



LABORATÓRNA DIAGNOSTIKA

Slovenská spoločnosť klinickej biochémie
Slovak Society of Clinical Biochemistry

Recenzovaný časopis pre pracovníkov diagnostických laboratórií

Číslo 2/2021
Ročník XXVI.

Laboratórna Diagnostika
Vydáva Slovenská spoločnosť klinickej biochémie pri SLS
Cukrová 2373/3, 811 08 Bratislava
Evidenčné číslo periodickej tlače EV 5929/20
ISSN 2729-9201 (online)
Vychádza: 2-krát ročne



LABORATÓRNA DIAGNOSTIKA

Slovak Society of Clinical Biochemistry
Recenzovaný časopis pre pracovníkov diagnostických laboratórií

Číslo 2/2021

Ročník XXVI.

PRESEDA REDAKČNEJ RADY

Hedviga Pivovarníková

ODBORNÝ REDAKTOR

Oliver Rác

REDAKČNÁ RADA

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

Laboratórna Diagnostika
Vydáva Slovenská spoločnosť klinickej biochémie pri SLS
Cukrová 2373/3, 811 08 Bratislava
Evidenčné číslo periodickej tlače EV 5929/20
ISSN 2729-9201 (online)
Vychádza: 2-krát ročne

OBSAH

IN MEMORIAM

MUDr. ANNA KOVÁČOVÁ	4
---------------------------	---

ÚVODNÍK

PRÍHOVOR PREZIDENTKY SSKB	6
---------------------------------	---

Pivovarníková Hedviga, Sečník Peter, Ďurovcová Eva, Magula Daniel, Rácz Oliver, Heriban Vladimír,

Kačániová Mária, Lepejová Katarína, Netriová Jana, Balla Ján, Štefanec František, Hvozdovičová Beáta:

Choosing Wisely: Odporúčania Slovenskej spoločnosti klinickej biochémie pre racionálnu indikáciu

laboratórnych vyšetrení	10
-------------------------------	----

Valko-Rokytovská Marcela, Azariová Martina, Salayová Aneta, Šimková Jana, Milkovičová Mária,

Očenáš Peter: Možnosti diagnostiky celiakie.....	14
---	----

Milkovičová Mária, Šimková Jana, Valko-Rokytovská Marcela:

Lymfická borelióza a jej diagnostika.....	22
---	----

Hornáková Lenka, Ďurfinová Monika: Potenciálne nové markery predikcie komplikácií

a priebehu ochorenia Covid-19	31
-------------------------------------	----

Magula Daniel, Vaverková Gabriela, Kováčová Darina, Lievajová Vladimíra, Vinklerová Silvia:

Využitie niektorých laboratórnych parametrov pre odhad prognózy u hospitalizovaných pacientov

s COVID-19 – retrospektívna analýza 304 prípadov	41
--	----

Čuchráč Lukáš, Mydlárová-Blašáková Marta, Firment Jozef, Šimonová Jana, Bernasovská Jarmila,

Janka Vašková: Primárne výsledky skrínungu polymorfizmov plazmatickej cholinesterázy

zodpovedných za jej zníženie aktivity	54
---	----

Klukkanová Jana, Vašková Janka:

Rizikové faktory parodontitídy	60
--------------------------------------	----

Oravec Stanislav, Potočárová Mária, Kováčová Eva, Bulas Jozef:

Statíny a fibráty v liečbe dyslipoproteínémie u liečených hypertonikov	67
--	----

Schwarzová Marianna, Fatrcová-Šramková Katarína: Porovnanie point-of-care analyzátoru s konvenčnými

laboratórnymi metódami pre stanovenie lipidov	74
---	----

Večurková Ivana, Stupák Marek, Švecová Monika, Dubayová Katarína, Mašlanková Jana: Optimalizácia

metodik SDS-PAGE a želatínovej zymografie na rýchlu proteomickú analýzu pacientov	83
---	----

Lamancová Petra, Urdzik Peter, Toporcerová Silvia, Kuncová Barbora, Urban Peter, Rabajdová Miroslava:

Sledovanie exprese ErbB2 amplicónu vzhľadom na úspešnosť IVF procesu	91
--	----

Anotácie odbornej literatúry	95
---	-----------

Výber z noviniek – poznámky a recenzie odborného redaktora

prof. MUDr. Oliver Rácz, CSc.	97
------------------------------------	----

CONTENT

ABSTRACTS

Pivovarníková Hedviga, Sečník Peter, Ďurovcová Eva, Magula Daniel, Rácz Oliver, Heriban Vladimír, Kačániová Mária, Lepejová Katarína, Netriová Jana, Balla Ján, Štefanec František, Hvozdovičová Beáta: Choosing Wisely: SSKB recommendations for the rational indication of laboratory tests	10
Valko-Rokytovská Marcela, Azariová Martina, Salayová Aneta, Šimková Jana, Milkovičová Mária, Očenáš Peter: Possibilities of coeliac disease diagnosis.....	14
Milkovičová Mária, Šimková Jana, Valko-Rokytovská Marcela: Lyme borreliosis and its diagnostics	22
Hornáková Lenka, Ďurfinová Monika: New potential markers for predicting the complications and course of Covid-19.....	31
Magula Daniel, Vaverková Gabriela, Kováčová Darina, Lievajová Vladimíra, Vinklerová Silvia: The use of some laboratory parameters for prognosis estimation in hospitalized patients with COVID-19— retrospective analysis of 304 cases	41
Čuchráč Lukáš, Mydlárová-Blašáková Marta, Firmont Jozef, Šimonová Jana, Bernasovská Jarmila, Janka Vašková: Primary results of screening for plasma cholinesterase polymorphisms responsible for its reduced activity	54
Kluknavská Jana, Vašková Janka: Risk factors of periodontitis	60
Oravec Stanislav, Potočárová Mária, Kováčová Eva, Bulas Jozef: Statins and fibrates in the treatment of dyslipoproteinemia in patients with treated hypertension.....	67
Schwarzová Marianna, Fatrcová-Šramková Katarína: Comparison of a point-of-care analyzer with clinical diagnostic laboratory methods for the determination of lipids.....	74
Večurkovská Ivana, Stupák Marek, Švecová Monika, Dubayová Katarína, Mašlanková Jana: Optimization of SDS-PAGE and gelatin zymography methods for rapid proteomic analysis of patients	83
Lamancová Petra, Urdzik Peter, Toporcerová Silvia, Kuncová Barbora, Urban Peter, Rabajdová Miroslava: Monitoring the expression of ErbB2 amplicon concerning the success of the IVF process.....	91



IN MEMORIAM



S ľútosťou oznamujeme, že 27. júna 2021 nás, po dlhšej chorobe, opustila naša kolegyňa

MUDr. Anna Kováčová

dlhoročná členka SSKB, primárka Oddelenia klinickej biochémie Univerzitnej nemocnice L. Pasteura v Košiciach a neskôr zástupkyňa medicínskeho riaditeľa v spoločnosti Medirex, a.s. v Košiciach. Pripájam sa k tejto smutnej správe niekoľkými faktami a spomienkami z našej paralelnej a čiastočne aj spoločnej profesionálnej cesty.

MUDr. Anna Kováčová, alebo Anka, ako sme ju nazývali, sa narodila 6. 1. 1954 v Toryskách pri Levoči ako najstaršia sestra zo šiestich súrodencov. Veľká ale súdržná rodina ju ovplyvnila na celý život a spojenie s rodným krajom neprerušila ani po dlhoročnom pôsobení v Košiciach. Po absolvovaní Lekárskej fakulty UPJŠ v r. 1978 nastúpila ako mladá absolventka na infekčné oddelenie NsP v Levoči a toto obdobie poznačilo jej klinickú orientáciu aj v priebehu jej ďalšej profesionálnej cesty. V roku 1980 nasledovala svojho manžela do Košíc a začala pracovať ako lekárka samostatne pracujúca na OKB vo Fakultnej nemocnici s poliklinikou na Tr. SNP 1. Pod vedením vtedajšieho primára MUDr. Havriša sa jej v prostredí veľkej fakultnej nemocnice dostalo príležitosti preniknúť nielen do tajov klinicko-biochemických metód, ale stala sa najmä súčasťou širšieho lekárskeho medziklinického kolektívu. Jej odborný záujem sa sústredil najmä na nefrológiu, po-

ruchy vnútorného prostredia a neskôr na lipidológiu. Spoznali sme sa ako mladé lekárky na krajských seminároch a neskôr sme sa stretávali v jednej internátnej izbe bratislavského „doškoľovaku“ počas študijných pobytov pred oboma atestáciami z klinickej biochémie. Už vtedy mi imponovala jej priamosť, úprimnosť, pragmatickosť, snaha využiť všetok čas na štúdium, na konci ktorého bol návrat domov k dvom malým dcérkam.

Po atestácii sme absolvovali spoločne aj študijný pobyt u primára MUDr. Bedřicha Nejedlyho v Kladne, autora základnej monografie „Vnitřní prostředí, klinická biochemie a praxe“, ktorý bol propagátorom spolupráce laboratória s intenzívnymi oddeleniami, nutričnej podpory pacientov a ich metabolického monitorovania. Inšpirovaná týmto pobytom MUDr. Kováčová prehĺbila spoluprácu s oddelením anesteziológie a intenzívnej medicíny ako ordinárka pre poruchy vnútorného prostredia. Stala sa na niekoľko rokov aj úspešnou ústavnou dietologičkou UNLP.

Popri práci lekára OKB a medicínskeho konzultanta začala spolupracovať aj so Strednou zdravotníckou školou v Košiciach a po desaťročia sa podieľala na vzdelávaní zdravotníckych laborantov.

V roku 1993 bola menovaná do funkcie primárky OKB, v ktorej zotrvala až do roku 2005. Obdobie šéfovania MUDr. Kováčovej prinieslo kvalitatívny rast pracoviska. Svojím ľudským prístupom, neúnavnej aktivite a výchovnému pôsobeniu sa jej podarilo vybudovať vysokokvalifikovaný a humánne založený kolektív, v ktorom spolupracovali všetky kategórie zastúpené v laboratóriu – lekári, nelekári, zdravotní laboranti aj sanitári. Vďaka svojim odborným a manažérskym a ľudským kvalitám zastávala v rokoch 1998–2002 post námestníčky riaditeľa UNLP pre spoločné vyšetrovacie a liečebné zložky.

Poslednú etapu svojej profesionálnej dráhy prežila v laboratórnej spoločnosti Medirex, a.s., kde v roku 2005

prebrala žezlo zástupcu medicínskeho riaditeľa pre východné Slovensko. Pod jej vedením vzniklo v Košiciach unikátne spojenie mnohých odborov laboratórnej medicíny postavené na dôvere v ľudský potenciál zamestnancov a na špičkovej technickej vybavenosti. Ani po odchode do dôchodku v roku 2014 nezvesila svoju odbornosť na klinicu. Od roku 2017 stála pri projektovaní, zariaďovaní a uvádzaní do činnosti laboratória vo Východoslovenskom ústave srdcovocievnych chorôb v Košiciach. Všetci jej kolegovia si navždy budú pamätať ľudskosť, veľké sociálne cítenie, empatiu, profesionalizmus, ako aj jej pripravenosť pomáhať vždy, ak to niekto potreboval. Veľkým dôkazom jej povahy je množstvo dlhotrvajúcich priateľstiev, ktoré si za svoj život vytvorila.

Žiadna zo spomenutých funkcií ju však nezmenila, zostala rovnaká ako radový zamestnanec, primárka, námestníčka, manažérka oddelenia... Rovnaká napriek všetkej zodpovednosti, dlhšej pracovnej dobe a pribúdajúcim povinnostiam. Nebolo ľahké popri tom všetkom zostať aj dobrou mamou a manželkou v jednej osobe. Mnohokrát som bola svedkom jej výčitiek, o koľko viac času mohla venovať svojim dvom milovaným dcéram – Lenke a Barbore aj manželovi, ktorý ju vždy podporoval. Som si istá, že osobný príklad ich mamy, jej pracovitosť, zodpovednosť a hlad po nových vedomostiach, slušnosť a ľudskosť museli mať len pozitívny vplyv na ich výchovu a postoj k životu.

Nemožno nespomenúť jej angažovanosť v rámci Slovenskej spoločnosti klinickej biochémie, jej publikačnú činnosť a výrazný podiel na vzdelávaní odborníkov v medicíne – či už v rámci špecializačnej prípravy lekárov, medicínikov aj študentov SZŠ v Košiciach. Od roku 2007 sa datuje jej spolupráca s Lekárskou fakultou UPJŠ, kde stála pri začiatkoch pregraduálnej výučby klinickej biochémie. Je autorkou a spoluautorkou desiatok odborných článkov a vzdelávacích prednášok v rámci odborných podujatí.

Dôkazom jej spoločenského ocenenia je, že v roku 2015 bola vydavateľstvom British Publishing House zaradená do Encyklopédie osobností Českej a Slovenskej republiky.

Anka bola žena praktických rozhodnutí a činov. Nestála o osobnú prezentáciu; možno preto ju nebolo tak často vidieť na odborných podujatiach alebo kongresoch. Ak sa však už niečoho zúčastnila, jej názor a postoj k problematike bolo jasne počuť. Škoda, že takíto odborníci sa nám pomaly z odboru vytrácajú... Jej veľkou zásluhou je, že počas celého svojho pôsobenia v odbore podporovala a aktívne sa podieľala na získavaní a výchove mladých lekárov pracujúcich v klinickej biochémii, čo je s ohľadom na zmeny v laboratórnej medicíne uplynulých desaťročí záslužný a nasledovania hodný čin.

Milovala ľudové piesne a tance, čítanie kvalitnej literatúry, ručné práce. Do svojej záhrady, ktorú neustále vylepšovala, vložila neskutočne veľa času, lásky a energie. Jej vášňou bolo cestovanie a spoznávanie neobjavených miest na Slovensku aj v zahraničí. Najmä východ Slovenska mala dôkladne prechodený a bola jeho propagátorkou. Na dôchodku s manželom objavili čaro spoločenského tancu a pravidelne navštevovali jeho kurzy. Vždy sa živo zaujímal o veci verejné vrátane politickej scény, ktoré často živo a výstižne komentovala.

Odišla však priskoro - tešila sa na dôchodok a mala veľké plány, ako si bude užívať po rokoch venovaných práci voľný čas, rodinu, vnúčika... A odrazu tá správa, že je vážne chorá! Najskôr sme nechceli uveriť tomu, že by sa nemala vyliečiť, ale postupne sme so smútkom pozorovali, ako si choroba odkrajuje z jej krehkého tela.

Chýba nám. Chýba nám jej hlas, úsmev, jej rady, priateľstvo. V našich spomienkach však bude žiť skvelá priateľka, šéfka, kolegyňa, odborníčka. Sme vďační za čas, ktorý sme spolu zdieľali.

Češť jej pamiatke!

Eva Ďurovcová
člen výboru SSKB



Laboratórna Diagnostika, XXVI, 2, 2021: 6–8

ÚVODNÍK

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

Tento príspevok už čítate na sklonku roka 2021 a zamýšľate sa nad jeho rýchlym behom, nad udalosťami, ktoré priniesli mnoho zmien aj príbehov nielen v pracovnej oblasti, ale aj v rodinnom kruhu tých najbližších, priateľov a známych.

V obsahu nového čísla časopisu *Laboratórna diagnostika* 2/2021 mi dovoľte zhrnúť aktivity našej odbornej spoločnosti za uplynulé obdobie.

Koncom **apríla 2021** sme ako odborná spoločnosť obdržali osobné pozvanie na individuálne stretnutie vyhradené pre Slovensko od p. Evgenije Homšak (Profession Committee, Chair EFLM) za účelom prediskutovania nových výhod, ktoré ponúka EFLM Academy (Invitation for an individual ZOOM meeting to present the „EFLM Academy membership benefits“).

Na tomto mítingu, ktorý sa konal 11. 5. 2021 sa zúčastnili zástupcovia troch krajín – ČR, Poľsko a Slovensko.

Prezentácia sa týkala vysvetlení výhod, ktoré prináša skupinová registrácia do EFLM Academy a práve túto formu predsedníctvo EFLM preferuje, pretože poskytuje viac výhod než individuálna registrácia. Našou úlohou by mala byť propagácia na národných odborných webových stránkach. Z prezentovaného prehľadu má SR aktuálne sedem členov EFLM Academy, ČR dvoch členov a Poľsko iba jedného člena.

Takýto prístup skupinovej registrácie by mal byť pre jednotlivé národné spoločnosti jednoduchší. Na webovej stránke SSKB je opäť zverejnené odporúčanie na skupinové prihlásenie.

EFLM (Európska federácia laboratórnej medicíny) sa usiluje o skupinové registrácie jednotlivých národných

odborných spoločností aj preto, že takto sa môžeme stať silnou organizáciou. EFLM to odporúča, nenariaďuje a vysvetľuje.

Od predchádzajúceho webinára ubehol takmer jeden rok. Konal sa v rámci Cyklu vzdelávacích webinárov realizovaný Slovenskou spoločnosťou klinickej biochémie a s podporou edukačného grantu fy Roche ako Webinár I. časť SARS-CoV-2 a in Vitro Diagnostika. Bolo to presne 1. 7. 2020.

