rôzne typy, štádiá a stupne diferenciácie môžu mať unikátny profil mikroRNA expzie (Z a b o l o t n e v a a kol., 2013). Všeobecne sa udáva, že down-regulácia tých mikroRNA, ktorých cieľom je rastový faktor fibroblastov 3 (FGFR3), napríklad miR99a, miR-100, miR101, a miR-145 bola pozorovaná pri vysoko difenencovaných neinvazívnych NMM. Zvýšená expzia niektorých mikroRNA bola pozorovaná pri high grade invazívnych



Obr. 6. Schematické zobrazenie FISH sond a miesta ich hybridizácie na uvedené chromozómy podľa testu UroVysion. (podľa Singh, C., 2017)



Obr. 7. Ilustračný obrázok úpravy miRNA na aktívnu formu (miRISC)

NMM oproti zdravému tkanivu, vrátane miRNA targetovaných na p53, napríklad miR-21 a miR373. Navyše, p53 zároveň suprimuje transkripčné faktory, ktoré iniciujú epitelovo-mezenchymálny prechod cez reguláciu mikroRNA z rodiny miR200 (G u a n c i a l a kol., 2014; S o b o l o v á a kol., 2019).

Napriek intenzívnemu výskumu v tejto oblasti, nebola doteraz detekcia žiadnej známej miRNA oficiálne zaradená do diagnostiky NMM.

ZÁVER

Na neinvazívnu detekciu nádorov močového mechúra zatiaľ neexistuje špecifický laboratórny test, ktorý by bol Európskou urologickou asociáciou akceptovaný a stanovený ako spoľahlivý a odporúčaný ako diagnostický test. Aj napriek tomu, že mnohé markery a metódy poskytovali vyššiu senzitivitu v porovnaní s cytológiou moču, žiadna z nich zatiaľ nebola Európskou urologickou asociáciou zaradená do protokolov na monitoring liečby NMM. Jedným z dôvodov je pomer ceny vyšetrovacej metódy v porovnaní s benefitom, ktorý prináša, ďalej náročnosť niektorých metód na sofistikované laboratórne vybavenie a vysokú odbornosť laboratórnych diagnostikov, či iné dôležité zohľadňované faktory, ktoré zatiaľ neklasifikovali uvedené markery ako odporúčané pre rutinnú klinickú

prax (S c h m i t z - D r ä g e r a kol., 2015).

Je evidentné, že moč je optimálnym neinvazívnym zdrojom proteínov, peptidov, exozómov, DNA, mRNA, miRNA, tRNA, nádorových buniek, ale aj metabolitov s diagnostickým potenciálom. Výskum a vývoj efektívnych, vysoko špecifických a senzitívnych diagnostických testov na detekciu markerov NMM je sťažený veľkou histologickou variabilitou nádorov, ako aj chudobnou a často nešpecifickou symptomatológiou.

Napriek tomu je stále výskum na poli identifikácie a detekcie nádorových markerov v moči veľkou výzvou. Neustále pokračuje práca sústredená na zavádzanie rôznych metód a postupov, ktoré by spĺňali náročné kritéria efektívnej, včasnej a neinvazívnej diagnostiky NMM.

Práca bola podporená grantovým projektom VEGA 1/0372/17.

LITERATÚRA

1. Babjuk, M. a kol. (2002): Qualitative and quantitative detection of urinary human complement factor H-related protein (BTA stat and BTA TRAK) and fragments of cytokeratins 8, 18 (UBC rapid and UBC IRMA) as markers for transitional cell carcinoma of the bladder. *European urology*, 41.1, p. 34–39. doi: 10.1016/S0302-2838(01)00015-X.

Tabuľka 2. Prehľad nádorových markerov detegovateľných v bunkách moču podľa L o k e s h w a r a kol., 2005

Test/Marker	Detegovaný marker	Typ markera	Metóda	Senzitivita [%]	Špecifita [%]
Povrchové antigény buniek					
DD23	185 kDa antigén asociovaný s tumorom	Povrchový antigén	Avidín-Biotín Imunocytochémi	73–100	33–67,5
uCyt+	Karcinoembryonálny antigén	Povrchový antigén	Imunofluorescenčná mikroskopia	38–90	73–80
Genetický materiál					
Mikrosatelit. DNA	Mikrosatelitné markery na chromozómoch	Genomická DNA	DNA PCR	72–97	>95
Telomeráza	hTERT	mRNA	Real Time PCR	83–95	60–70
UroVysion	Zmeny v chromozómoch	Denaturovaná chromozom. DNA	FISH	66–87	>90
miRNA	Nekódujúce RNA	mikro RNA	Real Time PCR	?	?

2. **Babjuk, M. a kol. (2008):** Urinary cytology and quantitative BTA and UBC tests in surveillance of patients with pTapT1 bladder urothelial carcinoma. *Urology*, 71.4, p. 718–722. doi: 10.1016/j.urology.2007.12.021.
3. **Babjuk, M. a kol. (2017):** EAU guidelines on non–muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2016. *European urology*, 71.3, p. 447–461. doi: 10.1016/j.eururo.2016.05.041.
4. **Boman, H., Hans, H., S. T. E. N. Holmäng (2002):** Four bladder tumor markers have a disappointingly low sensitivity for small size and low grade recurrence. *The Journal of urology*, 167.1, p. 80–83. doi: 10.1016/S0022-5347(05)65387-6.
5. **Bonner, R. B. a kol. (1996):** Characterization of the DD23 tumor-associated antigen for bladder cancer detection and recurrence monitoring. Marker Network for Bladder Cancer. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 5.12, p. 971–978. PMID: 8959319.
6. **Bray, F. a kol. (2018):** Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68.6, p. 394–424. doi: 10.3322/caac.21492.
7. **Carlson, Robert H. (2006):** Use of NMP22 Bladder Cancer Assay Increases Rate of Detection of Recurrence. *Oncology Times*, 28(5), p. 14–15. doi:10.1097/01.COT.0000294742.55386.c6.
8. **Gilbert, S.M. a kol. (2003):** Evaluation of DD23 as a marker for detection of recurrent transitional cell carcinoma of the bladder in patients with a history of bladder cancer. *Urology*, 61.3, p. 539–543. doi: 10.1016/S0090-4295(02)02400-7.
9. **Glas, A. S. a kol. (2003):** Tumor markers in the diagnosis of primary bladder cancer. A systematic review. *The Journal of urology*, 169.6, p. 1975–1982. doi: 10.1097/01.ju.0000067461.30468.6d.
10. **Greene, K. L., Berry, A., Konety, B. R. (2006):** Diagnostic utility of the ImmunoCyt/uCyt+ test in bladder cancer. *Reviews in urology*, 8.4, p. 190. PMID: 17192798.
11. **Guancial, E. A., a kol. (2014):** The evolving understanding of microRNA in bladder cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 32. 1. p. 41–41. doi: 10.1016/j.urolonc.2013.04.014.
12. **Hajdinjak, T. (2008):** UroVysion FISH test for detecting urothelial cancers: meta-analysis of diagnostic accuracy and comparison with urinary cytology testing. *Urologic oncology: seminars and original investigations*, 26.6, p. 646–651. doi: 10.1016/j.urolonc.2007.06.002.
13. **Huang, Y. L. a kol. (2015):** Diagnostic accuracy of cytokeratin-19 fragment (CYFRA 21-1) for bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *Tumor Biology*, 36.5, p. 3137–3145. doi: 10.1007/s13277-015-3352-z.
14. **Cheng, Z. Z. a kol. (2005):** Complement factor H as a marker for detection of bladder cancer. *Clinical chemistry*, 51.5, p. 856–863. doi: 10.1373/clinchem.2004.042192.
15. **Jaiswal, P. K., Goel, A., Mital, R. D. (2015):** A molecular biomarker in cancer. *Indian J. Med. Res.*, 141(4), p. 389–397
16. **Jemal, A. a kol. (2011):** Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*, 61.2, p. 69–90. doi: 10.3322/caac.20107.
17. **Leyh, H. a kol. (1999):** Comparison of the BTA stat™ test with voided urine cytology and bladder wash cytology in the diagnosis and monitoring of bladder cancer. *European urology*, 35.1, p. 52–56. doi: 10.1159/000019819.
18. **Lokeshwar, V. B. a kol. (2005):** Bladder tumor markers beyond cytology: International Consensus Panel on bladder tumor markers. *Urology*, 66.6, p. 35–63. doi: 10.1016/j.urology.2005.08.064.
19. **Lopez-Beltran, A., a kol. (2020):** Current and emerging bladder cancer biomarkers with an emphasis on urine biomarkers. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 20.2, p. 231–243. doi: 10.1080/14737159.2020.1699791.
20. **Malkowicz, S. B. (2000):** The application of human complement factor H-related protein (BTA TRAK) in monitoring patients with bladder cancer. *Urologic Clinics of North America*, 27.1, p. 63–73. doi: 10.1016/S0094-0143(05)70235-4.
21. **Mareková, M. a kol. (2017):** Diagnostický potenciál mi-RNA pri progresii uroteliálneho karcinómu. *Laboratórna diagnostika*, p. 11–11.
22. **Margulis, V., Yair L., Shahrokh, F. S. (2008):** Survivin: a promising biomarker for detection and prognosis of bladder cancer. *World journal of urology*, 26.1, p. 59–65. doi: 10.1007/s00345-007-0219-y.
23. **Mbeutcha, A. a kol. (2016):** Current status of urinary biomarkers for detection and surveillance of bladder cancer. *Urologic Clinics*, 43.1, p. 47–62. doi: 10.1016/j.ucl.2015.08.005.
24. **Moussa, O. a kol. (2006):** Evaluation of survivin reverse transcriptase-polymerase chain reaction for noninvasive detection of bladder cancer. *The Journal of urology*, 175.6, p. 2312–2316. doi: 10.1016/S0022-5347(06)00254-0.
25. **Muto, S. a kol. (2014):** Isomorphic red blood cells using automated urine flow cytometry is a reliable method in diagnosis of bladder cancer. *International journal of clinical oncology*, 19.5, p. 928–934. doi: 10.1007/s10147-013-0623-9).
26. **Myers-Irvin, J. M., Van Le, T. S. Van Le, Getzenberg, R. H. (2005):** Mechanistic analysis of the role of BLCA-4 in bladder