Po roku reálnych skúseností s koronavírusom a jeho diagnostikou sme sa opäť stretli na ďalšom **webinári** s veľmi aktuálnou témou „Ako interpretovať výsledky laboratórnych vyšetrení na COVID-19“, realizovaného SLK, Slovenskou spoločnosťou iných zdravotníckych pracovníkov, Slovenskou spoločnosťou klinickej biochémie a s podporou edukačného grantu partnerov Roche a Ewopharma, ktorý sa konal **3. 6. 2021**.

Pri indikácii akéhokoľvek (laboratórneho) vyšetrenia, by sme mali vyberať rozumne ako to aj odporúča kampaň „Choosing wisely“. Aj pred vyšetrením prítomnosti protilátok na SARS-CoV-2 po očkovaní by sme mali poznať odpoveď na dve otázky: „Čo očakávame od vyšetrenia?“ a „Aký bude ďalší medicínsky postup?“. Ak poznáme odpovede, laboratórne vyšetrenie môžeme považovať za odôvodnené. K odpoveďiam na spomínané otázky nás dovedli a pomohli zaujímavé a vysoko aktuálne témy interpretácie laboratórnych vyšetrení na COVID-19 z pohľadu rôznych odborností, ktoré na uvedenom webinári odzneli.

Dňa **9. 6. 2021** sa konal online **EFLM „General meeting“**, na ktorom bolo registrovaných 56 účastníkov.

V úvode sa prihovorila prof. Ana-Maria Simundic, prezidentka EFLM s poďakovaním všetkým (aj SSKB), ktorí odoslaním dotazníka s návrhmi na zlepšenie činnos-

ti EFLM, ale aj popísaním „slabších“ stránok činnosti EFLM veľmi výrazne pomohli členom exekutívy EFLM zlepšiť svoju činnosť na nasledujúce obdobie, čo predstavia aj v pláne jednotlivých bodov. Všetci výkonní pracovníci EFLM predstavili svoju odbornú činnosť za uplynulé obdobie.

Na záver tohto stretnutia sa predstavili **dvaja kandidáti na funkciu prezidenta EFLM** – elect, a to prof. Michel R. LANGLOIS (Belgicko) a prof. Mario PLEBANI (Taliansko).

Dôraz bol kladený hlavne na ďalšie vzdelávanie, mladú generáciu do 35 rokov a jej podporu, priamy kontakt s jednotlivými národnými spoločnosťami, význam registrovania väčších skupín do EFLM Academy a jej výhody pre jednotlivých členov, etc.

Bolo cítiť nový závan, iskru, energiu, intenzitu do nových aktivít, nakoľko sme veľa zameškali z objektívnych dôvodov a chcem trochu uveriť, že aj v našej NS sa to trochu týmto dňom opäť „nakopne“. Či sa nám podarí „strhnúť“ aj členskú základňu, ukáže čas. Urobme preto aspoň my maximum, čo sa dá, veď každou novou aktivitou a štúdiom sa posúvame a snáď vlastným príkladom a iniciatívou sa pridá k nám ten, kto chce tiež niečo nezištne zlepšiť v kvalite celého laboratórneho procesu.

Dňa **10. 6. 2021** sa konalo online (Teams) zasadnutie výboru SSKB. Zápisnica je zverejnená na www.sskb.sk. Hlavným bodom okrem iných tém, bola a je intenzívna príprava kongresu v roku 2022.

Slovenská spoločnosť klinickej biochémie, Slovenská spoločnosť pre laboratórnu medicínu, Slovenská hematologická a transfuziologická spoločnosť, Slovenská spoločnosť alergológie a klinickej imunológie a Slovenská spoločnosť lekárskej genetiky na základe iniciatívy SSKB predložili spoločne dňa 27. 06. 2021 ministrom zdravotníctva SR výzvu na časový odklad účinnosti Nariadenia európskeho parlamentu a rady (EÚ) 2017/746 z 5. apríla 2017 (EÚ) 2017/746 o diagnostických zdravotníckych pomôckach in vitro a o zrušení smernice 98/79/ES a rozhodnutia Komisie 2010/227/EÚ.

Na našu výzvu na odklad účinnosti spomínaného nariadenia EÚ reagovali všetky oslovené odborné laboratórne spoločnosti s výnimkou Slovenskej spoločnosti klinickej mikrobiológie.

Autori výzvy sú presvedčení, že je potrebné dosiahnuť odklad účinnosti nového nariadenia EP a Rady 2017/746 o diagnostických zdravotníckych pomôckach in vitro tak,

ako tomu bolo pri nariadení (EÚ) 2017/745 o zdravotníckych pomôckach. Kvôli pandémie COVID sa implementácia nariadenia (EÚ) 2017/745 musela odložiť o jeden rok. Rovnaký postup autori výzvy požadujú aj v prípade nariadenia (EÚ) 2017/746 o diagnostických zdravotníckych pomôckach in vitro.

Dňa 20. 7. 2021 obdržali zástupcovia všetkých uvedených odborných spoločností odpoveď od Pharm-Dr. Ing. Ivony Maloveckej, PhD. poverenej vykonávaním funkcie generálnej riaditeľky Sekcie farmácie a liekovej politiky MZ SR. Ak na programe zasadnutia ministrov zdravotníctva členských štátov Európskej únie (EPSCO) bude táto problematika predmetom rokovania, Ministerstvo zdravotníctva SR bude o obsahu výzvy na odklad účinnosti nariadenia (EÚ) 2017/746 na tomto zasadnutí účastníkov zasadnutia EPSCO informovať.

V súvislosti s periodickým vydávaním nášho odborného časopisu **Laboratórna diagnostika**, by som opätovne chcela osloviť a poprosiť všetkých členov SSKB na publikovanie v uvedenom odbornom časopise. Redakcia časopisu víta celý rad možných foriem publikácií: kazuistiky, pôvodné práce, prehľadové články, rôzne zaujímavosti edukatívneho charakteru atď.

19. októbra 2021 o 14:00 hod. sa uskutočnilo mimoriadne online valné zhromaždenie EFLM. Cieľom stretnutia bola **voľba nového prezidenta EFLM**.

V rokoch 2022–2023 bude pôsobiť ako zvolený prezident a následne v rokoch 2024–2025 bude pôsobiť ako výkonný prezident EFLM. Schôdza a hlasovanie sa uskutočnili on-line za nasledujúcich podmienok:

- Na stretnutí mal byť prítomný iba jeden zástupca za národnú spoločnosť, osobou určenou na hlasovanie bol národný reprezentant; toto malo optimalizovať a skrátiť čas umiestnenia osôb, ktoré nie sú oprávnené voliť, do čakárne (prezident SSKB);
- Stretnutie bolo zaznamenané;
- Hlasovanie bolo anonymné;
- Bola potrebná predbežná registrácia na stretnutie;
- Účastníci počas hlasovania museli nechať počítačovú kameru otvorenú (aby sa zaistila zhoda mena/e-mailu ručne zadaného v programe Zoom).

Ako obvykle, na podporu svojich kandidátov apelovali emailami prezidenti oboch národných spoločností, ktoré kandidátov na prezidenta EFLM nominovali.

Prof. Mario Plebani (Taliansko) je na celom svete veľmi známy svojimi aktivitami hlavne v oblasti laboratórnych chýb a bezpečnosti pacienta. Bol prezidentom Federácie talianskych spoločností laboratórnej medicíny, Medzinárodnej spoločnosti enzymológie, je talianskym zástupcom v Európskej akreditácii, šéfredaktorom časopisu *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* a časopisu *Diagnosis (Dx)*. Veľmi často prednáša a publikuje (više 1300 pôvodných prác, takmer tisíc posterov, 53 kapitol v 10 monografiách, 80 prednášok na medzinárodných fórach).

Prof. Michel R. Langlois (Belgicko) je aktívny hlavne na poli lipidov a kardiálnych markerov. Bol prezidentom Belgickej kráľovskej spoločnosti klinickej chémie a je predsedom dvoch pracovných skupín EFLM. Je autorom 120 pôvodných publikácií, 7 kapitol v monografiách, členom redakčnej rady časopisu *Clinica Chimica Acta (CCA)*. Napísal osobný email národným spoločnostiam, v ktorom uvádza, že ho viac ako pred 10 rokmi inšpiroval jeho predchodca prof. Vic Blaton (zakladateľ a bývalý prezident EFLM), aby sa pridal k rodine EFLM. Odvtedy získal viac ako 10-ročné skúsenosti a porozumenie cieľom a aktivitám EFLM. EFLM považuje za kľúčovú organizáciu s vedúcou pozíciou v laboratórnej medicíne. Musí to byť vedecký a odborný orgán, ktorý bude vydávať odporúčania, schvaľovať usmernenia, organizovať vzdelávanie a odbornú prípravu, podporovať harmonizáciu a normalizáciu v európskych krajinách a ukotví úlohu špecialistov laboratórnej medicíny v zdravotníctve. Bolo by mu cťou byť zvolený na túto dôležitú úlohu, ktorej by slúžil ako zvolený prezident v rokoch 2022–2023 (a ako výkonný prezident v rokoch 2024–2025).

Voľby sa týmto spôsobom konali po prvýkrát v histórii. Doteraz sa vždy uskutočnili prezenčne, a to aklamácnym spôsobom na Valných zhromaždeniach EFLM.

- **On-line voľby riadila live** pani Silvia Cattaneo z Milána.
 - Voľby vyhral v prvom kole prof. MARIO PLEBANI z Padovy.
 - Výsledky volieb boli nasledovné:
- | | |
|-------------------------|-------------|
| Michel Langlois: | 38 % |
| Mario Plebani: | 62 % |

Pre lepšiu orientáciu informujeme aj o časovom horizonte funkcie prezidentov EFLM:

- V súčasnosti je do konca roka 2021 výkonnou prezidentkou EFLM prof. Ana-Maria Šimnudič. Je veľká škoda,

že pandémia bola na príčine, že k nám nemohla v tejto pozícii prísť na biochemický kongres.

- 1. januára 2022 ju na poste výkonnej prezidentky EFLM vystrieda prof. Tomris Ozben, ktorá bude slúžiť do konca roku 2023. Súčasne sa v rovnakom čase ujme funkcie President-elect 19.10.2021 zvolený prof. Mario Plebani.
- 1. januára 2024 sa ujme funkcie výkonného prezidenta na dva roky zvolený prof. Mario Plebani a prof. Tomris Ozben prejde na pozíciu Past President.

Z medzinárodne pripravovaných odborných podujatí pripomíname:

• **XXIV. IFCC-EFLM Európsky kongres klinickej chémie a laboratórnej medicíny EUROMEDLAB 2021** sa mal konať v termíne 28. novembra–2. decembra 2021 v Mníchove. Krátko pred uzávierkou sme dostali informáciu, že Nemecko veľmi tvrdo zasiahla štvrtá vlna COVID-19, najmä v oblasti dejiska v Mníchove. Preto sa IFCC a EFLM spolu s organizačným výborom kongresu rozhodli tento EUROMEDLAB odložiť. Dňa 26. 11. 2021 oznámili nový termín konania 10.–14. apríla 2022.

• **6. EFLM Konferencia o preanalytickej fáze sa bude konať** virtuálne 15.–18. marca 2022.

• **XXIV. Medzinárodný kongres klinickej chémie a laboratórnej medicíny IFCC WORDLAB** sa bude konať 26.–30. júna 2022 v Soule, Kórea.

Snažíme sa všetky aktuálne informácie vždy včas zverejňovať na webovej stránke www.sskb.sk.

Blíži sa čas Vianoc a k tejto atmosfére neodmysliteľne patrí sneh, zasnežená krajina, snehuliak, sánkovačky a rodinné teplo, tak ako si ho pamätáme z detstva. Ten čas spomienok, sme zasa starší o jeden rok, ale máme úsmev v očiach a ľahký krok. Tak na chvíľu skúsme spomaliť čas, Vianoce hrejú na duši a na tele. Prichádza sviatočný čas, na ktorý sa dlho teší každý z nás. Vôňa koláčov vókol sa rozlieha, Vianočnej nálade každý z nás podlieha. Zabudnieme na smútok, zanechajme zvady, buďme k sebe milí, dobrí a majme sa radi. Kúzlo Vianoc nikdy nekončí a jeho najväčšími darmi sú rodina a priatelia.

Želám vám, aby ste v čarovnej atmosfére Vianoc zabudli na starosti všedných dní a v novom roku prežili veľa radosných dní, mali mnoho chuti do práce a pevné zdravie.

Hedviga Pivovarníková
prezidentka SSKB



New dates: 10–14 APRIL 2022

Dear Ladies and Sirs, dear Colleagues,
We are delighted to inform you that the

**EUROMEDLAB Congress in Munich, Germany
has been rescheduled to April 10–14, 2022.**

Following the recent postponement, this new date has been chosen based on recommendation by the organizing committee and members of the IFCC and EFLM Executive Boards also taking into account both congress venue and hotel space availability. Suitable space was not available during fall of 2022.

We are looking forward to welcoming all our invited speakers, registered delegates, and exhibitors to this rescheduled conference in Munich, the beautiful capital of Bavaria.

We also take the opportunity to apologize for any inconvenience caused by rescheduling of the conference.

In these times, it is a challenge to balance the desire to meet in person with our safety concerns for you as the participants. With increasing levels of immunity and wide-spread immunizations, we are confident to be able to meeting all of you at this important international event to celebrate the end of the COVID-19 epidemic together!

The Organising Secretariat MZ Congressi will be contacting all parties involved (Speakers, Sponsors & Exhibitors, Delegates, Poster Presenters, and others) with further information.

Kind regards,

Khosrow Adeli	Ana-Maria Simundic	Michael Neumaier	Karl Lackner
IFCC President	EFLM President	Chair COC	Congress President

European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine

Egmontstraat 11, Brussels
Belgium



Laboratórna Diagnostika, XXVI, 2, 2021: 10–13

CHOOSING WISELY: ODPORÚČANIA SLOVENSKEJ SPOLOČNOSTI KLINICKEJ BIOCHÉMIE PRE RACIONÁLNU INDIKÁCIU LABORATÓRNYCH VYŠETRENÍ

CHOOSING WISELY: SSKB RECOMMENDATIONS FOR THE RATIONAL INDICATION OF LABORATORY TESTS

Pivovarníková Hedviga¹, Sečník Peter², Ďurovcová Eva³, Magula Daniel⁴
Rácz Oliver⁵, Heriban Vladimír⁶, Kačániová Mária⁷, Lepejová Katarína⁸, Netriová Jana⁹
Balla Ján¹⁰, Štefanec František¹⁰, Hvozdovičová Beáta¹¹

¹synlab slovakia, s.r.o., Prešov; ²SK-Lab s.r.o., Lučenec; ³Ústav lekárskej a klinickej biochémie, Lekárska fakulta, Košice;
⁴Oddelenie klinickej biochémie, Špecializovaná nemocnica sv. Svorada Zobor, n.o., Nitra; ⁵Ústav patologickej fyziológie
Lekárskej fakulty UPJŠ, Košice; ⁶Všeobecná zdravotná poisťovňa, a.s., Bratislava; ⁷Klinická biochémia, s.r.o., Medicínske
laboratórium Poprad; ⁸Cumulus s.r.o., Košice; ⁹K&L Diagnostics, s.r.o., Bratislava; ¹⁰Slovenská spoločnosť klinickej bio-
chémie SLS, Bratislava; ¹¹AdLa s.r.o., Prešov

e-mail: peter.secnikjr@sklab.sk
prehľadová práca

SÚHRN

Prezentovaný súbor 15 krátkych odporúčení týkajúcich sa racionálnej indikácie laboratórnych vyšetrení je výstupom projektu realizovaného Slovenskou spoločnosťou klinickej biochémie v rámci medzinárodnej iniciatívy Choosing Wisely. Cieľom projektu bolo vyvolať odbornú diskusiu o neefektívnych postupoch pri indikácii laboratórnych vyšetrení, s ktorými sa stretávame vo svojej praxi.

Kľúčové slová: racionálna indikácia; odporúčanie

ABSTRACT

The presented set of 15 short recommendations concerning the rational indication of laboratory tests is the result of a project implemented by the Slovak Society of Clinical Biochemistry within the international initia-

tive Choosing Wisely. The aim of the project was to provoke an expert discussion on ineffective procedures for the indication of laboratory tests, which we encounter in our daily practice.

Keywords: Choosing wisely; recommendations

CIEĽ PRÁCE A METODIKA

Choosing Wisely je medzinárodná iniciatíva americkej organizácie ABIM foundation, ktorá bola po prvýkrát predstavená v roku 2012. Jej hlavným cieľom je vyvolať odbornú diskusiu o neefektívnom využívaní diagnostických a terapeutických metód a racionalizácii ich indikácie na princípoch medicíny založenej na dôkazoch. Partnerom iniciatívy je aktuálne viac než 70 odborných spoločností z rôznych krajín sveta.

Výbor Slovenskej spoločnosti klinickej biochémie (SSKB) sa rozhodol k tejto iniciatíve pripojiť a formou krát-

kych odporúčaní upozorniť na niektoré nevhodné postupy pri indikácii laboratórnych vyšetrení, s ktorými sa stretávame vo svojej praxi. Základom prvotného návrhu odporúčaní boli dve premisy:

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

Projekt prebiehal v dvoch kolách. V prvom kole autor-ský kolektív vytvoril pracovnú verziu, ktorá obsahovala 35 odporúčaní, ktoré bolo možné zdôvodniť existujúcimi odbornými usmerneniami, odporúčanými štandardnými diagnostickými postupmi, či medicínskou praxou vychádzajúcou z princípov medicíny založenej na dôkazoch. Odborná verejnosť sa do tejto časti mohla zapojiť prostredníctvom výzvy prezidentky SSKB zverejnenej 3. 8. 2020 a opakovane 6. 10. 2020 na webovej stránke www.sskb.sk a zaslať svoje návrhy autorskému kolektívu.

Druhé kolo prebehlo formou hlasovania o relevantnosti odporúčaní v našich podmienkach. Hlasovanie bolo dostupné pre všetkých členov SSKB formou ankety na stránke www.sskb.sk po dobu štyroch mesiacov. Poďakovanie patrí všetkým, ktorí v dnešnej hektickej dobe venovali svoj cenný čas a do hlasovania sa zapojili. Následne boli jednotlivé odporúčania posúdené autorským kolektívom v internom recenznom konaní s dôrazom na ich aktuálnosť, odbornú váhu, jednoznačnosť a príslušnosť ku gescii SSKB.

VÝSLEDKY

Prvým výstupom tohto projektu je 15 prezentovaných odporúčaní, ktoré získali najvyšší počet hlasov:

1. Pre diagnostiku včasných štádií glomerulopatií u dospelých pacientov s cukrovkou a/alebo hypertenziou ordinovať okrem sérového kreatinínu alebo cystatínu C (na odhad GF) aj pomer albumín/kreatinín v moči (ACR) (National Kidney Foundation, 2013).
2. Neordinovať vyšetrenia AST, LD, CK, CK-MB a myoglobínu na diagnostiku infarktu myokardu alebo reinfarktu. Jediným odporúčaným laboratórnym testom na stanovenie diagnózy akútneho infarktu myokardu je troponín (I alebo T) stanovený vysoko-senzitívnou metódou (Thygesen, K. et al., 2018).

3. Pri pozitívnom náleze PSA vyšetriť PHI (Prostate Health Index) ako doplnkové vyšetrenie pred biopsiou prostaty (Loeb, S. et al., 2015).
4. Neordinovať prokalcitonín ako rutinný zápalový marker. Jeho indikácia je racionálna pri odhade rizika a diagnostike najmä bakteriálnej sepsy a monitorovaní jej antibiotickej liečby u pacientov po operáciách, v kritických stavoch a u imunosuprimovaných pacientov (Evans, L. et al., 2021).
5. Na monitorovanie kompenzácie diabetu mellitu neordinovať stanovenie glukózy v moči (glykozúrie). Odporúčaným laboratórnym vyšetrením je stanovenie glykovaného hemoglobínu (HbA1c) aj u pacientov liečených gliflozínmi (Cosentino, F. et al., 2020), (Friedecký, B. et al., 2020).
6. Na diagnostiku prebiehajúceho zápalu je vhodnejšie vyšetrenie CRP než vyšetrenie sedimentácie erytrocytov. CRP je citlivejší marker zápalovej reakcie (reakcie akútnej fázy) a lepšie reaguje na zmeny klinického stavu pacienta (Watson, J. et al., 2019).
7. Pre diagnostiku albuminúrie a proteinúrie využívať stanovenie pomeru albumín/kreatinín a proteín/kreatinín v 1. rannom moči. Majú vyššiu výpovednú hodnotu než vyšetrenie proteinúrie a albuminúrie v zbieranom moči (National Kidney Foundation, 2013).
8. V ambulantnej praxi využívať vyšetrenie frakčných exkrécií Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} v jednorazovom moči. Tento parameter poskytuje často spoľahlivejšiu informáciu o hospodárení obličiek s iónmi než 24 h zber (vysoká chybovosť v udávanom objeme a dobe zberu) (konsenzus SSKB).
9. Neordinovať nádorové markery CEA, CA-125, HE4, CA-15.3, alfa-fetoproteín alebo CA-19.9 za účelom skríningu alebo ako primárnu diagnostickú metódu pre onkologické ochorenia. Senzitivita a špecificita týchto testov nie je pre tieto účely adekvátna. Uvedené vyšetrenia sú vhodné na monitorovanie priebehu ochorenia a sledovanie úspešnosti terapie, prípadne je možné ich využiť ako pomocnú diagnostickú metódu (Valík, D. et al., 2021).
10. Pre posúdenie funkcie štítnej žľazy je u väčšiny tyreopatií v iniciálnej fáze postačujúce vyšetrenie TSH (neplatí pri podozrení na centrálnu hypotyreózu a v prvých 3–6 mesiacoch substitučnej terapie). Pri výsledku TSH mimo referenčné rozmedzie sú následne indikované ďalšie vyšetrenia (NICE guidelines, 2020).

11. Neordinovať stanovenie celkovej amylázy na diagnostiku akútnej pankreatitídy. Stanovenie lipázy, prípadne pankreatickej amylázy, má v tejto indikácii najlepšiu výpovednú hodnotu (Leppäniemi, A. et al., 2019), (Scott, T. et al., 2013).
12. Pre včasnú diagnostiku chronickej obličkovej choroby u malých detí, tehotných žien a pacientov s úbytkom alebo výrazným zvýšením svalovej hmoty využívajte odhad glomerulárnej filtrácie zo sérovej koncentrácie cystatínu C. Nie je ovplyvnená veľkosťou svalovej hmoty ako sérový kreatinín (National Kidney Foundation, 2013).
13. Neindikovať vyšetrenie katecholamínov pri podozrení na feochromocytóm alebo paraganglióm. Ako test
 1. línie použiť stanovenie voľnej frakcie metanefrínov v plazme alebo metanefrínov v moči (Lenders, J. W. M. et al., 2014).
14. Vyšetrenie koncentrácie sodíka v sére indikovať spolu s vyšetrením chloridov. Izolované vyšetrenie len jedného z iónov je problematicky interpretovateľné pri hodnotení porúch vodno-soľnej a acidobázickej rovnováhy (Jabor, A., 2008).
15. Monitorovanie koncentrácie vitamínu D nie je indikované u zdravých detí a u detí s nadváhou alebo obezitou bez ďalšej symptomatológie (konsenzus SSKB).

ZÁVER

Považujeme za nevyhnutné zdôrazniť, že tento dokument je výlučne odborným materiálom a nezohľadňuje indikačné obmedzenia týkajúce sa úhrady zdravotných výkonov z verejných zdrojov.

V budúcnosti plánujeme prezentáciu ďalších odporúčaní predovšetkým lekárom pracujúcim v klinických medicínskych odboroch (odborné kongresy, periodiká, e-learning a iné). Veríme, že prezentovaný materiál prispieje k efektívnejšiemu využívaniu laboratórnej diagnostiky a jeho význam nezostane len v odbornej rovine a na úrovni akademickej diskusie na tému „takto by sa to malo robiť,“ ale nájde si cestu do každodennej praxe.

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

Podakovanie

Autorský kolektív vyjadruje osobitné poďakovanie prim. MUDr. Márii Hrdej, prim. MUDr. Rudolfovi Gaškovi, prim. MUDr. Jánovi Vindišovi a RNDr. Ivete Mocnejovej, ktorí sa na príprave tohto odporúčania podieľali cennými odbornými pripomienkami a svojou účasťou v ankete na webovej stránke SSKB.

LITERATÚRA

1. Cosentino, F., Grant, P. J., Aboyans, V., et al. (2020): ESC Scientific Document Group, 2019 ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD: The Task Force for diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *European Heart Journal*, 41(2), pp. 255—323.
2. Evans, L., Rhodes A., Alhazzani, W. (2021): Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock. *Critical Care Medicine*, 49(11), e1063—e1143. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000005337>.
3. Friedecký, B., Kratochvíla, J., Springer, D., et al. (2020): Doporučení České společnosti klinické biochemie a České diabetologické společnosti ČLS JEP Diabetes mellitus – laboratorní diagnostika a sledování stavu pacientů, revize 2020. Dostupné online na www.cskb.cz, dátum prístupu: 14. 10. 2021.
4. Jabor, A. (ed.) (2008): Sodný kationt – Na⁺. *Vnitřní prostředí*, 1. vydání, Praha: Grada Publishing a. s., pp. 21—39.
5. Lenders, J. W. M., Duh, Q. Y., Eisenhofer, G. (2014): Pheochromocytoma and Paraganglioma: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 99(6), pp. 1915—1942.
6. Leppäniemi, A., Tolonen, M., Tarasconi, A., et al. (2019): 2019 WSES guidelines for the management of severe acute pancreatitis. *World Journal of Emergency Surgery*, 14 (27). <https://doi.org/10.1186/s13017-019-0247-0>.
7. Límanová, Z., Pikner, R., Springer, D. (2010): Doporučení pro laboratorní diagnostiku funkčních a autoimunních onemocnění štítné žlázy. *Klinická Biochemie a Metabolismus*, 19(40), pp. 48—61.
8. Loeb, S., Sanda, M. G., Broyles, D. L., et al. (2015): The prostate health index selectively identifies clinically significant prostate cancer. *Journal of Urology*, 193(4), pp. 1163—1169.

9. **National Kidney Foundation (2013):** KDIGO Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int.—Supplements*, 3.
10. **NICE Guidelines (2020):** Thyroid disease: assessment and management. Dostupné online na: <https://www.nice.org.uk/guidance/ng145>, dátum prístupu 15. 10. 2021.
11. **Scott, T., Baillie, J., De Witt, J., et al. (2013):** American College of Gastroenterology Guideline: Management of Acute Pancreatitis. *American Journal of Gastroenterology*, 108(9) pp. 1400—1415. doi: <https://doi.org/10.1038/ajg.2013.218>.
12. **Thygesen, K., Alpert, J. S., Jaffe, A. S., et al. (2018):** ESC Scientific Document Group, Fourth universal definition of myocardial infarction. *European Heart Journal*, 40(3), pp. 237—269. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy462>.
13. **Valík, D., Zdražilová, Dubská, L., Springer, D., et al. (2021):** Doporučení k využití nádorových markerů v klinické praxi 2020. *Klinická Biochemie a Metabolismus*, 29(50), pp. 41—55.
14. **Watson, J., Jones, H. E., Banks, J., (2019):** Use of multiple inflammatory marker tests in primary care: using Clinical Practice Research Datalink to evaluate accuracy. *British Journal of General Practice*, 69 (684): e462—e469. <https://doi.org/10.3399/bjgp19X704309>.



Laboratórna Diagnostika, XXVI, 2, 2021: 14–21

MOŽNOSTI DIAGNOSTIKY CELIAKIE POSSIBILITIES OF COELIAC DISEASE DIAGNOSIS

Valko-Rokytovská Marcela, Azariová Martina, Salayová Aneta
Šimková Jana, Milkovičová Mária, Očenáš Peter

Katedra chémie, biochémie a biofyziky
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Košice

e-mail: marcela.valko.rokytovska@gmail.com

prehľadová práca

SÚHRN

Celiakia je multifaktorové, chronické, zápalové, autoimunitné ochorenie prejavujúce sa širokou škálou symptómov. Genetická predispozícia súvisí s haplotypmi HLA-DQ2 a DQ8, ale bolo opísaných viac ako 60 asociovaných lokusov. Celosvetovo postihuje 0,5 až 1,0 % populácie, pričom medzi európskymi krajinami sú veľké rozdiely. Vyskytuje sa v rôznych formách a viaceré z nich nedisponujú anamnézou charakteristickou pre klasickú celiakiu. Napriek výrazným pokrokom v laboratórnej diagnostike sa v súčasnosti stále prezentuje ako ochorenie, ktoré je poddiagnostikované. Z toho dôvodu je dôležitá včasná a komplexná diagnostika.

Kľúčové slová: celiakia; diagnostika; protilátky; biopsia

ABSTRACT

Celiac disease is multifactorial, chronic, inflammatory autoimmune disease manifested by wide range of symptoms. The genetic predisposition is related to HLA DQ2 and DQ8 haplotypes, but more than 60 associated loci have been described. It affects 0.5 to 1.0 % of the

population worldwide, with large differences between European countries. It occurs in various forms, and many of them do not have symptoms typical for classic form of coeliac disease. Despite significant advances in laboratory diagnostics, it is currently still presented as a disease that is underdiagnosed. Therefore, early and comprehensive diagnosis is important.

Key words: coeliac disease; diagnosis; antibodies; biopsy

Úvod

Celiakia alebo gluténsenzitívna enteropatia, prípadne celiakálna sprue, je imunitou sprostredkované chronické, celoživotné a v neliečenej forme aj život ohrozujúce systémové ochorenie. Z lekárskeho hľadiska je charakterizované neznášanlivosťou gluténu, spojené s kombináciou rôznych klinických príznakov za prítomnosti špecifických protilátok, HLA-DQ2 alebo HLA-DQ8 haplotypov a typickým histologickým obrazom poškodenej sliznice tenkého čreva. Poškodením sa rozumie atrofia, pri ktorej dochádza k vymiznutiu klkov a hyperplázii krýpt sliznice tenkého čreva.

V súčasnosti patrí celiakia medzi rýchlo sa rozvíjajúce chronické autoimunitné ochorenia vo všetkých vekových

kategoriách ľudí. Najčastejšie je spájaná s gastrointestinálnymi ťažkosťami, ako je hnačka, zápcha a abdominálna bolesť. U pacientov, ktorí vykazujú ťažkosti iného charakteru, napríklad kožné ekzémy, neurologické a muskuloskeletálne prejavy, alebo sú asymptomatickí, je diagnostika komplikovanejšia a celiakia tak spočiatku môže byť zamieňaná s inými ochoreniami.

Formy celiakie

Rozoznávame niekoľko foriem celiakie, kde všetky podtypy majú pozitívne protilátky proti endomýziu (EMA) a/alebo tkanivovej transglutamináze (anti-tTG). Pri typickej (klasickej) forme celiakie sa vzorka odobratá zo sliznice tenkého čreva na mikroskopickom obraze javí ako úplne atrofovaná v dôsledku úplného vymiznutia klkov. U pacientov sa často vyskytuje malabsorpčný syndróm, ktorý vedie k anémii zo straty železa a výraznému úbytku na váhe. Časté sú u týchto pacientov hnačky, masťná stolica alebo naopak, zápcha. Ďalšia forma celiakie je atypická (subklinická), pretože sa nevyznačuje typickými klinickými prejavmi, avšak napriek tomu pozorujeme typický nález na sliznici tenkého čreva. Zároveň sledujeme prítomnosť symptómov, ako je anémia spôsobená nedostatkom železa, osteoporóza alebo osteopénia, neplodnosť, nízky vzrast, poruchy menštruácie, depresia, epilepsia a iné (Admoua kol., 2012). Tichá forma celiakie môže byť definovaná ako porucha bez klinických symptómov, pri ktorej má jedinec na sliznici tenkého čreva lézie špecifické pre celiakiu. Je nadmerne zastúpená u detí s *diabetes mellitus* I. typu, rovnako ako u ich súrodencov. Títo jedinci by mali byť testovaní a sledovaní na prítomnosť anti-tTG a celiakie (Lebwolha kol., 2014). Pojem latentná celiakia predstavuje asymptomatickú formu s fyziologickým bioptickým nálezom, ale je charakteristická pozitívitou protilátok proti endomýziu, respektíve tkanivovej transglutamináze. Mnohí autori potenciálnu formu celiakie neklasifikujú, prípadne ju radia k latentnej alebo tichej forme. Pri tejto forme pacient disponuje protilátkami v krvi charakteristickými pre celiakiu, ale sliznica tenkého čreva je postihnutá minimálne. Neskôr dochádza k rozvinutiu typickej formy celiakie, preto je dôležité z hľadiska diagnostiky týchto pacientov pravidelne monitorovať, aj keď sa javia ako bezpríznakoví. Existuje aj tzv. refraktérna forma celiakie, kedy pacient s celiakiou svojím zdravotným stavom neodpovedá na terapiu bezgluténovou diétou (Malamut, Cellier, 2015).

Typickými príznakmi celiakie sú Dühringova herpetiformná dermatitída (DH), ktorá predstavuje kožný extraintestinálny prejav celiakie, prejavujúci sa pľuzgiermi v typických miestach, akými sú lakťové a kolenné a zadok. Nález na sliznici čreva je charakteristický pre celiakiu, kde postihnutá črevná sliznica je vo väčšine prípadov mozaikovitá. Ochorenie sa diagnostikuje imunofluorescenčnou biopsiou, ktorá vykazuje patognomické zrnité imunoglobulínové (IgA) depozity v papilárnej dermis. Imunopatogenéza DH vychádza z hypotézy, že dané ochorenie sa vyvíja z latentnej alebo manifestnej celiakie v čreve a vyvinie sa v imunitný komplex protilátok IgA proti epidermálnej transglutamináze (TG3) spolu s TG3 enzýmom v papilárnej dermis (Renala kol., 2018).

Diagnostika celiakie pomocou gastrointestinálnych symptómov

Gastrointestinálne prejavy sú zriedkavejšie u starších pacientov. Viac ako polovica dospelých jedincov trpí okrem gastrointestinálnych symptómov aj úbytkom hmotnosti. Najčastejším symptómom je hnačka. V poradí podľa klesajúcej frekvencie výskytu symptómov nasleduje nadúvanie, aftózna stomatitída, striedavé črevné návyky, zápcha a gastroezofageálna refluxná choroba. Menej časté gastrointestinálne prejavy sú vracanie a chronická bolesť brucha. Hoci gastrointestinálne prejavy sú pomerne bežné v normálnej populácii, existuje len slabá korelácia medzi nimi a nediagnostikovanou celiakiou. Na rozdiel od dospelých jedincov je abdominálna bolesť brucha bežným prejavom celiakie u detí. U veľmi malých detí sa tiež zvyšuje pravdepodobnosť úplnej atrofie klkov tenkého čreva (Hujola kol., 2018).