- cancer pathobiology. *Cancer research*, 65.16, p. 7145–7150. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1142.
27. **Nisman, B. a kol. (2002):** Evaluation of urine CYFRA 21-1 for the detection of primary and recurrent bladder carcinoma. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 94.11, p. 2914–2922. doi: 10.1002/cncr.10565.
28. **Poulakis, V. a kol. (2001):** A comparison of urinary nuclear matrix protein-22 and bladder tumour antigen tests with voided urinary cytology in detecting and following bladder cancer: the prognostic value of false-positive results. *BJU international*, 88.7, p. 692–701. doi: 10.1046/j.1464-410X.2001.02355.x.
29. **Sánchez-Carbayo, M. a kol. (1999):** Comparative sensitivity of urinary CYFRA 21-1, urinary bladder cancer antigen, tissue polypeptide antigen and NMP22 to detect bladder cancer. *The Journal of urology*, 162.6, p. 1951–1956. doi: 10.1016/S0022-5347(05)68076-7.
30. **Sánchez-Carbayo, M. a kol. (1999):** Initial evaluation of the new urinary bladder cancer rapid test in the detection of transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology*, 54.4, p. 656–661. doi: 10.1016/S0090-4295(99)00195-8.
31. **Sánchez-Carbayo, M. a kol. (2001):** Utility of serial urinary tumor markers to individualize intervals between cystoscopies in the monitoring of patients with bladder carcinoma. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 92.11, p. 2820–2828. doi: 10.1002/cncr.10092.
32. **Sharma, S. a kol. (1999):** Exclusion criteria enhance the specificity and positive predictive value of NMP22* and BTA stat. *The Journal of urology*, 162.1, p. 53–57. doi: 10.1097/00005392-199907000-00014.
33. **Singh, C. (2017):** UROVYSION® FISH Urine Cytology Assessment: Principles and Concepts. *AHDI Florida 2017, Annual Meeting*.
34. **Schmitz-Dräger, B. J. a kol. (2015):** Molecular markers for bladder cancer screening, early diagnosis, and surveillance: the WHO/ICUD consensus. *Urologia internationalis*, 94.1, p. 1–24. doi: 10.1159/000369357.
35. **Schmitz-Dräger, B. J., a kol. (2008):** Immunocytology in the assessment of patients with asymptomatic hematuria. *World journal of urology*, 26.1, p. 31–37. doi: 10.1007/s00345-007-0228-x.
36. **Schroeder, G. L. a kol. (2004):** A side by side comparison of cytology and biomarkers for bladder cancer detection. *The Journal of urology*, 172.3, p. 1123–1126. doi: 10.1097/01.ju.0000134347.14643.ab.
37. **Sobolová, V., Nagy, V. (2019):** Nové neinvazívne molekulárne a fluorescenčné metódy v detekcii nádorov močového mechúra. *Klinická urológia*, 1.19., p. 119–122.
38. **Soukup, V. a kol. (2020):** Risk stratification tools and prognostic models in non—muscle-invasive bladder cancer: a critical assessment from the European Association of Urology Non-muscle-invasive Bladder Cancer Guidelines Panel. *European urology focus*, 6.3, p. 479–489. doi: 10.1016/j.euf.2018.11.005.
39. **Sun, M., Quoc-Dien T. (2015):** Diagnosis and staging of bladder cancer. *Hematology/Oncology Clinics*, 29.2, p. 205–218. doi: 10.1016/j.hoc.2014.10.013.
40. **Van Le, T. S. a kol. (2004):** Functional characterization of the bladder cancer marker, BLCA-4. *Clinical Cancer Research*, 10.4, p. 1384–1391. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-0455-03.
41. **Witjes, J. A. a kol. (2017):** Updated 2016 EAU guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer. *European urology*, 71.3, p. 462–475. doi: 10.1016/j.eururo.2016.06.020.
42. **Zabolotneva, A. A. a kol. (2013):** Characteristic patterns of microRNA expression in human bladder cancer. *Frontiers in genetics*, 3, p. 310–310. doi: 10.3389/fgene.2012.00310.