Diagnostika celiakie pomocou extraintestinálnych symptómov

Hematologické symptómy celiakie

Anémia

Anémia je častým extraintestinálnym prejavom celiakie u dospelých jedincov. Je menej častá u detí. Najčastejšou príčinou anémie u týchto pacientov je nedostatok železa, ktorého príčinou je znížená absorpcia. V niektorých prípadoch môže dochádzať k okultnému krvácaniu v gastrointestinálnom trakte, čo vedie k stratám železa (Halfdanarson, Litzow, Murray, 2007; Leffler, Green, Fasano, 2015). Okultné krváca-

nie môže byť vyvolané ochoreniami, ktoré mnohokrát komplikujú celiakiu. Medzi ne patrí napríklad ulcerózna porucha tenkého čreva, benígne vredy slizníc, tzv. negranulomatózna ulceratívna jejunitída alebo malígne vredy (Freeman, 2015). V závislosti od stupňa atrofie klkov bolo okultné krvácanie v gastrointestinálnom trakte zistené u 25 až 54 % pacientov s celiakiou (Haldanarson, Litrow, Murray, 2007).

Ďalšou príčinou vzniku anémie môže byť nedostatok folátu resp. kyseliny listovej alebo vitamínu B12 (Leffler, Green, Fasano, 2015). Kyselina listová je potrebná pre správnu hematopoézu a vývoj nervového systému. Primárne sa absorbuje v jejune. Malabsorpcia pri celiakii spôsobí zníženie hladiny kyseliny listovej v krvi a následkom je vznik makrocytarnej alebo megaloblastickej anémie. Príliš veľký deficit kyseliny listovej sa v krvnom nátere prejaví znížením počtu leukocytov a trombocytov, prípadne až pancytopeniou. Pri diagnostike sa stanovuje folát v sére a červených krvinkách. Sérový folát je závislý od príjmu folátu a často sa zvyšuje u pacientov s deficienciou vitamínu B12. Naopak, folát v červených krvinkách môže byť znížený pri deficite vitamínu B12. Ako diagnostický marker môže slúžiť aj homocysteín, ktorého koncentrácie sú zvýšené u celiatikov.

Vitamín B12, nazývaný aj kobalamín, je nevyhnutným kofaktorom a koenzýmom vo viacerých biochemických cestách. Príčiny nedostatku vitamínu B12 u celiatikov nie sú doposiaľ úplne objasnené, môžu zahŕňať znížený obsah žalúdočnej kyseliny, autoimunitnú gastritídu alebo jemnú dysfunkciu distálneho tenkého čreva. Z diagnostického hľadiska meranie koncentrácie vitamínu B12 môže byť zavádzajúce a ťažko interpretovateľné obzvlášť vtedy, ak hodnoty spadajú do nižšieho rozmedzia normálnych hodnôt, alebo existuje súčasný deficit kyseliny listovej. Zvýšené koncentrácie sérovej kyseliny metylmalónovej môžu zlepšiť presnosť diagnostiky za týchto okolností (Haldanarson, Litrow, Murray, 2007).

Na mechanizme vzniku anémie sa podieľa aj zápal. Na patogenéze celiakie sa výrazne podieľajú cytotoxické a zápalové mechanizmy, v ktorých podstatnú úlohu zohrávajú prozápalové cytokíny ako interferón- γ (IFN- γ) a interleukín 6 (IL-6). Tieto cytokíny sú mediátormi hypoferémie pri zápaloch a zároveň indukujú syntézu regulačného hormónu metabolizmu železa, hepcidínu. Ak sa zvýši syntéza hepcidínu, dôjde k zvýšeniu degradácie feroportínu a inhibícii uvoľňovania železa z makrofágov

a enterocytov. Následne vznikajú abnormality v homeostáze železa vedúce k anémii pri chronických ochoreniach ako celiakia (Weiss, Goodnough, 2005). Malabsorpcia rôznych mikroživín potrebných pre hematopoézu môže tiež spôsobiť anémiu u celiatikov. Tak ako u dospelých, aj u detí s celiakiou bol popísaný nedostatok medi, čo vyústilo až k anémii a trombocytopenii. Deficit vitamínu B6, kyseliny pantoténovej alebo riboflavínu patrí tiež medzi etiologické príčiny vzniku anémie u celiatikov (Haldanarson, Litrow, Murray, 2007).

Trombocytopenia a trombocytóza

U pacientov s celiakiou možno pozorovať abnormálny počet krvných doštičiek, avšak trombocytóza je u týchto jedincov častejším javom ako trombocytopenia. Trombocytopenia môže mať autoimunitný charakter, pretože existujú prípady, kedy sa objavila u celiatikov v súvislosti s keratokonjunktivitídou alebo choroidopatiou. V súčasnosti existuje súvislosť medzi celiakiou a idiopatickou trombocytopenickou purpurou (Baidouna kol., 2012). Predpokladá sa, že vrodený imunitný systém zohráva dôležitú úlohu v patogenéze celiakie (Stepniak, Konig, 2006). Toll-like receptory (TLR) sú kľúčové molekuly v prirodzenom imunitnom systéme. Zanoní a kol. uviedli, že u pacientov s celiakiou sú prítomné transglutaminázové protilátky, ktoré aktivujú TLR4 (Zanoní a kol., 2006). Expresia TLR4 v krvných doštičkách predstavuje predpoklad vzniku určitých foriem trombocytopenie. V dôsledku podobných autoimunitných mechanizmov je celiakia považovaná ako rizikový faktor práve pre idiopatickú trombocytopenickú purpuru (Sarbay, 2017). Etiológia trombocytózy v súvislosti s celiakiou nie je doposiaľ známa. Predpokladá sa, že vzniká ako sekundárne ochorenie v dôsledku zvýšených zápalových mediátorov, autoimunitných procesov, anémie z nedostatku železa alebo funkčného hypospelenizmu.

Koagulopatia

Ak sa celiakia nelieči, indukovaná malabsorpcia môže viesť k nedostatku vitamínu K, následkom čoho sa znižujú koagulačné faktory závislé od tohto vitamínu. Toto zníženie môže spôsobiť predĺženie koagulačných vyšetrení, ako je protrombínový čas, medzinárodný normalizovaný pomer a aktivovaný parciálny tromboplastínový čas. Príležitostným prvým príznakom u pacientov s celiakiou môže byť hemoragická porucha. Malabsorpcia vitamínu K je

menej častá u celiatikov, ktorí nevykazujú malabsorpciu iných nutričných látok (K r u z l i a k, 2012).

Leukopénia a neutropénia

Veľmi zriedkavo sa u celiatikov vyskytuje leukopénia, ktorej etiológia vyplýva z nedostatku kyseliny listovej a medi. V súčasnosti existujú zmienky o prítomnosti febrilnej neutropénie u pacientov s celiakiou, avšak s doposiaľ neznámou etiológiou (B a y d o u n a kol., 2012).

Venózný a arteriálny tromboembolizmus

Venózný a arteriálny tromboembolizmus patria k ďalším hematologickým symptómom celiakie. Celkovo u pacientov s chronickým zápalovým ochorením čriev sú hlásené zvýšené hladiny trombínom aktivovaného inhibítora fibrinolýzy, ktoré sa ukázali ako rizikový faktor pre venózný tromboembolizmus. Znížené hladiny antikoagulačných faktorov závislých od vitamínu K, proteínu C, ktorý v komplexe so svojím kofaktorom proteínom S má schopnosť proteolyticky inaktivovať koagulačné faktory V a VIII, boli navrhnuté ako kauzatívny faktor pri trombóze súvisiacej s celiakiou. Zriedkavo sa v kazuistikách vyskytuje arteriálny tromboembolizmus v spojení s celiakiou a v súčasnosti mechanizmus vzniku ostáva stále nejasný (H a l f d a n a r s o n, L i t z o w, M u r r a y, 2007).

Dysfunkcia sleziny

Hypersplenizmus sa spája klasicky so splenomegáliou, anémiou, leukopéniou a/alebo trombocytopéniou, prípadne hyperpláziou kostnej drene. Výrazné zlepšenie nastáva po splenektómii. Hyposplenizmus súvisí s poruchou dvoch hlavných funkcií sleziny, a to filtráciou dysfunkčných červených krviniek a zvýšenou citlivosťou k infekciám. Diagnostika funkcie sleziny spočíva v hematologických testoch, ktoré skúmajú kontrastnou mikroskopiou abnormality membrán periférnych červených krviniek, hlavne Howell-Jollyho teliesok a poskladaných/rozložených erytrocytov. Metóda počítania Howell-Jollyho teliesok používaná na koreláciu hyposplenizmu a celiakie nie je taká citlivá ako metóda počítania erytrocytov, ktorá sa javí ako presný neinvazívny spôsob diagnostiky, ale jej technická zložitosť obmedzuje využitie v klinickej praxi (W i l l i a m, C o r a z z a, 2007; W i l l i a m a kol., 2007).

Ďalšia skupina diagnostických postupov zahŕňa využitie systémovej injekcie špecifických rádiofarmák, ktoré sa podrobujú skúške na slezine. Hypersplenizmus a hypo-

splenizmus môžu koexistovať, ale u pacientov s celiakiou sa prevažne vyskytuje hyposplenizmus. Výskyt hyposplenizmu pri celiakii sa pohybuje od 14 do 77 % u dospelých pacientov. U detí je incidencia oveľa nižšia (B a y d o u n a kol., 2012).

Deficiencia IgA

Prevalencia deficitu imunoglobulínu A (IgA) u celiatikov je 10 až 15-násobne vyššia ako u bežnej populácie. Približne 2–3 % pacientov s celiakiou trpí deficitom IgA a naopak, až 8 % jedincov s deficitom IgA trpí celiakiou. Pacienti so selektívnym nedostatkom IgA majú 10- až 20-násobne zvýšené riziko vzniku celiakie. Klinický obraz celiatikov so selektívnou deficienciou IgA je odlišný od pacientov s celiakiou s normálnou hladinou IgA, čo dokazuje zvýšenú incidenciu tichej formy celiakie. V súčasnej dobe sa na diagnostiku celiakie používajú protilátky proti gliadínu (AGA), retikulínu (ARA), endomýziu (EMA). Tieto sérologické markery sú vysoko citlivé a špecifické pre celiakiu, najmä pre testy protilátok na základe IgA. Väčšina existujúcich serologických metód deteguje iba protilátky IgA, jeho nedostatok môže spôsobiť falošne negatívne výsledky. Základným serologickým testom, ktorý dokáže detegovať IgG protilátky súvisiace s celiakiou, je AGA test, ktorý má obmedzenú špecificitu, a preto nemôže spoľahlivo a jednoznačne stanoviť diagnózu. Vyhodnotenie protilátok proti transglutamináze pre triedu IgG môže byť užitočné pri diagnostike celiakie u pacientov s deficitom IgA. Títo pacienti sú náchylní k iným zápalovým ochoreniam čriev alebo chronickým parazitárnym infekciám, ako napríklad giardióza, ktorá by sa mohla javiť ako celiakia (T a y l o r a kol., 2008; K r u z l i a k, 2012).

Lymfóm

U pacientov s refraktérnou celiakiou typu II (RCDII) sa biele krvinky v stene tenkého čreva delia a množia v nadmernom počte. Približne u polovice týchto pacientov sa vyvinie veľmi zriedkavá a agresívna forma lymfómu, nazývaná T-bunkový lymfóm asociovaný s enteropatiou. Ak T-bunky detegujú glutén, dochádza k produkcii cytokínov, ktoré stimulujú iné bunky imunitného systému. Následne vzniká extrémna a bolestivá zápalová reakcia typická pre celiakiu, v niektorých zriedkavých prípadoch vedie k vzniku rakoviny. Je vedecky dokázané, že nástup tejto zriedkavej formy lymfómu závisí od cytokínu interleukínu 15 (IL-15), ktorý spôsobuje proliferáciu malígnych buniek.

Najnovšie výskumy dokazujú, že aj tri ďalšie cytokíny (tumor nekrotizujúci faktor – TNF, interleukín 2 – IL-2 a interleukín 21 – IL-21) môžu vyvolať proliferáciu malígnych buniek. Tieto zistenia slúžia na ďalšie objasnenia, ako imunitný systém reaguje na lepok, a ako môže stimulovať rast rakovinových buniek u pacientov RCDII (Smedby a kol., 2005; Abadie, Jabri, 2014).

Diagnostika celiakie pomocou muskuloskeletálnych symptómov

Reumatoidná artritída

Reumatoidná artritída, tak ako aj celiakia, patria do rodiny autoimunitných ochorení a zdieľajú viaceré aspekty. Z hľadiska epidemiológie zdieľajú porovnateľné vplyvy životného prostredia, protilátky a nedávny nárast prípadov. Líšia sa vo svojich špecifických prediktívnych a diagnostických biomarkeroch. Na úrovni klinických prejavov vykazuje celiakia extraintestinálne reumatické prejavy a reumatoidná artritída vykazuje gastrointestinálne, kedy u pacientov existuje patologický nález na tenkom čreve. Patofyziologicky sú obe ochorenia sprostredkované endogénnymi enzýmami v cieľových orgánoch (Lerner, Mattia, 2015).

Metabolické ochorenia kostí

Medzi extraintestinálne prejavy celiakie patria aj metabolické ochorenia kostí, ako napríklad nedostatok kostnej hmoty, osteoporóza, osteopénia, osteomalácia alebo sekundárny hyperparatyroidizmus. V dôsledku atrofie sliznice dochádza k zníženej absorpcii vápnika, a aby sa zamedzilo hypokalémii, dochádza k zvýšenej sekrécii parathormónu (sekundárny hyperparatyroidizmus) a následne k stimulácii degradácie kostí pôsobením osteoklastov. Z toho dôvodu sa vápnik získava z kostrového rezervoára, avšak tento stav prestavby môže viesť k osteopénii alebo osteoporóze, zmene kostrovej mikroštruktúry a zvýšeniu rizika zlomenín. Hypersekrécia prozápalových cytokínov prispieva k osteoklastickej resorpcii kostí (Zanchetta, Longobardi, Bai, 2016).

Diagnostika celiakie pomocou kožných symptómov

Ekzém a psoriáza

Priame patogénne spojenie medzi celiakiou a ekzémom alebo psoriázou nie je doposiaľ známe. Je však dokázané, že pacienti s celiakiou majú mierne zvýšené riziko vzniku psoriázy. Ak sa už psoriáza vyvinie u celiatikov,

často po nasadení bezlepkovej diéty dochádza k zlepšeniu stavu (Leffler, Green, Fasano, 2015). Ďalším kožným prejavom celiakie je aj Duhringova herpetiformná dermatitída (Peckárová, Peckárek, Kabátová, 2009).

Nešpecifické kožné prejavy

U pacientov s celiakiou, okrem ekzému a psoriázy, môžu byť prítomné aj rôzne nešpecifické problémy, vrátane suchej kože, ľahkých podliatin, krehkých nechtovej a rednutia vlasov. Zinok, železo a vitamíny rozpustné v tukoch sú u pacientov s novodiagnostikovanou celiakiou najčastejšie deficientné a ich opakované dopĺňanie môže urýchliť klinické zlepšenie. Alopecia areata môže byť samostatne koexistujúcim ochorením u dospelých a detí s celiakiou. Tento stav zvyčajne nie je ovplyvnený bezlepkovou diétou a môže byť progresívny (Bardella a kol., 2000; Leffler, Green, Fasano, 2015).

Diagnostické postupy pri celiakii na Slovensku

Európska pediatriká spoločnosť pre gastroenterológiu, hepatológiu a výživu (ESPGHAN) vypracovala revidované odporúčania, z ktorých vyplývajú nasledovné kritéria pre stanovenie diagnózy celiakie platné pre deti a dospelých:

- anamnéza, sérologické testy, klinické príznaky a črevná biopsia sa zhodujú s diagnózou celiakie;
- po nastavení a dodržiavaní bezlepkovej diéty dochádza k úprave sérologických testov a klinických symptómov;
- pacient je starší ako 2 roky;
- vylúčené iné ochorenia podobné celiakii.

Potvrdenie diagnózy celiakie musí byť založené na základe nálezov z laboratórnych vyšetrení, sérologických testov a endoskopie (Suhá a kol., 2015).

Laboratórne vyšetrenia

Každý pacient by mal mať laboratórne vyšetrený krvný obraz a protrombínový čas. Základné biochemické parametre môžu preukázať hypokalémiu, hypokalcémiu, hypomagnezémiu, taktiež sa môžu vyskytnúť aj znížené hladiny proteínov, albumínu, kyseliny listovej a vitamínu B12, naopak, zvýšenie nastáva v aktivitách transamináz ALT a AST. Pri rozbere koncentrácie feritínu a sérového železa je typická hyposiderémia. U pacienta s prítomnými hnačkami sa odporúča aj parazitologické vyšetrenie stolice (Suhá a kol., 2015).

Sérologické testy

Ďalším krokom v diagnostike celiakie sú sérologické testy, ktorých úlohou je nielen napomôcť k diagnostike, ale slúžia aj ako kontrolný nástroj pri monitorovaní ochorenia vo fáze dodržiavania bezlepkovej diéty. Pri sérologických testoch je dôležité brať do úvahy, že aj pacient s celiakiou môže mať negatívne výsledky a naopak, pozitívne výsledky nie sú dostačujúce na jednoznačnú diagnostiku celiakie. Sérové protilátky majú polčas rozpadu 30–60 dní a z toho dôvodu je nutné, aby pacient pred odberom dodržiaval diétu obsahujúcu glutén. Hladiny sérových protilátok po nasadení bezgluténovej diéty postupne klesajú (S u c h á a kol., 2015).