ANALYTICKÉ MOŽNOSTI ZYMOGRAFIE V KLINICKEJ PRAXI

Večurková, I., Mašlanková, J., Stupák, M.
Ústav lekárskej a klinickej biochémie, UPJŠ LF, Košice

e-mail: marek.stupak@upjs.sk

SÚHRN

V klinickej praxi sa v súčasnosti využíva široké spektrum diagnostických metód, pričom toto spektrum sa neustále vyvíja a prináša nové, inovatívne prístupy. Metódy sú kategorizované do niekoľkých základných skupín, od imunometód až po zobrazovacie techniky. Jednou z elektroforetických metód je technika zymografie, v rámci ktorej existuje viacero odlišených typov. Všeobecne ju však možno opísať ako jednoduchý, citlivý, kvantifikovateľný a funkčný test pre analýzu rozličných biomarkerov.

Kľúčové slová: zymografia, matrixové metaloproteínázy, diagnostika, biomarkery

ABSTRACT

Clinical practice currently uses an extensive spectrum of diagnostic methods. This spectrum is constantly evolving and bringing new, innovative approaches. The methods are categorized into several basic groups, from immunometods to imaging techniques. One of the electrophoretic methods is the zymography technique, from which there are several differentiated types. How-

ever, it can generally be described as a simple, sensitive, quantifiable, and functional test for the analysis of different biomarkers.

Key words: zymography, matrix metalloproteinases, diagnostics, biomarkers

ÚVOD

Biologický výskum využíva rôzne druhy separácie. Na separáciu DNA a RNA sa využíva elektroforéza na agarózovom géli, zatiaľ čo na separáciu zmesi proteínov polyakrylamidová gélová elektroforéza (PAGE). Dvojrozmerná PAGE sa využíva na rozdelenie zmesi proteínov na stovky až tisíce proteínových škvŕn. Na kvantifikáciu je možné porovnať obrázky 2-DE gélov, aby sa odhadla úroveň expresie pre každú škvŕnu proteínu z rôznych vzoriek. Tieto proteínové škvŕny môžu byť následne vyrezané a natrávené špecifickou proteázou, ako je trypsin, a výsledné proteolytické peptidy sekvenované a identifikované hmotnostnou spektrometriou (Pomastowski, Buszewski, 2014). Túto formu 2-DE vynášiel O'Farrell kombináciou denaturačnej izoelektrickej fokusácie (IEF) na SDS-PAGE; a stále ponúka najvyššie rozlíšenie pre gélovú elektroforetickú separáciu proteínov (O'Farrell, 1975). Napriek

vysokej rozlišovacej schopnosti však zostala 2-DE namáhavá a chýbala jej reprodukovateľnosť. Preto si popularitu 2-DE získala až vynálezom imobilizovaného gradientu pH (IPG). IPG vytvára rovnomerný gradient pH, ktorý prekonáva nestabilný gradient pH generovaný amfolytmi nosiča a poskytuje reprodukovateľnú separáciu IEF pri rôznych rozsahoch pH. V priebehu rokov sa vývoj 2-DE neustále vyvíjal. Ďalšou inováciou, ktorá priniesla revolúciu v kvantitatívnej proteomickej analýze, je gélová elektroforéza s dvojrozmerným rozdielom (2D-DIGE). 2D-DIGE je variant 2-DE, v ktorej sa na značenie vzoriek bielkovín pred zmiešaním a použitím rovnakého gélu používajú rôzne fluorescenčné farbivá, čo výrazne zlepšilo reprodukovateľnosť gélu na gél a zvýšilo citlivosť detekcie.

Je dobre známe, že v dôsledku genetických variácií, zstrihu, skrátene, degradácie a posttranslačných modifikácií je možné vytvoriť viac proteoform, z ktorých každá má odlišné biochemické vlastnosti a funkčnosť a v tomto ohľade je 2-DE vhodný nástroj na charakterizáciu proteoform, pretože poskytuje účinnú frakcionáciu intaktných proteínov a umožňuje kvantitatívne hodnotenie proteoform, ktoré by sa inak stratili v dôsledku štiepenia proteínov (Smith, Kelleher, 2013). Je pozoruhodné, že 2-DE gély je možné skladovať v suchom stave, čo umožňuje identifikáciu proteínov po viac ako dvoch desaťročiach (Matsumoto a kol., 2012). Naopak, medzi obmedzenia 2-DE patrí separácia proteínov s extrémnou molekulovou hmotnosťou, pl alebo hydrofóbnosťou (Oliveira a kol., 2014). Taktiež je veľmi častá spoločná migrácia a prekrývajúce sa proteíny v jednej 2-DE gélovej škrvne (Zhana a kol., 2018). Okrem toho je rozlíšenie 2-DE pre vysoko komplexné vzorky proteínov s veľkým dynamickým rozsahom koncentrácií často pomerne nízke, čo sťažuje analýzu málo zastúpených proteínov (Strohkamper a kol., 2016). Preto 2-DE stratila časť svojej príťažlivosti ako proteomickej technika v dôsledku príchodu sofistikovanejších techník. Aj keď v posledných rokoch došlo v technike 2-DE k zásadnému technologickému prelomeniu, vedci prišli s niekoľkými inovatívnymi úpravami a úpravami pôvodnej metódy 2-DE, ktoré otvárajú nové možnosti nových užitočných aplikácií. Napriek skutočnosti, že niektoré z týchto postupov si nezachovávajú typickú kombináciu IEF s SDS-PAGE, všetky využívajú na charakterizáciu proteínov vysoké rozlíšenie a separačnú silu v 2-DE. Medzi tieto techniky zaraďujeme 2-dimenzionálnu zymografiu (2DZ), serologickú analýzu proteómu

(SERPA), 2-dimenzionálnu afinitnú elektroforézu využívajúcu imobilizovaný kov (2D IMAEP) a 3-dimenzionálnu/IEF/SDS-PAGE elektroforézu (3D BN/SDS-PAGE).

Zymografia

Dvojrozmerná zymografia (2DZ) je technika používaná na analýzu aktivity enzýmov na základe degradácie substrátu. Existujú rôzne typy zymografie, ktoré sa líšia z hľadiska oddelenia vzoriek, požiadavky na substrát a metódy vizualizácie. Všetky typy zymografie majú svoj pôvod v želatínovej zymografii (Snook-van Beurden, Vondendenoof, 2005). Proteíny sú separované elektroforézou po denaturácii dodecylsulfátom sodným (SDS) v neredukujúcich podmienkach. K separácii dochádza v polyakrylamidovom géli, s ktorým substrát kopolymerizuje. Počas elektroforézy SDS spôsobí denaturáciu enzýmov, ktoré sa stanú neaktívnymi. Po prebehnutí elektroforézy sa gél premýva neiónovým detergentom Triton X-100 na odstránenie SDS, kedy sa začnú enzýmy čiastočne renaturovať. Následne je gél inkubovaný v príslušnom aktivačnom tlmivom roztoku a dochádza k ich aktivácii (Heussen, Dowdle, 1980). Počas tejto inkubácie, koncentrované, renaturované enzýmy v géli štiepia substrát. Po inkubácii sa gél zafarbí Coomassie® Blue a hydrolytickú aktivitu enzýmov je možné vizualizovať ako jasné pásy oproti modrému pozadiu (Fernandez-Resaca a kol., 1995).