Odporúča sa vyšetriť v prvom rade protilátky proti tkanivovej transglutamináze (anti-tTG), súčasne s protilátkami EMA. Vo väčšine prípadov sú tieto vyšetrenia dostupné len pre protilátky triedy IgA. Je známe, že asi 10 % celiatikov trpí nedostatkom IgA, z tohto dôvodu by mohli vykazovať falošne negatívne výsledky. Aby sa predišlo tejto skutočnosti, odporúča sa urobiť vyšetrenie hladiny celkového IgA. Existujú aj pracoviská, ktoré poskytujú test na vyšetrenie Anti-tTG pre triedu IgG. Vyšetrenie protilátok AGA je najčastejšie využívané aj napriek svojej nižšej špecifite a senzitivite, pretože poskytuje možnosť vyšetrenia protilátok v triede IgA a IgG. Anti-tTG-IgA bývajú falošne pozitívne pri pokročilých chorobách pečene a zlyhaní srdca. V takom prípade je nutné diagnózu potvrdiť aj histologicky (P á v, 2006; P e k á r k o v á, P e k á r e k, K a b á t o v á, 2009).

Endoskopia

Endoskopia je nevyhnutnosťou pre potvrdenie diagnózy celiakie. Na sliznici celiatikov je možné pozorovať rôzne zmeny, od makroskopicky intaktnej sliznice až po mozaikovitý vzhľad sliznice, skrátenie alebo absencia Kerkringových rias, prítomnosť vrúbkovaných rias, prípadne až viditeľnosť podslizničných ciev (S u c h á a kol., 2015). Na definitívne stanovenie diagnózy celiakie je nutné vykonať histologické vyšetrenie biopptickej vzorky z tenkého čreva. Aj pri rutinnej gastroskopii je možné odobrať vzorku sliznice, ale je nutné ju odobrať najmenej v dolnej časti duodéna aborálne od Vaterovej papily. U malých detí s hmotnosťou do 10 kg je vykonávaný odber vzorky sliznice tenkého čreva sacou kapsulou (Crosbyho alebo Watsonova kapsula). U detských pacientov s vyššou hmotnosťou je postup rovnaký ako u dospelých pacientov. V niektorých

prípadoch je možné do diagnostického postupu zaradiť aj enteroskopiou alebo vyšetrenie kapsulovou endoskopiou (P e k á r k o v á, P e k á r e k, K a b á t o v á, 2009).

Histologické vyšetrenie vzoriek

Vzorky odoslané na histologické vyšetrenie sú následne hodnotené histologickým skórovaním (gradin-gom) podľa Marsha (M a r s h, 1990, 1992). Marshova klasifikácia bola modifikovaná podľa Oberhubera (Tabuľka 1) (O b e r h u b e r, 2000; D i c k s o n, S t r e u t k e r, C h e t t y, 2006).

Genetické testy

Ak pri diagnostike dôjde k pochybnostiam a výsledky predchádzajúcich testov sú nejednoznačné, je možné vykonať genetické testy, ktorých podstatou je sledovanie prítomnosti predispozičných alel HLA-DQ2/DQ8.

U 90–95 % pacientov s celiakiou je exprimovaná molekula heterodiméru HLA-DQ2 kódovaná alelou HLA-DQA1*05 v kombinácii s alelou HLA-DQB1*02, tiež označovaná ako HLA-DQ2.5 v cis- alebo trans-usporiadaní. Okrem tohto heterodiméru sa u 5 až 10 % pacientov s celiakou vyskytuje heterodimér HLA-DQ8 kódovaný alelou HLA-DQB1*03:02, najčastejšie v kombinácii s HLA-DQA1*03:01. Varianty HLA-DQ2.5 a DQ8 majú populačné zastúpenie okolo 20–25 % vo väčšine kaukazskej populácie, avšak u väčšiny jedincov s týmito typmi HLA sa celiakia nerozvinie. Kvôli silnej asociácii HLA s celiakiou možno HLA považovať za nevyhnutný, ale nie postačujúci genetický faktor pre rozvoj ochorenia (S o l l i d, L u n d i n, 2013; L á z á r - M o l n á r, S n y d e r, 2018).

Genetické vyšetrenie HLA-DQ2 a DQ8 má vysokú negatívnu prediktívnu hodnotu (viac ako 99 %) (C a s t i l l o, T h e e t h i r a, L e f f l e r, 2015). Prítomnosť HLA-DQ2 a HLA-DQ8 spolu s pozitívnymi sérologickými testami a histopatologickými zmenami črevnej sliznice potvrdzuje diagnózu celiakie.

Rádiodiagnostické metódy

Rádiodiagnostické metódy slúžia ako doplnkové vyšetrenie, nepraktizujú sa rutinne, ale napomáhajú pri diferenciálnej diagnostike. Využíva sa hlavne denzitometrické vyšetrenie kostí a sonografia abdoménu (S u c h á a kol. 2015).

Tabuľka 1. Modifikovaná Marshova klasifikácia lézií tenkého čreva v diagnostike celiakie

Marshov typ	IEL/100 enterocytov- jejunum	IEL/100 enterocytov- duodenum	Hyperplázia krýpt	Klky
0	< 40	< 30	Normálna	Normálne
1	> 40	> 30	Normálna	Normálne
2	> 40	> 30	Zvýšená	Normálne
3a	> 40	> 30	Zvýšená	Mierna atrofia
3b	> 40	> 30	Zvýšená	Výrazná atrofia
3c	> 40	> 30	Zvýšená	Úplná vilózna atrofia
4	< 40	< 30	Hypoplázia krýpt	Úplná vilózna atrofia

IEL/100 enterocytov = intraepiteliálne lymfocyty na 100 enterocytov

Diferenciálna diagnostika

Diferenciálna diagnostika môže byť komplikovaná hlavne u pacientov, u ktorých celiakia nie je sprevádzaná malnutríciou alebo maldigesciou. Je známe, že celiakia je asociovaná s radom iných ochorení, ako napríklad diabetes mellitus I. typu, tyreoiditída, primárna biliárna cirhóza, reumatoidná artritída, nefropatia a iné. U mladých ľudí s osteoporózou alebo častými zlomeninami je potrebné urobiť vyšetrenia na prítomnosť celiakie, taktiež aj u pacientov s Downovým a Turnerovým syndrómom z dôvodu asociácie s celiakiou (K l u c h o, 2016).

ZÁVER

Hoci diagnostika celiakie je zvyčajne založená na typických symptómoch, konzistentných laboratórnych a histologických nálezoach, existujú však nejasné prípady s potrebným podrobnejším vyšetrením. Špecifický histopatologický obraz v kombinácii s klinickými prejavmi pomáha odlíšiť celiakiu od iných ochorení s podobným obrazom a umožňuje tak nastavenie správnej liečby. Pretrvávajúce alebo opätovný výskyt symptómov, aj napriek prebiehajúcej liečbe, si vyžaduje revíziu prvej diagnózy, vyhodnotenie adhérencie k bezlepkovej diéte a hľadanie konkurentných porúch alebo komplikácií.

LITERATÚRA

1. **Abadie, V., Jabri, B. (2014):** IL-15: a central regulator of celiac disease immunopathology. *Immunol Rev.*, 260(1), pp. 221—234. doi: 10.1111/imr.12191.IL-15.
2. **Admou, B., et al. (2012):** Atypical celiac disease: From recognizing to managing. *Gastroenterology Research and Practice*, 2012. doi: 10.1155/2012/637187.
3. **Bardella, M. T., et al. (2000):** Alopecia areata and coeliac disease: No effect of a gluten-free diet on hair growth. *Dermatology*, 200(2), pp. 108—110. doi: 10.1159/000018340.
4. **Baydoun, A., et al. (2012):** Hematological manifestations of celiac disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 47(12), pp. 1401—1411. doi: 10.3109/00365521.2012.706828.
5. **Castillo, N. E., Theethira, T. G., Leffler, D. A. (2015):** The present and the future in the diagnosis and management of celiac disease. *Gastroenterology Report*, 3(1), pp. 3—11. doi: 10.1093/gastro/gou065.
6. **Dickson, B. C., Streutker, C. J., Chetty, R. (2006):** Coeliac disease: An update for pathologists. *Journal of Clinical Pathology*, 59(10), pp. 1008—1016. doi: 10.1136/jcp.2005.035345.
7. **Freeman, H. J. (2015):** Iron deficiency anemia in celiac disease. *World Journal of Gastroenterology*, 21(31), pp. 9233—9238. doi: 10.3748/wjg.v21.i31.9233.
8. **Halfdanarson, T. R., Litzow, M. R., Murray, J. A. (2007):** Hematologic manifestations of celiac disease. *Blood*, 109(2), pp. 412—421. doi: 10.1182/blood-2006-07-031104.
9. **Hujoel, I. A., et al. (2018):** Natural history and clinical detection of undiagnosed coeliac disease in a North American

- community. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 47(10), pp. 1358—1366. doi: 10.1111/apt.14625.
10. **Kluchó, M. J. (2016):** Diagnostika a liečba celiakie v ambulancii všeobecného lekára. *Via practica*, 13(3), pp. 106—109.
 11. **Kruzliak, P. (2012):** Hematologic manifestations of celiac disease. In *Celiac Disease—From Pathophysiology to Advanced Therapies*. doi: 10.5772/1080.
 12. **Lázár-Molnár, E., Snyder, M. (2018):** The Role of Human Leukocyte Antigen in Celiac Disease Diagnostics. *Clinics in Laboratory Medicine*. Elsevier Inc, 38(4), pp. 655—668. doi: 10.1016/j.cl.2018.07.007.
 13. **Lebwohl, B., et al. (2014):** Risk of cutaneous malignant melanoma in patients with celiac disease: A population-based study. *Journal of the American Academy of Dermatology*. Elsevier Inc, 71(2), pp. 245—248. doi: 10.1016/j.jaad.2014.03.029.
 14. **Leffler, D. A., Green, P. H. R., Fasano, A. (2015):** Extraintestinal manifestations of coeliac disease. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. Nature Publishing Group, 12(10), pp. 561—571. doi: 10.1038/nrgastro.2015.131.
 15. **Lerner, A., Matthias, T. (2015):** Rheumatoid arthritis-celiac disease relationship: Joints get that gut feeling. *Autoimmunity Reviews*. Elsevier B. V., 14(11), pp. 1038—1047. doi: 10.1016/j.autrev.2015.07.007.
 16. **Malamut, G., Cellier, C. (2015):** Complications of coeliac disease. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*. Elsevier Ltd, 29(3), pp. 451—458. doi: 10.1016/j.bpg.2015.05.005.
 17. **Marsh, M. N. (1990):** Grains of truth: evolutionary changes in small intestinal mucosa in response to environmental antigen challenge. *Gut*, (i), pp. 111—114. doi: 10.1007/978-1-4419-6247-8_13142.
 18. **Marsh, M. N. (1992):** Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity (celiac sprue). *Gastroenterology*. Elsevier Inc., 102(1), pp. 330—354. doi: 10.1016/0016-5085(92)91819-P.
 19. **Oberhuber, G. (2000):** Histopathology of celiac disease. *Bio-medicine and Pharmacotherapy*, 54(7), pp. 368—372. doi: 10.1016/S0753-3322(01)80003-2.
 20. **Páv, I. (2006):** Celiakia v ambulantnej praxi. *Via pract.*, 3(1), pp. 22—24.
 21. **Pekárková, B., Pekárek, B., Kabátová, J. (2009):** 46. Metodický list racionálnej farmakoterapie – Racionálna diagnostika a liečba celiakie. *Štandardný diagnostiký a terapeutický postup*, 13(1—2), pp. 1—6.
 22. **Reunala, T., et al. (2018):** Dermatitis herpetiformis: A common extraintestinal manifestation of coeliac disease. *Nutrients*, 10(5), pp. 1—9. doi: 10.3390/nu10050602.
 23. **Sarbay, H. (2017):** Investigation of Celiac Disease in Patients Followed by Immun Thrombocytopenic Purpura Diagnosis and Comparison with Literature. *Northern Clinics of Istanbul*, 4(2), pp. 160—164. doi: 10.14744/nci.2017.07279.
 24. **Smedby, K. E., et al. (2005):** Malignant lymphomas in coeliac disease: Evidence of increased risks for lymphoma types other than enteropathy-type T cell lymphoma. *Gut*, 54(1), pp. 54—59. doi: 10.1136/gut.2003.032094.
 25. **Sollid, L. M., Lundin, K. E. A. (2013):** *Celiac Disease, The Autoimmune Diseases: Fifth Edition*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-384929-8.00059-9.
 26. **Stepniak, D., Koning, F. (2006):** Celiac Disease-Sandwiched between Innate and Adaptive Immunity. *Human Immunology*, 67(6), pp. 460—468. doi: 10.1016/j.humimm.2006.03.011.
 27. **Suchá, V., et al. (2015):** Aktuálny pohľad na celiakiu. *Via practica*, 12(1), pp. 22—28.
 28. **Taylor, A. K., et al. (2008):** *Celiac Disease*. Edited by Adam, M., et al., Seattle (WA): University of Washington: GeneReviews. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/>.
 29. **Weiss, G., Goodnough, L. T. (2005):** Anemia of chronic disease. *The new england journal of medicine*, 352, pp. 1011—1023. doi: 10.1002/9781119252863.ch12.
 30. **William, B. M., et al. (2007):** Hyposplenism: A comprehensive review. Part II: Clinical manifestations, diagnosis, and management. *Hematology*, 12(2), pp. 89—98. doi: 10.1080/10245330600938463.
 31. **William, B. M., Corazza, G. R. (2007):** Hyposplenism: A comprehensive review. Part I: Basic concepts and causes. *Hematology*, 12(1), pp. 1—13. doi: 10.1080/10245330600938422.
 32. **Zanchetta, M. B., Longobardi, V., Bai, J. C. (2016):** Bone and Celiac Disease. *Current Osteoporosis Reports*, 14(2), pp. 43—48. doi: 10.1007/s11914-016-0304-5.
 33. **Zanoni, G., et al. (2006):** In celiac disease, a subset of auto-antibodies against transglutaminase binds toll-like receptor 4 and induces activation of monocytes. *PLoS Medicine*, 3(9), pp. 1637—1653. doi: 10.1371/journal.pmed.0030358.



Laboratórna Diagnostika, XXVI, 2, 2021: 22–30

LYMSKÁ BORELIÓZA A JEJ DIAGNOSTIKA LYME BORRELIOSIS AND ITS DIAGNOSTICS

Milkovičová Mária, Šimková Jana, Valko-Rokytovská Marcela

Katedra chémie, biochémie a biofyziky
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Košice

e-mail: maria.milkovicova@uvlf.com
prehľadová práca

SÚHRN

Lymeská borelióza (LB) je ochorenie prenášané kliešťami, ktoré sa vyskytuje prevažne v miernom pásme severnej pologule a je primárne spôsobená baktériami patriacimi do komplexu *Borrelia burgdorferi* s. l. Ochorenie sa prejavuje ako multisystémové zápalové poškodenie orgánov vrátane kože, nervového, kardiovaskulárneho a osteoartikulárneho systému s viacštádiovým priebehom. Diagnostika lymskej boreliózy je najčastejšie založená na charakteristických klinických prejavoch v kombinácii so sérologickým potvrdením infekcie (okrem *erythema migrans*). Nešpecifická povaha mnohých klinických prejavov LB a obmedzenia v súčasnosti dostupných testov predstavujú diagnostickú výzvu. Potrebné sú najmä zlepšenia v diagnostických testoch, a to zvýšenie ich citlivosti a špecificity.

Kľúčové slová: lymeská borelióza; vektor; diagnostika; sérológia

ABSTRACT

Lyme borreliosis is a tick-borne disease that predominantly occurs in temperate regions of the northern

hemisphere and is primarily caused by the bacteria included in *Borrelia burgdorferi* s. l. complex. The disease manifests as a multisystem inflammatory damage to organs, including the skin, nervous, cardiovascular and osteoarticular systems, with a multistage course. Diagnostics of Lyme borreliosis is based on characteristic clinical symptoms in combination with serological confirmation of infection (except for *erythema migrans*). The non-specific nature of many clinical manifestations and limitations of the currently available tests presents a diagnostic challenge. In particular, further improvements in diagnostic tests are needed to increase their sensitivity and specificity.

Key words: lyme borreliosis; tick-borne; diagnostics; serology

ÚVOD

Lymeská choroba (lymská borelióza, LB) je významným emergentným ochorením s fenoménom prírodnej ohniskovosti, ktoré je prenášané kliešťami prevažne na severnej pologuli. Etiologickým agens sú spirochéty patriace do komplexu *Borrelia burgdorferi sensu lato*, ktoré spôsobujú multisystémové zápalové poškodenie orgánov

vrátane kože (*erythema migrans* – EM, *acrodermatitis chronica atrophicans* – ACA), nervového (neuroborelióza), kardiovaskulárneho a osteoartikulárneho systému (lymská artritída) s viacštádiovým priebehom (K r b k o v á a kol., 2018). Keďže väčšina symptómov lymskej boreliózy má minimálnu diagnostickú hodnotu kvôli svojej nešpecifickosti (okrem EM), určenie správnej diagnózy môže byť pre lekárov často problematické (S c h w a r z o v á, 2019).