Pri reverznej zymografii, ktorá sa používa na štúdium proteázových inhibítorov, sa vzorka separuje pomocou SDS-PAGE, ktorá bola inkorporovaná ako substrátom, tak aj so špecifickou proteázou, pri ktorej je prítomnosť inhibítorov detekovaná ako tmavé pásy na bielom pozadí. V závislosti na použítom substráte umožňuje zymografia charakterizáciu celého radu enzýmov, ako sú proteázy, lipázy a esterázy (Kwon a kol., 2011; Kurza a kol., 2017). Užitočnosť tejto techniky je ilustrovaná jej širokým uplatnením v množstve štúdií zameraných na charakterizáciu aktívnych enzýmov z cicavcov, rastlín a mikrobov (Wilkesman, Kurza, 2017). Zymografia poskytuje nielen jednoduchý, citlivý a lacný nástroj na semikvantitatívnu analýzu funkčne aktívnych enzýmov, ich aktivity a inhibítorov, ale môže tiež poskytnúť dôležitý prehľad o vlastnostiach enzýmov, ako sú rôzne formy enzýmov, molekulová hmotnosť, prítomnosť fragmentových produktov a komplexná formácia (Vandoren a kol., 2013). Klasická zymografická technika však zlyháva pri

riešení variantov enzýmov, ktoré boli modifikované bez zmien v MW.

Dvojrozmerná zymografia (2DZ) je technika, ktorá kombinuje IEF s konvenčnou substrátovou zymografiou na analýzu vysoko komplexných biologických vzoriek. (Thimona kol., 2008). Využitím výhody 2-D separácie s vysokým rozlíšením so schopnosťou hodnotiť aktívne enzýmy v zymografii umožňuje tento prístup podrobnejšiu analýzu aktívnych proteolytických enzýmov v komplexných proteínových zmesiach. 2DZ je obzvlášť vhodná pre detekciu odlišných izoform želatináz diferencovaných posunom pI, čo uľahčuje identifikáciu zmenenej proteolytickej aktivity, ktorá je základom patologických procesov. (Chena kol., 2015; Chena kol., 2017). Napriek mnohým štúdiám dokumentujúcim, že technika 2DZ je výhodná pre efektívnu analýzu enzýmu s variantmi a aktivitou náboja, existujú jasné výhrady, že nedokáže detegovať malé izoformy enzýmov, enzýmy v malom množstve, enzýmy so slabou aktivitou a tie, ktoré slabo renaturovali.

Zymografia na detekciu matrixových metaloproteináz (MMPs)

Počas želatinovej zymografie je ako proteínový substrát použitá želatína, ktorý sa ľahko hydrolyzuje niekoľkými peptidázami a nemá tendenciu migrovať z rozlišovacieho gélu počas elektroforézy vykonávanej pri 4 °C. Využíva sa najmä na detekciu MMP-2 a MMP-9, nie je však vylúčená detekcia ani iných MMP. Avšak, napríklad pri MMP-1, -8, či -13 je zvýšené riziko, že želatinolytické pásy budú slabé, keďže želatína nie je ich preferovaný substrát. Preto je pre iné typy MMP ideálna modifikácia techniky, najmä inkorporácia vhodného substrátu (napr. kazeínu, kolagénu) pre daný typ MMP do gélu, alebo, ak sa odoberá vzorka z tkaniva, prídanie heparínu počas elektroforézy, čo zvyšuje MMP aktivitu (Yu, Woessner, 2001).

Na separáciu želatináz sa zvyčajne používa 8 % polyakrylamidový gél. Percento akrylamidu a hrúbka separačného gélu sa však môžu líšiť v závislosti od typu, formy a molekulovej hmotnosti MMP. Napríklad na lepšiu vizualizáciu dimérnej formy MMP-9 (~ 200 kDa) alebo na získanie lepšieho rozlíšenia pásov s blízkou molekulovou hmotnosťou (latentná a aktívna forma) by sa mal použiť nižší, 4–6 % roztok polyakrylamidu. Použitím tohto prístupu však môžu byť pásy menej ostré. Na druhej strane, na lepšiu vizualizáciu MMP s nižšou molekulovou hmotnosťou, ako sú MMP-1 a -7, sa môže použiť vyšší 10–12 % roztok

polyakrylamidu. Gély je možné pripraviť vopred a skladovať ich pri teplote 4 °C počas 2–3 týždňov bez výrazného vplyvu na rozlíšenie (Ren a kol., 2018).