Etiológia

Pôvodca lymskej boreliózy patrí do komplexu *Borrelia burgdorferi sensu lato*, ktorý je členený na najmenej 21 doteraz známych genodruhov navzájom sa líšiacich svojou antigénnou výbavou a afinitou k rôznym tkanivám (K y b i c o v á, L u k a v s k á, B a l á t o v á, 2018). *Borrelia burgdorferi sensu lato* sa zaraďuje do čeľade *Borreliaceae*, radu *Spirochaetales*, triedy *Spirochaetes* a kmeňa *Spirochaetae* (spirochéty). V súčasnosti niektorí autori navrhujú úpravu taxonómie čeľade *Borreliaceae* na 2 hlavné rody, *Borrelia* a *Borrelia* (G u p t a, 2019; B a r b o u r,

G u p t a, 2021). Odporúča sa, aby si spirochéty spôsobujúce návratnú horúčku zachovali rodový názov *Borrelia* a tie, ktoré spôsobujú boreliózu, dostali nový názov *Borrelia*. Tieto navrhované zmeny však boli spochybnené a je diskutabilné, či je takéto rozdelenie odôvodnené (M a r g o s a kol., 2020).

V Európe bolo zaznamenaných 5 významne patogénnych druhov, ktoré spôsobujú LB u ľudí (Tabuľka 1): *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. bavariensis* a *B. spielmanii* (S t e e r e a kol., 2016; L o h r a kol., 2018). *B. afzelii* je predovšetkým spájaná s chronickými kožnými prejavmi ako *acrodermatitis chronica atrophicans*, *B. garinii* s neuroboreliózou a *B. burgdorferi sensu stricto* s artritickými a neurologickými komplikáciami (S t r n a d a kol., 2017). U ďalších troch druhov (*B. valaisiana*, *B. bissettii* a *B. lusitaniae*) je patogenita u ľudí príležitostná a zostáva predmetom diskusie (C o l l a r e s - P e r e i r a a kol., 2004; M a r g o s a kol., 2016; M a r g o s, S i n g, F i n g e r l e, 2017). Za pôvodcu LB sa v Severnej Amerike považovala iba *B. burgdorferi sensu stricto*, ale

Tabuľka 1. Patogénne a podmienené patogénne druhy patriace do komplexu *B. burgdorferi sensu lato* (Lohr a kol., 2018)

Genodruhy	Typický vektor	Hlavný rezervoár	Patogenita u ľudí	Epidemiologická distribúcia
<i>B. burgdorferi sensu stricto</i>	<i>I. scapularis</i> , <i>I. pacificus</i> , <i>I. ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i> (?)	cicavce, vtáky	+++	Severná Amerika, Európa
<i>B. garinii</i>	<i>I. ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i>	vtáky	+++	Európa, Ázia
<i>B. bavariensis</i>	<i>I. ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i>	malé cicavce, vtáky	+++	Európa, Ázia
<i>B. afzelii</i>	<i>I. ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i>	malé cicavce	+++	Európa, Ázia
<i>B. spielmanii</i>	<i>I. ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i>	plch záhradný	+++	Európa
<i>B. bissettii</i>	<i>I. pacificus</i> , <i>I. spinipalpis</i> , <i>I. ricinus</i>	škrekok príbytkový	(+)	Európa, Severná Amerika
<i>B. mayonii</i>	<i>I. scapularis</i> , <i>I. pacificus</i>	cicavce	++	Severná Amerika
<i>B. lusitaniae</i>	<i>I. ricinus</i>	jašterice	(+)	Európa
<i>B. valaisiana</i>	<i>I. ricinus</i> , <i>I. granulatus</i> , <i>I. columnae</i>	vtáky	?	Európa, Japonsko, Taiwan, Kórea

I – Ixodes

súčasné správy naznačujú, že ju môžu vyvolať aj *B. bissetii* a *B. mayonii* (Golovchenko a kol., 2016; Pritt a kol., 2016)

Charakteristika a štruktúra baktérií rodu *Borrelia*

Do rodu *Borrelia* patria netypické gramnegatívne, špirálovité, mikraerofilné baktérie s nepravidelnými závitmi dlhé 8–30 µm a s priemerom 0,2–0,5 µm. Na oboch koncoch tela majú niekoľko periplazmatických bičkov, ktoré im umožňujú typický skrutkovitý pohyb rýchlosťou až 2 mm/min. Borélie preto môžu voľne prechádzať endotelom krvných ciev a prekonávajú aj hematoencefalickú bariéru. Sú schopné vstupovať do fibroblastov, dendritických buniek a makrofágov, v ktorých prežívajú pomerne dlhú dobu (Kybicová, Lukavská, Balátová, 2018; Schwarzová, 2019).

Na vonkajšej membráne *B. burgdorferi* sa nachádzajú rôzne povrchové lipoproteíny (OspA – OspF, DbpA, DbpB, CspA, VlsE, BptA, p13, p66, BesC, BamA, Lmp1, BB0405 a iné), ktorým sa pripisujú dôležité úlohy vo virulencii, interakcii hostiteľ-patogén a v udržiavaní enzootického cyklu *B. burgdorferi*. Identifikovalo sa niekoľko imuno-dominantných povrchových lipoproteínov, ktoré dokážu rozpoznať a viazať proteíny hostiteľa, urýchliť adhérenciu na hostiteľské bunky a zabrániť spusteniu imunitnej odpovede pomocou antigénnych variácií, ako aj aktivácii komplementového systému (Kenedy, Lenhart, Akins, 2012). *B. burgdorferi* s. l. je schopná adaptovať sa vo veľmi rozdielnom prostredí a teplotách pri prechode z vektora (kliešť) na hostiteľa (homoitermné, poikilothermné, heterothermné stavovce), čo sa prejaví rôznou génovou expresiou niektorých lipoproteínov: OspA, ktorý je exprimovaný najmä počas kolonizácie kliešťom, je v hostiteľovi nahrádzaný OspC, kľúčovým pri včasnej infekcii cicavcov (Grimm a kol., 2004; Radolf a kol., 2012). OspA a OspC sa považujú za výborných kandidátov pre vývoj nových vakcín a pochopenie ich antigénnej štruktúry a prirodzenej diverzity je nevyhnutné pre správnu interpretáciu imunitnej odpovede vyvolanej očkovaním alebo infekciou (Comstedt a kol., 2017; Izac a kol., 2019). Ďalší povrchový lipoproteín VlsE (variable major protein-like sequence) je antigénne variabilný proteín, ktorý zabraňuje spusteniu imunitnej odpovede neustálou zmenou svojich povrchových epitopov (Norris, 2006) a počas perzistujúcej infekcie nahrádza proteín OspC na vonkajšom povrchu *B. burgdorferi* (Tilly, Bestor, Rosa, 2013).

V prípade nepriaznivých podmienok sú borélie schopné tvoriť extracelulárne membránové cystické formy (blebs) so zníženou metabolickou aktivitou, ktoré pravdepodobne majú obrannú funkciu voči penetrácii protilátok a antibiotík. Cystické formy sa môžu reverzibilne meniť na plne metabolicky aktívne spirochetálne formy a sú zodpovedné za „návrtnú“ či „spiacu“ LB. Borélie tak môžu v organizme hostiteľa perzistovať nerozpoznané aj niekoľko rokov (Schwarzová, 2019).

Výskyt a incidencia LB

Lymfická borelióza je najčastejšie sa vyskytujúcou antropozoonózou prenášanou kliešťami v miernom podnebí Európy, Severnej Ameriky a Ázie, no jej geografická distribúcia sa neustále rozširuje. Podľa Európskeho centra pre prevenciu a kontrolu chorôb (ECDC, 2015) patria regióny Rakúska, Českej republiky, južného Nemecka, Švajčiarska, Slovenska a Slovinska medzi najviac zamorené oblasti nakazenými kliešťami v Európe (nymfy > 10 %; dospelé kliešte > 20 %). V priebehu roka 2020 bolo na Slovensku hlásených 961 ochorení Lymfkej boreliózy, čo predstavuje chorobnosť 17,6 prípadov/100 000 obyvateľov s najvyššou incidenciou ochorenia v Trnavskom (40,1/100 000) a Žilinskom kraji (29,1/100 000). Je to o 26 % viac v porovnaní s rokom 2019 a o 3,4 % viac ako 5-ročný priemer. Ochorenia sa vyskytovali počas celého roka s maximom v júni a v júli (RÚVZ v Banskej Bystrici, 2020).

Vektory a infekcia v organizme hostiteľa

Najčastejšími vektormi ochorenia v miernom pásme Eurázie a Severnej Ameriky sú 4 druhy kliešťov rodu *Ixodes*: *I. scapularis*, *I. pacificus*, *I. ricinus* a *I. persulcatus* (Tabuľka 1), pre ktoré je typický transštádiálny prenos patogéna. Hostiteľmi najviac rozšíreného druhu *I. ricinus* v Európe môže byť viac ako 300 živočíšnych druhov vrátane veľkých a malých cicavcov, vtákov a plazov (Gern, 2009). Klíšte sú aktívne od jari až do neskorej jesene a prechádzajú tromi vývojovými štádiami – larva, nymfa a dospelý jedinec (Radolf a kol., 2012). Pôvodcu infekcie môžu prenášať všetky vývojové štádiá (až 80 % infekcií prenášajú nymfy, najmenej infekčné sú larvy). Infikované klíšte transportujú borélie slinami do rany v koži hostiteľa počas nasávania krvi. Riziko prenosu infekcie na človeka po prisatí nakazeného kliešťa sa odhaduje na 5–10 % a rastie s dĺžkou prisatia (minimálne 12–24 hodín), preto včasné odstránenie kliešťa môže výrazne znížiť riziko prenosu (ECDC, 2015;

Schwarzová, 2019). Asi u 60 – 80 % pacientov sa borélie lokálne množia v koži a môžu vyvolať kožný erytém. Spirochéty sa potom dostávajú do krvného alebo lymfatického systému hostiteľa, unikajú imunitnému systému a migrujú do jednotlivých cieľových orgánov podľa svojho organotropizmu (predovšetkým koža, nervový systém, kĺby). Pohyblivosť zabezpečovaná bičíkom a adherencia k hostiteľským molekulám sprostredkovaná povrchovými lipoproteínmi sú kľúčovými faktormi pre migráciu *B. burgdorferi* v krvi a tkanivách hostiteľa a spustenie imunitnej odpovede (Charon a kol., 2012; Schwarzová, 2019). V súčasnosti ešte stále chýbajú úplné údaje o ďalšom priebehu infekcie, ako je intravaskulárny transport borélií, mechanizmus, akým borélie unikajú z cievneho systému a dôvody možného organotropizmu niektorých patogénnych druhov borélií (Schwarzová, 2019).

Symptómy

Klinické prejavy LB zahŕňajú včasnú lokalizovanú formu (*erythema migrans*), včasnú diseminovanú formu (lymfocytóm, neuroborelióza, karditída, artritída, očná forma) a neskorú diseminovanú formu (*acrodermatitis chronica atrophicans*, chronická forma LB) (Kybicová, Lukavská, Balátová, 2018; Schwarzová, 2019).

Včasná lokalizovaná forma LB (štádium 1) sa najčastejšie (asi v 70–80 % prípadoch) prejavuje vznikom EM, kožnou vyrážkou lokalizovanej infekcie, ktorá sa postupne rozširuje v okolí miesta uhryznutia kliešťom po niekoľkých dňoch až týždňoch (3–30 dní). U niektorých pacientov sa môže prejaviť aj systémové ochorenie podobné chrípke (horúčka, bolesť hlavy, kĺbov a svalov), ale bez výrazných respiračných symptómov (Stanecká kol., 2012; ECDC, 2015). V porovnaní s USA sa EM v Európe rozširuje v koži pomalšie a zvyčajne nie je sprevádzaný ďalšími príznakmi (Cerrakol., 2016). Boreliový lymfocytóm je zriedkavým kožným prejavom včasnej infekcie v Európe, zvyčajne postihuje ušný lalok detí, prsnú bradavku, scrotum, alebo axilárny záhyb u dospelých jedincov. Bez terapeutického zásahu môže lymfocytóm pretrvávať aj niekoľko mesiacov a kvôli výraznému lymfocytárnemu infiltrátu sa niekedy nesprávne diagnostikuje ako kožný lymfóm (ECDC, 2015; Maraspina kol., 2016).

Ak sa borelióza nelieči v skorom štádiu, spirochéty sa v organizme diseminujú a lokalizovaná infekcia postupne prechádza do systémového ochorenia postihujúceho najmä kĺby, nervový systém a menej často srdce (Schneiderová a kol., 2006).

V Európe je neuroborelióza najčastejším prejavom včasnej diseminovanej formy LB (štádium 2), nasledovaná lymskou artritídou, boreliovým lymfocytómom a zriedkavejšie ACA a lymskou karditídou, ktoré sa môžu prejaviť v priebehu niekoľkých týždňov až mesiacov od infekcie (Stanecká kol., 2011). Neuroborelióza je vážnou komplikáciou u 12–15 % pacientov s LB (ECDC, 2015) a postihuje centrálny aj periférny systém. Najčastejším príznakom je bolesť hlavy a postihnutie kraniálnych nervov, najmä tvárového nervu (80 %) (Halperin, 2015). *B. garinii* v Európe spôsobuje neurologickú komplikáciu – Bannwarthov syndróm (kliešťová meningopolyneuritída), ktorý začína bolestivou radikuloneuritídou spojenou s lymfocytárnou meningitídou, často bez bolesti hlavy, prechádzajúcej do kraniálnej neuropatie alebo parézy končatín (Ogrinc a kol., 2016).

Lymská karditída je vzácna, ale závažná orgánová manifestácia LB. Prevalencia v Európe je odhadovaná u 0,3–4 % všetkých neliečených dospelých pacientov s LB. Príznaky ochorenia sa objavujú niekoľko týždňov po EM a hlavnými symptómami sú bolesti na hrudi, dyspnoe a nepravidelný srdcový rytmus (Schneffold a kol., 2015).

Neskorá diseminovaná (predtým neliečená) forma LB (štádium 3) môže postihovať kožnú, nervovú alebo pohybovú sústavu. Najčastejším chronickým prejavom LB v Európe je ACA – pomalá progresívna lézia primárne lokalizovaná na extenzorových plochách končatín, ktorá vyvoláva zápal a nakoniec stenčenie postihnutej kože s pridruženou neuropatiou. Častejšie sa prejavuje u žien vo vyššom veku a zriedkavo u detí (ECDC, 2015).

Rozdiely medzi klinickými prejavmi neskej diseminovanej formy LB v Európe a v USA sú ešte výraznejšie ako pri prejavoch vo včasnom štádiu. U pacientov s LB sa môže vyvinúť artritída, ktorá postihuje zvyčajne jeden alebo viac veľkých kĺbov, najčastejšie kolenný kĺb. V Európe sa príznaky lymskej artritídy objavujú menej často a skôr ako v USA (Steele a kol., 2016).

Neskorá neuroborelióza sa zvyčajne prejavuje ako encefalomyelitída a môže sa podobáť na viacnásobnú sklerózu (ECDC, 2015).

Diagnostika lymskej boreliózy

Diagnostika LB je založená na anamnéze, klinickom obraze a laboratórnej diagnostike. Jednoznačnú diagnózu možno stanoviť iba v prípade vzniku EM vo včasnom štádiu ochorenia, ostatné prejavy lymskej boreliózy si vy-

žadujú laboratórne potvrdenie (K r b k o v á a kol., 2018; S c h w a r z o v á, 2019).

Priama diagnostika

Priama diagnostika spočíva v priamom dôkaze *Borrelia burgdorferi* s. l. metódami mikroskopickými, histologickými, kultivačnými alebo molekulárno-genetickými (PCR). Tieto metódy sú zvyčajne vysoko špecifické, ale hlavnou prekážkou v klinickej praxi je ich nízka citlivosť, náročná štandardizovateľnosť, dlhá doba vyšetrenia a často vysoká cena. Metódy mikroskopické a histologické sa používajú iba ako doplnkové, nie sú štandardizované a využívajú sa skôr na výskumné účely (K r b k o v á a kol., 2018; K y b i c o v á, L u k a v s k á, B a l á t o v á, 2018).

Podobne ako iné spirochéty, ani *Borrelia* spp. sa nedá detegovať optickým mikroskopom ani farbením podľa Grama. Môže byť detegovaná mikroskopiou v tmavom poli a fázovo-kontrastným mikroskopom. Bakteriémia pozorovaná počas lymskej boreliózy je však mierna, s krátkym trvaním, a vyskytuje sa len na začiatku diseminácie. Počet spirochét v biopťate z EM je iba 1 až 10⁴ organizmov/1 µg tkaniva (L i v e r i s a kol., 2002), preto je mikroskopické stanovenie borélií zo vzoriek krvi u pacientov LB mnohokrát neúspešné (A s e a kol., 2016).