Aby sa proteíny vedeli dostať cez gél z katódy na anódu, mal by mať gélový systém a „running“ tlmivý roztok optimálne pH (hodnoty by si mali byť čo najbližšie; rovnako sa to týka aj iónovej sily), pretože to môže ovplyvniť mobilitu zložiek gélového systému v porovnaní s proteínmi. Napríklad, glycín môže v závislosti od pH existovať v 3 stavoch náboja. Kontrola náboja glycínu v rozličných tlmivých roztokoch je kľúčom k mobilite proteínov v géli. Všetky proteíny v géli majú elektroforetickú mobilitu, ktorá je medzi mobilitou glycínu a Cl⁻, takže keď glycín a Cl⁻ prechádzajú cez jamku so vzorkou, proteíny sú koncentrované v úzkej zóne medzi dvoma frontami. Tento proces pokračuje cez „stacking“ gél, kým proteíny nedorazia k separačnému gélu. Tam sa pH mení na 8,8. Pri tomto pH sa glycín stáva väčšinou negatívne nabitým a migruje oveľa rýchlejšie ako proteíny. Keď glycín predbieha proteíny, tie sa koncentrujú vo veľmi úzkom rozhraní „stacking“ a separačného gélu. Pretože má separačný gél vyššiu koncentráciu akrylamidu, spomaľuje proteíny podľa ich molekulovej hmotnosti a tým sa začína oddeľovanie proteínov. Ak dôjde k zmene pH niektorého z pufrův alebo gélového systému, bude mobilita proteínov ovplyvnená v oblastiach s „nesprávnym“ pH. To vysvetľuje zvláštne migračné správanie proteínov a deformovaný tvar pásov v niektorých géloch (Garfin, 2009).

Dôležité je tiež myslieť na teplotu. Gély sa počas priebehu testovania musia udržiavať studené, inak by mohlo dôjsť k skresleniu výsledku a tvorbe vlnitých pásov. Umiestenie aparatury do ľadu by malo minimalizovať prehriatie systému a deformáciu gélu (Ren a kol. 2018).

Inkubačný čas gélu v tlmivom roztoku je rozhodujúci pre správnu renaturáciu a proteolýzu. Vzhľad želatinolytických pásov závisí od enzymatickej aktivity a preto zmena inkubačnej doby ovplyvní ich intenzitu. Na detekciu pásov môže stačiť inkubácia pri 37 °C počas 4 hodín. Vo väčšine prípadov je však potrebná inkubácia cez noc (16 až 18 hodín), aby sa dosiahlo lepšie rozlíšenie a reprodukovateľné výsledky. Pokiaľ pásy zostávajú ťažko viditeľné, môže byť potrebná inkubácia dokonca až na 72 hodín (Garfin, 2009).

ZÁVER

Zymografia predstavuje pomerne jednoduchú, rýchlu a lacnú analytickú metódu, ktorej môžu byť podrobené všetky druhy biologických vzoriek. Berúc do úvahy skutočnosť, že mnohé patologické stavy organizmu sú charakteristické chýbajúcim a/alebo nesprávne fungujúcim, alebo na druhej strane aktívnym regulačným proteínom, narastá význam zymografie ako vhodnej diagnostickej metódy pri detekcii biomarkerov rozličných chorobných stavov. Vďaka svojej vysokej citlivosti poskytuje kvantifikovateľné výsledky. Zostáva dúfať, že sa začne čoraz intenzívnejšie vyskytovať v klinickom skríningu a bude jej pripisovaná záslužná dôležitosť.

LITERATÚRA

1. Fernandez-Resa, P. a kol. (1995) "Enhanced detection of casein zymography of matrix metalloproteinases", *Analytical biochemistry*, 224, p. 434 – 435. doi: 10.1006/abio.1995.1063.
2. Garfín, D. (2009) "One-dimensional gel electrophoresis", *Methods in enzymology*, 182, p. 425 – 441. doi: 10.1016/S0076-6879(09)63029-9.
3. Heussen, C. a Dowdle, E. (1980) "Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates", *Analytical biochemistry*, 102, p. 196 – 202. doi: 10.1016/0003-2697(80)90338-3.
4. Chen, S. a kol. (2015) "Two-Dimensional zymography differentiates gelatinase isoforms in stimulated microglial cells and in brain tissues of acute brain injuries", *PLoS One*, 10, e0123852. doi: 10.1371/journal.pone.0123852.
5. Chen, S. a kol. (2017) "Examination of gelatinase isoforms in rodent models of acute neurodegenerative diseases using two-dimensional zymography", *Methods in molecular biology*, 1626, p. 147 – 155. doi: 10.1007/978-1-4939-7111-4_13.
6. Kurz, L. a kol. (2017) "Sequential detection of thermophilic lipase and protease by zymography", *Biotechnology letters*, 1626, p. 271 – 277. doi: 10.1007/978-1-4939-7111-4_25.
7. Kwon, M. a kol. (2011) "Synthesis activity-based zymography for detection of lipases and esterases", *Biotechnology letters*, 33, p. 741 – 746. doi: 10.1007/s10529-010-0485-4.
8. Matsumoto, H. a kol. (2012) "Protein identification on archived 2-D gels", *Methods in Molecular Biology*, 869, p. 305 – 308. doi: 10.1007/978-1-61779-821-4_25.
9. O'Farrell, P. (1975) "High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins", *The Journal of Biological Chemistry*, 250, p. 4007 – 4021.
10. Oliveira, B. a kol. (2014) "2DE: the phoenix of proteomics", *Journal of Proteomics*, 104, p. 140 – 150. doi: 10.1016/j.jprot.2014.03.035.
11. Pomastowski, P. a Buszewski, B. (2014) "Two-dimensional gel electrophoresis in the light of new developments", *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 53, p. 167 – 177. doi: 10.1016/j.trac.2013.09.010.
12. Ren, Z. a kol. (2018) "Zymography as a Research Tool in the Study of Matrix Metalloproteinase Inhibitors", *Methods in molecular biology*, 1626, p. 79 – 102. doi: 10.1007/978-1-4939-7111-4_8.
13. Smith, L. a Kelleher, N. (2013) "Consortium for Top Down Proteomics., Proteoform: a single term describing protein complexity", *Nature Methods*, 10, p. 186 – 187. doi: 10.1038/nmeth.2369.
14. Snoek- van Beurden, P. a Von den Hoff, J. (2005) "Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors", *Biotechniques*, 38, p. 73 – 83. doi: 10.2144/05381RV01.
15. Strohkamp, S. a kol. (2016) "Possibilities and limitations of 2-DE-based analyses for identifying low-abundant tumor markers in human serum and plasma", *Proteomics*, 16, p. 2519 – 2532. doi: 10.1002/pmic.201600154.
16. Thimon, V. a kol. (2008) "One- and two-dimensional SDS-PAGE zymography with quenched fluorogenic substrates provides identification of biological fluid proteases by direct mass spectrometry", *Analytical Biochemistry*, 375, p. 382 – 384. doi: 10.1016/j.ab.2007.12.026.
17. Vandooren, J. a kol. (2013) "Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes", *Nature Methods*, 10, p. 211 – 220. doi: 10.1038/nmeth.2371.
18. Wilkesman, J. a Kurz, L. (2012) "Advances in zymography techniques and patents regarding protease analysis", *Recent Patents on Biotechnology*, 6, p. 106 – 114. doi: 10.2174/187220812801784678.
19. Yu, W. a Woessner, J. (2001) "Heparin-enhanced zymographic detection of matrilysin and collagenases", *Analytical biochemistry*, 293, p. 38 – 42. doi: 10.1006/abio.2001.5099.
20. Zhan, X. a kol. (2018) "How many proteins can be identified in a 2DE gel spot within an analysis of a complex human cancer tissue proteome? ", *Electrophoresis*, 39, p. 965 – 980. doi: 10.1002/elps.201700330.



Vážené kolegyně, vážení kolegovia,

obraciame sa na Vás s výzvou o spoluprácu pri realizácii projektu v rámci medzinárodnej iniciatívy Choosing wisely alebo Vyberajme rozumne.

Cieľom je upozorniť na nevhodné postupy pri indikácii laboratórnych vyšetrení, s ktorými sa stretávame vo svojej praxi. V princípe sa môže jednať o dve situácie:

- Vyšetrenie sa požaduje často, aj keď v danej klinickej situácii nie je opodstatnené
- Vyšetrenie sa požaduje minimálne, aj keď v danej situácii môže výrazne prispieť k zefektívneniu diagnosticko-terapeutického procesu
- Výbor SSKB v prvom kole vybral 35 odporúčaní. Druhé kolo je realizované formou ankety, ktorá dáva priestor na vyjadrenie širšej odbornej verejnosti. Preto Vás prosíme o vyplnenie krátkeho dotazníka, ktorý nájdete tu.

Na základe výsledku ankety vyberie výbor SSKB 5 najrelevantnejších odporúčaní, ktoré budú následne odkomunikované v rámci SSKB i s klinickými kolegami (odborné kongresy a periodiká, e-learning a iné).

Viac informácií o iniciatíve Choosing wisely a ďalšie príklady odporúčaní je možné nájsť aj na stránke <https://www.choosingwisely.org/clinician-lists/>

Hlasovať môžete do 31. 12. 2020.

Výbor SSKB