Kultivačné metódy sú veľmi zdĺhavé a finančne náročné. Na *in vitro* kultiváciu borélií z tkanivovej biopsie (koža, synoviálne membrány) alebo z biologických tekutín (CSF – cerebrospinálna tekutina, synoviálna tekutina) sa používajú špecifické tekuté médiá (BSK-II, MKP, BSK-H) s inkubáciou pri 32–34 °C. Úspešná kultivácia môže trvať 4 až 12 týždňov, pretože borélie majú dlhú generačnú dobu (7 až 20 hodín). Vizualizácia kultúr počas rastu sa robí mikroskopicky v tmavom poli a súčasne sa kontroluje úspešnosť kultivácie pomocou PCR (K y b i c o v á, L u k a v s k á, B a l á t o v á, 2018). Borélie ako veľmi citlivé baktérie musia byť inokulované hneď po odbere vzoriek. Z tohto dôvodu kultiváciu kultúr borélií z humánnych vzoriek vykonáva v Európe len niekoľko špecializovaných laboratórií. Napriek tomu, že kultivácia zo vzoriek kožných biopsií je pomerne úspešná (50–70 %), pri použití iných biologických vzoriek (CSF, kožná biopsia, ACA, synoviálna tekutina) táto metóda stráca citlivosť. Na kultiváciu nie sú vhodné ani vzorky krvi pacientov s chronickými príznakmi po niekoľkých rokoch od poštípania kliešťom, alebo pacienti po liečbe antibiotikami (E l d i n a kol., 2019).

Antigén-zachytávajúci test by mohol byť riešením pria-

mej diagnostiky LB. Baktérie zvyčajne sekrutujú antigény do telových tekutín, a tie by sa mohli stanoviť antigénovými testami z moču, krvi, bronchoalveolárnej tekutiny alebo CSF. Pokusy o vyvinutie antigén-zachytávajúceho testu mali však nízku špecifitu, citlivosť a neistotu v správnom výbere cieľového antigénu (K l e m p n e r a kol., 2001; S c h u t z e r a kol., 2019).

Z molekulárno-genetických metód je vhodných niekoľko typov polymerázovej reťazovej reakcie (PCR), ktoré sa líšia citlivosťou, špecifitou a detekčným spektrom (L a g e r a kol., 2017). Vhodným materiálom pre PCR sú vzorky z biopsie kože, CSF a synoviálna tekutina, ale nie vzorky krvi a moču. Najvyššia citlivosť PCR bola zaznamenaná v synoviálnej tekutine u pacientov s lymskou artritídou (až 78 %). Vysoká citlivosť bola stanovená aj vo vzorkách z biopsie kože u EM (69 %) a u ACA (76 %), nižšia senzitivita z CSF (40 %) a výrazne nízka v plazme, kde dosahuje iba 20 % (W i l s k e, F i n g e r l e, S c h u l t e - S p e c h t e l, 2007; V a n D a m, 2011; K r b k o v á a kol., 2018). Aj keď citlivosť PCR je vyššia ako detekcia kultiváciou kultúr zo vzoriek pacientov s kožným výsevom a kĺbovými príznakmi, diagnóza lymskej boreliózy sa nesmie vylúčiť len na základe negatívneho PCR testu. Testovanie pomocou PCR v prípade negatívnej serológie sa neodporúča okrem vzoriek, kde sa u pacientov prejavili atypické kožné lézie EM alebo veľmi skoré príznaky lymskej neuroboreliózy (D e s s a u a kol., 2018).

Z priamych diagnostických techník môže byť na detekciu borélií použitá len validovaná PCR a kultivácia, aj napriek ich limitom. Mikroskopické metódy sú často spojené s nepresnými nálezmi, a preto sa radšej vynechávajú (E l d i n a kol., 2019).

Nepriama diagnostika

V súčasnosti je nepriama diagnostika LB založená najmä na sérologických metódach, keďže priame metódy detekcie borélií v biologickom materiáli majú svoje limity. Sérologické vyšetrenie je založené na dôkaze špecifických protilátok a hlavnou výhodou tejto techniky je jej vysoká citlivosť na úkor špecifity. Využíva sa dôkaz včasných (IgM) a neskorých imunoglobulínov (IgG). IgM protilátky sa tvoria proti OspC a ďalším antigénom borélie v najvyššej miere v 3. až 6. týždni od prisatia kliešťa, potom ich hladina v krvi väčšinou klesá, u niektorých pacientov s LB však ani nemusia byť preukázateľné. IgG dosahujú najvyššie hodnoty v 6. až 10. týždni od prenosu infekcie a môžu

pretrvávajú v krvi aj niekoľko rokov po infekcii. Frekvencia výskytu špecifických protilátok u jednotlivých foriem LB môže byť rozdielna a všeobecne platí, že u včasných foriem LB je najnižšia a úmerne stúpa s dĺžkou infekcie (Krbková a kol., 2018; Kybicová, Lukavská, Balátová, 2018).

Pre skriningovú diagnostiku protilátok sa používa prevažne ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), ktorá môže byť dostupná ako test prvej, druhej alebo tretej generácie. ELISA tretej generácie využíva rekombinantné alebo syntetické antigény, ako sú C6, OspC, p100, p18, p41 a VlsE. Ďalšou sérologickou technikou na detekciu protilátok proti *Borrelia burgdorferi* s. l. je najmä imunoblot (Western blot), ktorý nie je rutinným diagnostickým testom, pretože vyžaduje špecializované laboratórium. (ECDC, 2016). Vo väčšine Európskych krajín a v USA sa využíva dvojstupňový testovací systém, čím sa zvyšuje špecifita finálneho výsledku v porovnaní s použitím iba ELISA testu alebo imunoblotu samostatne. V prvom kroku sa zvyčajne používa ELISA alebo nepriama imunofluorescencia (IFA), a v prípade pozitívnych, či dubioznych výsledkov sa použije konfirmačný test – imunoblot (alebo Western blot) na potvrdenie špecifity antiboréliových protilátok (Seriburi a kol., 2012; Dessau a kol., 2018). Ako pozitívna interpretácia imunoblotu IgG protilátok sa vyžaduje reaktivita aspoň proti dvom alebo viacerým boréliovým antigénom, avšak v prípade IgM postačuje iba proti samotnému OspC (Goettner a kol., 2005; Hunfeld, Kraicz, 2009). Charakteristické spektrum prúžkov v IgG imunoblote môže poskytnúť informáciu, či sa imunitná odpoveď týka včasného alebo neskorého štádia ochorenia, aby sa zlepšila korelácia medzi laboratornými výsledkami a klinickými príznakmi. Úzke spektrum prúžkov s protilátkami proti antigénom včasného štádia (napr. VlsE, OspC, p41) je typické pre skoré prejavy (napr. tvárová obrna) alebo pre latentné štádium ochorenia (Hauser, Lehnert, Wilske, 1999; Goettner a kol., 2005; Hunfeld, Kraicz, 2009). Naopak široké spektrum prúžkov proti antigénom neskorého štádia (napr. p100, p17/p18) súhlasí s klinickými prejavmi neskorého štádia ochorenia (napr. artritída, ACA (Hauser, Lehnert, Wilske, 1999).

V európskej meta-analýze sa zistilo, že imunoblot nepreukazuje vyššiu citlivosť ani špecifitu ako ELISA pri diagnostike LB, a to ani v prípade lymskej artritídy či neuroboréliózy. Celková citlivosť testov pri vyšetrení

séra v prípade lymskej neuroboréliózy bola 81 % pre ELISA a 81 % pre imunoblot s 92 %-nou špecifitou pre ELISA a 94 %-nou špecifitou pre imunoblot. V prípade lymskej artritídy bola citlivosť ELISA 94 % a 95 % pre imunoblot s 97 %-nou špecifitou pre ELISA a 92 %-nou pre imunoblot. Štúdia tiež zdôraznila nižšiu presnosť ELISA testov v porovnaní s imunoblotmi. Keďže obe metódy vykazujú určitý stupeň špecifity, ich dvojstupňové využitie prispieva ku zvýšeniu celkovej špecifity finálneho výsledku (Lee a kol., 2016).

Citlivosť a špecifita týchto testov závisí od infekčného štádia LB. V prípade EM sa nevyžaduje žiadny biologický test, pretože sérologický test je negatívny vo viac ako 50 % prípadov v Európe (Staneck a kol., 2011). EM ako najčastejší klinický príznak LB je lokalizovanou formou boréliózy, ktorá je spájaná so slabou imunitnou odpoveďou. Negatívny výsledok sérologického testu je preto spojený s pravdepodobnosťou nesprávneho vylúčenia diagnózy. Diagnostika lymskej neuroboréliózy je založená na analýze krvi a súčasne CSF (Blanc a kol., 2007). Analýzy CSF odhaľujú skorú lymfocytárnu bunkovú reakciu u viac ako 93 % pacientov s meningoradikulitídou. Sérológia je pozitívna v 70–89 % vzoriek od pacientov s akútnym štádiom lymskej neuroboréliózy a citlivosť v prípade CSF je > 90 % (Ogriň a kol., 2016). V neskorom štádiu lymskej artritídy alebo ACA je citlivosť sérologických testov 95 % a 98 % (Lee a kol., 2016). Výrazná negatívna prediktívna hodnota sérologického vyšetrenia by mala viesť k spochybneniu navrhovanej diagnózy v prípade negatívneho výsledku u pacientov s klinickými príznakmi. Malo by sa tiež pamätať na to, že po účinnej liečbe môžu anti-boréliové protilátky (vrátane IgM) pretrvávajú mesiace alebo dokonca roky po klinickom vyliečení. Sérologické vyšetrenie preto nie je užitočné ani pri sledovaní liečených pacientov a prítomnosť IgM nenaznačuje pretrvávajúcu boréliovú infekciu (Dessau a kol., 2018; Eldin a kol., 2019).

Iné typy diagnostických testov

Stanovenie CXCL13

Chemokínový atraktant B lymfocytov CXCL13 je možné stanoviť vo vysokých koncentráciách v CSF pacientov s konečným štádiom lymskej neuroboréliózy, ale rapídne klesá počas antibiotickej liečby (Senel a kol., 2010; Rupprecht a kol., 2018). Chemokín CXCL13 však môže byť detegovaný aj pri niektorých iných ochoreniach, ako je

neurosyfilis, ľudská vírusová imunodeficiencia a lymfóm (D e r s c h a kol., 2015). Vyšetrovanie chemokínu CXCL13 v sére nie je prínosné. Test môže byť nápomocný pri včasnej neuroborelióze u séronegatívnych pacientov a pre kontrolu účinnosti liečby. V rutinej diagnostike sa nemôže využívať, pretože v súčasnosti chýba metodická štandardizácia a klinické skúsenosti (K r b k o v á a kol., 2018).

Test na dôkaz transformovaných lymfocytov preukazuje prítomnosť *in vitro* lymfocytov schopných transformácie pomocou špecifických boréliových antigénov. Test odráža nedávnú antigénovo špecifickú senzibilizáciu imunitného systému. Chýba však dostatok metodických a klinických informácií pre jeho odporúčenie k rutinnému diagnostickému využitiu (K r b k o v á a kol., 2018).

Ďalšími spôsobmi detekcie LB, ktoré sa však rutinne nepoužívajú sú: vyšetrenie CD57/CD3 subpopulácie lymfocytov, detekcia špecifických protilátok viazaných v cirkulujúcich imunitných komplexoch a ELISPOT (Enzyme-linked ImmunoSpot Assay) (N o r d b e r g a kol., 2012; D e s s a u a kol., 2014).

ZÁVER

V súčasnosti je diagnostika boreliózy založená hlavne na klinických príznakoch a dvojstupňovej detekcii protilátok proti *Borrelia* spp. (najčastejšie ELISA a Western blot), ktorá je však časovo náročnou a tiež nepostačujúcou pri detekcii počiatočných štádií lymskej boreliózy. Mnoho alternatívnych, komerčne dostupných testov a testov vyvíjaných v akreditovaných laboratóriách v Európe, vykazuje odlišnú citlivosť a špecifitu často aj kvôli skríženým reakciám s inými patogénmi. Je preto nevyhnutné zjednotiť testovanie na lymskú boreliózu, zlepšiť citlivosť diagnostických testov najmä v prvých štádiách ochorenia a zároveň zachovať ich vysokú špecifitu, ako aj poskytnúť presné informácie o práve prebiehajúcom štádiu infekcie. Vývoj diagnostického testu z hľadiska „point-of-care“ a stanovenie biomarkerov pre aktívnu infekciu by bol veľkým pokrokom v tejto oblasti.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt „Otvorená vedecká komunita pre moderný interdisciplinárny výskum v medicíne (OPENMED)“, kód ITMS2014+:

313011V455, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

LITERATÚRA

1. Aase, A., et al. (2016): Validate or falsify: Lessons learned from a microscopy method claimed to be useful for detecting *Borrelia* and *Babesia* organisms in human blood. *Infectious Diseases*, 48(6), pp. 411—419. doi: 10.3109/23744235.2016.1144931.
2. Barbour, A. G, Gupta, R. S. (2021): The Family *Borreliaceae* (*Spirochaetales*), a Diverse Group in Two Genera of Tick-Borne Spirochetes of Mammals, Birds, and Reptiles. *Journal of Medical Entomology*, 58(4), pp. 1513—1524. doi: 10.1093/jme/tjab055.
3. Blanc, F., et al. (2007): Relevance of the antibody index to diagnose Lyme neuroborreliosis among seropositive patients. *Neurology*, 69(10), pp. 953—958. doi: 10.1212/01.wnl.0000269672.17807.e0.
4. Cerar, T., et al. (2016): Differences in genotype, clinical features, and inflammatory potential of *Borrelia burgdorferi sensu stricto* strains from Europe and the United States. *Emerging Infectious Diseases*, 22(5), pp. 818—827. doi: 10.3201/eid2205.151806.
5. Charon, N. W., et al. (2012): The unique paradigm of spirochete motility and chemotaxis. *Annual Review of Microbiology*, 66(1912s), pp. 349—370. doi: 10.1146/annurev-micro-092611-150145.
6. Collares-Pereira, M., et al. (2004): First Isolation of *Borrelia lusitanae* from a Human Patient. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(3), pp. 1316—1318. doi: 10.1128/JCM.42.3.1316-1318.2004.
7. Comstedt, P., et al. (2017): The novel Lyme borreliosis vaccine VLA15 shows broad protection against *Borrelia* species expressing six different OspA serotypes. *PLoS ONE*, 12(9), pp. 1—13. doi: 10.1371/journal.pone.0184357.
8. Van Dam, A. P. (2011): Molecular diagnosis of *Borrelia* bacteria for the diagnosis of Lyme disease. *Expert Opinion on Medical Diagnostics*, 5(2), pp. 135—149. doi: 10.1517/17530059.2011.555396.
9. Dersch, R., et al. (2015): The chemokine CXCL13 is elevated in the cerebrospinal fluid of patients with neurosyphilis. *Fluids and Barriers of the CNS*, 12(12), pp. 1—5. doi: 10.1186/s12987-015-0008-8.
10. Dessau, R. B., et al. (2014): The lymphocyte transformation

- test for the diagnosis of Lyme borreliosis has currently not been shown to be clinically useful. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(10), pp. O786—O787. doi: 10.1111/1469-0691.12583.
11. Dessau, R B., et al. (2018): To test or not to test? Laboratory support for the diagnosis of Lyme borreliosis: a position paper of ESGBOR, the ESCMID study group for Lyme borreliosis. *Clinical Microbiology and Infection*, 24(2), pp. 118—124. doi: 10.1016/j.cmi.2017.08.025.
 12. ECDC (2015): Factsheet for health professionals—Lyme borreliosis, Factsheet on Lyme borreliosis, for healthcare professionals. Available at: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/factsheet-lyme-borreliosis-healthcare-professionals> (cit: 30-10-2021).
 13. ECDC (2016): A systematic literature review on the diagnostic accuracy of serological tests for Lyme borreliosis. Stockholm: ECDC. Available at: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/systematic-literature-review-diagnostic-accuracy-serological-tests-lyme> (cit: 30-10-2021).
 14. Eldin, C., et al. (2019): Values of diagnostic tests for the various species of spirochetes. *Medecine et Maladies Infectieuses*, 49(2), pp. 102—111. doi: 10.1016/j.medmal.2019.01.009.
 15. Gern, L. (2009): Life Cycle of *Borrelia burgdorferi sensu lato* and Transmission to Humans. *Current Problems in Dermatology*, 37, pp. 18—30. doi: 10.1159/000213068.
 16. Goettner, G., et al. (2005): Improvement of Lyme Borreliosis Serodiagnosis by a Newly Developed Recombinant Immunoglobulin G (IgG) and IgM Line Immunoblot Assay and Addition of VlsE and DbpA Homologues. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(8), pp. 3602—3609. doi: 10.1128/JCM.43.8.3602.
 17. Golovchenko, M., et al. (2016): A divergent spirochete strain isolated from a resident of the southeastern United States was identified by multilocus sequence typing as *Borrelia bisettii*. *Parasites and Vectors*, 9(1), pp. 4—8. doi: 10.1186/s13071-016-1353-4.
 18. Grimm, D., et al. (2004): Outer-surface protein C of the Lyme disease spirochete: A protein induced in ticks for infection of mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(9), pp. 3142—3147. doi: 10.1073/pnas.0306845101.
 19. Gupta, R. S. (2019): Distinction between *Borrelia* and *Borrelia* is more robustly supported by molecular and phenotypic characteristics than all other neighbouring prokaryotic genera: Response to Margos, et al.: The genus *Borrelia* reloaded (PLoS ONE 13(12): E0208432). *PLoS ONE*, 14(8), pp. 1—22. doi: 10.1371/journal.pone.0221397.
 20. Halperin, J. J. (2015): Nervous System Lyme Disease. *Infectious Disease Clinics of North America*, 29(2), pp. 241—253. doi: 10.1016/j.idc.2015.02.002.
 21. Hauser, U., Lehnert, G., Wilske, B. (1999): Validity of Interpretation Criteria for Standardized Western Blots (Immunoblots) for Serodiagnosis of Lyme Borreliosis Based on Sera Collected throughout Europe. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(7), pp. 2241—2247. doi: 10.1128/JCM.37.7.2241-2247.1999.
 22. Hunfeld, K. P., Kraiczy, P. (2009): When Is the Best Time to Order a Western Blot and How Should It Be Interpreted? *Current Problems in Dermatology*, 37, pp. 167—177. doi: 10.1159/000213074.
 23. Izac, J. R., et al. (2019): Analysis of the antigenic determinants of the OspC protein of the Lyme disease spirochetes: Evidence that the C10 motif is not immunodominant or required to elicit bactericidal antibody responses. *Vaccine*, 37(17), pp. 2401—2407. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.02.007.
 24. Kenedy, M. R., Lenhart, T. R., Akins, D. R. (2012): The role of *Borrelia burgdorferi* outer surface proteins. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 66(1), pp. 1—19. doi: 10.1111/j.1574-695X.2012.00980.x.
 25. Klempner, M. S., et al. (2001): Intralaboratory Reliability of Serologic and Urine Testing for Lyme Disease. *The American Journal of Medicine*, 110(3), pp. 217—219. doi: 10.1016/s0002-9343(00)00701-4.
 26. Krbková, L., et al. (2018): Doporučený postup diagnostiky a léčby lymeské borreliózy. Available at: <https://www.infekce.cz/DPLB18.htm> (cit: 30-10-2021).
 27. Kybicová, K., Lukavská, A., Balátová, P. (2018): Lymeská borrelióza – kultivace *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Lyme disease—cultivation of *Borrelia burgdorferi sensu lato*. *Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie (SZÚ Praha)*, 27(5), pp. 113—115.
 28. Lager, M., et al. (2017): Molecular detection of *Borrelia burgdorferi sensu lato*—An analytical comparison of real-time PCR protocols from five different Scandinavian laboratories. *PLoS ONE*, 12(9), pp. 1—17. doi: 10.1371/journal.pone.0185434.
 29. Leeflang, M. M. G., et al. (2016): The diagnostic accuracy of serological tests for Lyme borreliosis in Europe: A systematic review and meta-analysis. *BMC Infectious Diseases*, 16(1). doi: 10.1186/s12879-016-1468-4.
 30. Liveris, D., et al. (2002): Quantitative detection of *Borrelia burgdorferi* in 2-millimeter skin samples of erythema migrans lesions: Correlation of results with clinical and laboratory

- findings. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(4), pp. 1249—1253. doi: 10.1128/JCM.40.4.1249-1253.2002.
31. Lohr, B., et al. (2018): Laboratory diagnosis of Lyme borreliosis: Current state of the art and future perspectives. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 55(4), pp. 219—245. doi: 10.1080/10408363.2018.1450353.
 32. Maraspin, V., et al. (2016): Borrelial Lymphocytoma in Adult Patients. *Clinical Infectious Diseases*, 63(7), pp. 914—921. doi: 10.1093/cid/ciw417.
 33. Margos, G., et al. (2016): *Borrelia bissetiae* sp. nov. and *Borrelia californiensis* sp. nov. prevail in diverse enzootic transmission cycles. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(3), pp. 1447—1452. doi: 10.1099/ijsem.0.000897.
 34. Margos, G., et al. (2020): Rejection of the name *Borrelia* and all proposed species comb. nov. placed therein. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(5), pp. 3577—3581. doi: 10.1099/ijsem.0.004149.
 35. Margos, G., Sing, A., Fingerle, V. (2017): Published data do not support the notion that *Borrelia valaisiana* is human pathogenic. *Infection*, 45(4), pp. 567—569. doi: 10.1007/s15010-017-1032-1.
 36. Nordberg, M., et al. (2012): Can ELISPOT Be Applied to A Clinical Setting as A Diagnostic Utility for Neuroborreliosis? *Cells*, 1(2), pp. 153—167. doi: 10.3390/cells1020153.
 37. Norris, S. J. (2006): Antigenic variation with a twist—The *Borrelia* story. *Molecular Microbiology*, 60(6), pp. 1319—1322. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05204.x.
 38. Ogrinc, K., et al. (2016): Course and Outcome of Early European Lyme Neuroborreliosis (Bannwarth Syndrome): Clinical and Laboratory Findings. *Clinical Infectious Diseases*, 63(3), pp. 346—353. doi: 10.1093/cid/ciw299.
 39. Pritt, B. S., et al. (2016): *Borrelia mayonii* sp. nov., a member of the *Borrelia burgdorferi sensu lato* complex, detected in patients and ticks in the upper midwestern United States. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(11), pp. 4878—4880. doi: 10.1099/ijsem.0.001445.
 40. Radolf, J. D., et al. (2012): Of ticks, mice and men: understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease *spirochaetes*. *Nature reviews. Microbiology*, 10(2), pp. 87—99. doi: 10.1038/nrmicro2714.
 41. Rupprecht, T. A., et al. (2018): Diagnostic value of cerebrospinal fluid CXCL13 for acute Lyme neuroborreliosis. A systematic review and meta-analysis. *Clinical Microbiology and Infection*, 24, pp. 1234—1240. doi: 10.1016/j.cmi.2018.04.007.
 42. RÚVZ v Banskej Bystrici (2020): Analýza epidemiologickej situácie a činnosti odborov epidemiológie v Slovenskej republike za rok 2020. Available at: https://www.epis.sk/InformacnaCast/Publikacie/VyroczneSpravy/Files/VS_SR_2015.aspx (cit: 30-10-2021).
 43. Scheffold, N., et al. (2015): Diagnostik, Therapie und Prognose der Lyme-Karditis. *Deutsches Arzteblatt International*, 112(12), pp. 202—208. doi: 10.3238/arztebl.2015.0202.
 44. Schnarr, S., et al. (2006): Lyme borreliosis. *Best Practice and Research: Clinical Rheumatology*, 20(6), pp. 1099—1118. doi: 10.1016/j.berh.2006.08.006.
 45. Schutzer, S. E., et al. (2019): Direct Diagnostic Tests for Lyme Disease. *Clinical Infectious Diseases*, 68(6), pp. 1052—1057. doi: 10.1093/cid/ciy614.
 46. Schwarzová, K. (2019): Arbobaktérie, leptospíry, kapnocytoféty, streptobacily – baktérie s patogénnym potenciálom prenosné na človeka. Banská Bystrica: OZ Preveda. Available at: https://www.preveda.sk/media/var/files/Monografia2019_Schwarzova.pdf (cit: 30-10-2021).
 47. Senel, M., et al. (2010): The chemokine CXCL13 in acute neuroborreliosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 81, pp. 929—933. doi: 10.1136/jnnp.2009.195438.
 48. Seriburi, V., et al. (2012): High frequency of false positive IgM immunoblots for *Borrelia burgdorferi* in Clinical Practice. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(12), pp. 1236—1240. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03749.x.
 49. Stanek, G., et al. (2011): Lyme borreliosis: Clinical case definitions for diagnosis and management in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(1), pp. 69—79. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03175.x.
 50. Stanek, G., et al. (2012): Lyme borreliosis. *The Lancet*, 379 (9814), pp. 461—473. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60103-7.
 51. Steere, A. C., et al. (2016): Lyme borreliosis. *Nature Reviews Disease Primers*, 2, pp. 1—18. doi: 10.1038/nrdp.2016.90.
 52. Strnad, M., et al. (2017): Europe-Wide Meta-Analysis of *Borrelia burgdorferi Sensu Lato* Prevalence in Questing Ixodes ricinus Ticks. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(15), pp. 1—16.
 53. Tilly, K., Bestor, A., Rosa, P. A. (2013): Lipoprotein succession in *Borrelia burgdorferi*: Similar but distinct roles for OspC and VlsE at different stages of mammalian infection. *Molecular Microbiology*, 89(2), pp. 216—227. doi: 10.1111/mmi.12271.
 54. Wilske, B., Fingerle, V., Schulte-Spechtel, U. (2007): Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 49(1), pp. 13—21. doi: 10.1111/j.1574-695X.2006.00139.x.



Laboratórna Diagnostika, XXVI, 2, 2021: 31–40

POTENCIÁLNE NOVÉ MARKERY PREDIKCIE KOMPLIKÁCII A PRIEBEHU OCHORENIA COVID-19

NEW POTENTIAL MARKERS FOR PREDICTING THE COMPLICATIONS AND COURSE OF COVID-19

Horňáková Lenka, Ďurfinová Monika

Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie LF UK, Bratislava

e-mail: monika.durfinova@fmed.uniba.sk

prehľadová práca

SÚHRN

Bilancia ľudských životov stratených počas pandémie COVID-19 vo svete je značná, keďže k 2. 11. 2021 prekročil celosvetovo počet úmrtí 5 miliónov. K tomu treba ešte pripočítať náklady na zvýšenú mieru chudoby, narušenie pracovného a súkromného života, rastúce sociálne nepokoje, potrebu riešiť nárast psychologických problémov detí aj dospelých, prevenciu a liečbu závažných diagnóz (onkologické, kardiovaskulárne, metabolické a iné), ktoré boli kvôli pandémie odsúvané. Včasná a presná laboratórna diagnostika ochorenia COVID-19 zohráva významnú úlohu pri spomaľovaní a kontrolovaní pandémie. Po potvrdení prítomnosti SARS-CoV-2 vírusu v organizme sa u symptomatických pacientov sledujú viaceré hematologické a zápalové markery poukazujúce na závažnosť klinického stavu pacienta. Neustále sa však vyhľadávajú a testujú nové vhodné biochemické markery hlavne na predikciu priebehu ochorenia s cieľom maximálne znížiť mortalitu spôsobenú touto vírusovou infekciou, ale zároveň aj posilniť globálnu pripravenosť a schopnosť lepšie reagovať na podobné situácie v budúcnosti.

Kľúčové slová: Covid-19; laboratórne markery; prognóza; závažnosť

ABSTRACT

The balance of human lives lost during the COVID-19 pandemic is significant, as more than 5 million people have died (by November 2021), in addition to the costs of increased poverty, disruption of work and private life and growing social unrest. Early and accurate laboratory diagnosis of Covid-19 plays an important role in slowing down and controlling the pandemics. After confirmation of the presence of the SARS-CoV-2 virus in the human body, there are several hematological and inflammation markers monitored in symptomatologic patients, which can indicate severity of the clinical state of the patient. However, new suitable biochemical markers are constantly being sought and tested, mainly to predict the course of the disease in order to minimize mortality caused by this viral infection, but also to strengthen global preparedness and ability to respond better to similar situations in the future.

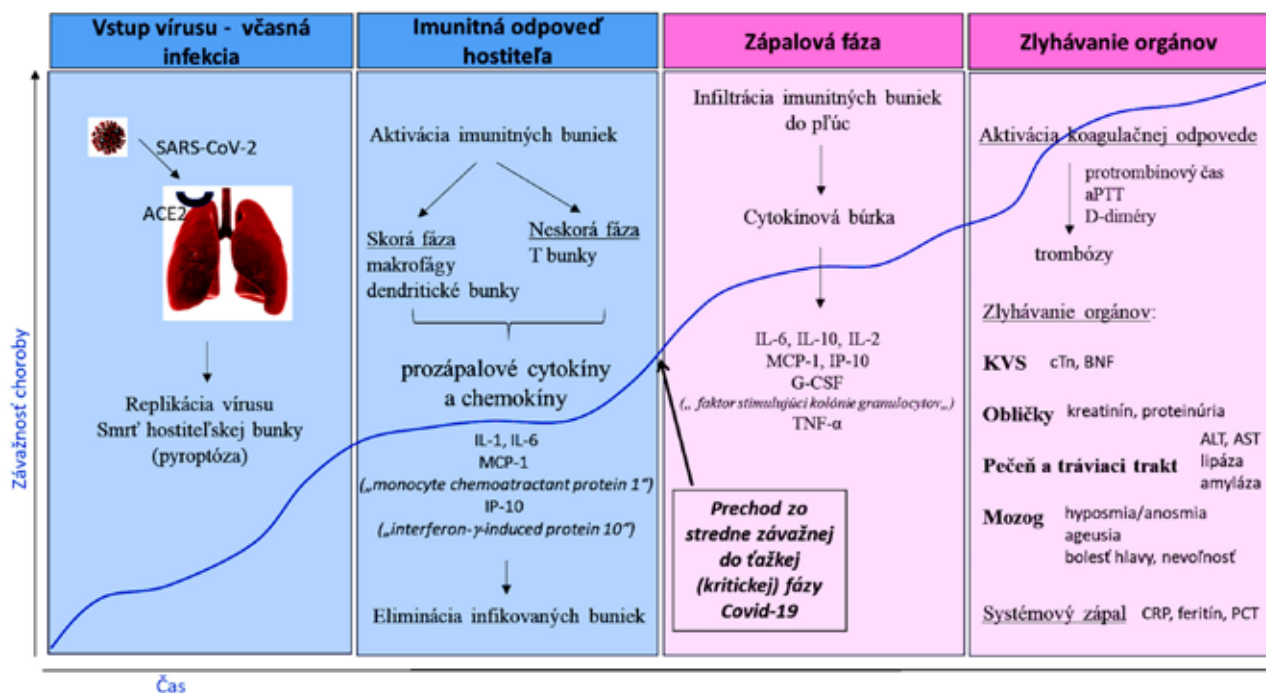
Key words: Covid-19; laboratory markers; prognosis; severity

ÚVOD

Infekčné ochorenie Covid-19 vyvolané koronavírusom SARS-CoV-2 bolo prvýkrát zachytené u pacientov so závažnými respiračnými symptómami v roku 2019 v čínskom meste Wu-chan. Odtiaľ sa rozšírilo do celého sveta a vyvolalo celosvetovú pandémiu, pri ktorej sa úmrtnosť potvrdených pozitívnych prípadov k novembriu 2021 podľa CSSE (the Center for Systems Science and Engineering at Johns Hopkins University) pohybovala od 0,1 % v Laose do 19 % v Jemene, na Slovensku to bolo okolo 3 % (<https://coronavirus.jhu.edu/>). Celosvetovo bola podľa CSSE úmrtnosť k uvedenému dátumu niečo viac ako 2 %. Dôležitou súčasťou efektívnej terapie ochorenia je včasná diagnostika, predikcia komplikácií a odvrátenie prechodu ochorenia do závažných klinických stavov. Preto sú dôležitou súčasťou diagnostiky popri vyšetrovaní klinického stavu pacienta aj vhodné laboratórne markery. Prehľadový článok je zhrnutím súčasne známych a používaných biochemických markerov Covid-19 u pacientov s klinickými symptómami hlavne respiračných komplikácií, a zároveň popisuje markery, ktoré by sa v budúcnosti mohli využívať najmä pri predikcii ďalšieho priebehu ochorenia hospitalizovaných pacientov s Covid-19 s cieľom včasne zachytiť zhoršovanie ich klinického stavu.

Stručný mechanizmus spustenia infekcie Covid-19 u človeka

SARS-CoV-2 (angl. severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) je vírus patriaci do skupiny RNA-vírusov. SARS-CoV-2 infikuje bunky tým, že sa viaže na angiotenzín konvertujúci enzým 2 (ACE2). Tento membránový proteín s enzymatickou aktivitou sa fyziologicky podieľa na modulácii účinkov angiotenzínu II. Tvorba angiotenzínu II vedie k zvýšeniu krvného tlaku cez stimuláciu receptorov spriahnutých s inozitolfosfátovou kaskádou v endotelových bunkách ciev. ACE2 štiepi angiotenzín II na kratšie molekuly, čím potláča aktiváciu systému renín-angiotenzín-aldosterón (RAAS) a je teda dôležitý pri fyziologickej regulácii hladín angiotenzínu II. ACE2 je exprimovaný v mnohých bunkách, vrátane pľúcnych alveolárnych pneumocytov, endotelových buniek kapilár, buniek myokardu, obličiek i ďalších (Zou a kol., 2020; Vadauganathan a kol., 2020). Internalizácia ACE2 po vírusovej interakcii vedie k zníženiu jeho množstva v plazmatických membránach, čo následne vyvolá zvýšenie angiotenzínu II. Ten vo vyššej miere prostredníctvom receptora typu I (AT1R) aktivuje zápalové cesty vedúce k rozsiahlemu alveolárnemu a intersticiálnemu zápalu, ktorý v najzávažnejších prípadoch prechádza do vzniku „cytokínovej búrky“ (obrázok 1) nepriaznivo ovplyvňujúcej viacero orgánov (D'Ardes



Obrázok 1: Hlavné aspekty patofyziologickej progresie infekcie vírusom SARS-CoV-2 a niektoré markery jednotlivých fáz infekcie.

a kol., 2020). Jedným z najskorších dôsledkov rapídnej infekcie vírusovými časticami a nadmernej produkcie cytokínov a chemokínov je apoptóza pľúcnych epitelových a endotelových buniek (Channa p p a n a v a r, P e r l m a n, 2017). V ďalšom kroku dochádza k zvýšenej perivaskulárnej infiltrácii alternatívne aktivovaných markofágov, neutrofilov a fibroblastov, čo je sprevádzané rozsiahlym ukladaním fibrínu s následným vznikom akútneho poškodenia pľúc, vzniku syndrómu akútnej respiračnej tiesne (ARDS) a ďalším závažným syndrómom často vedúcim až k smrti pacienta (Channa p p a n a v a r, P e r l m a n, 2017).

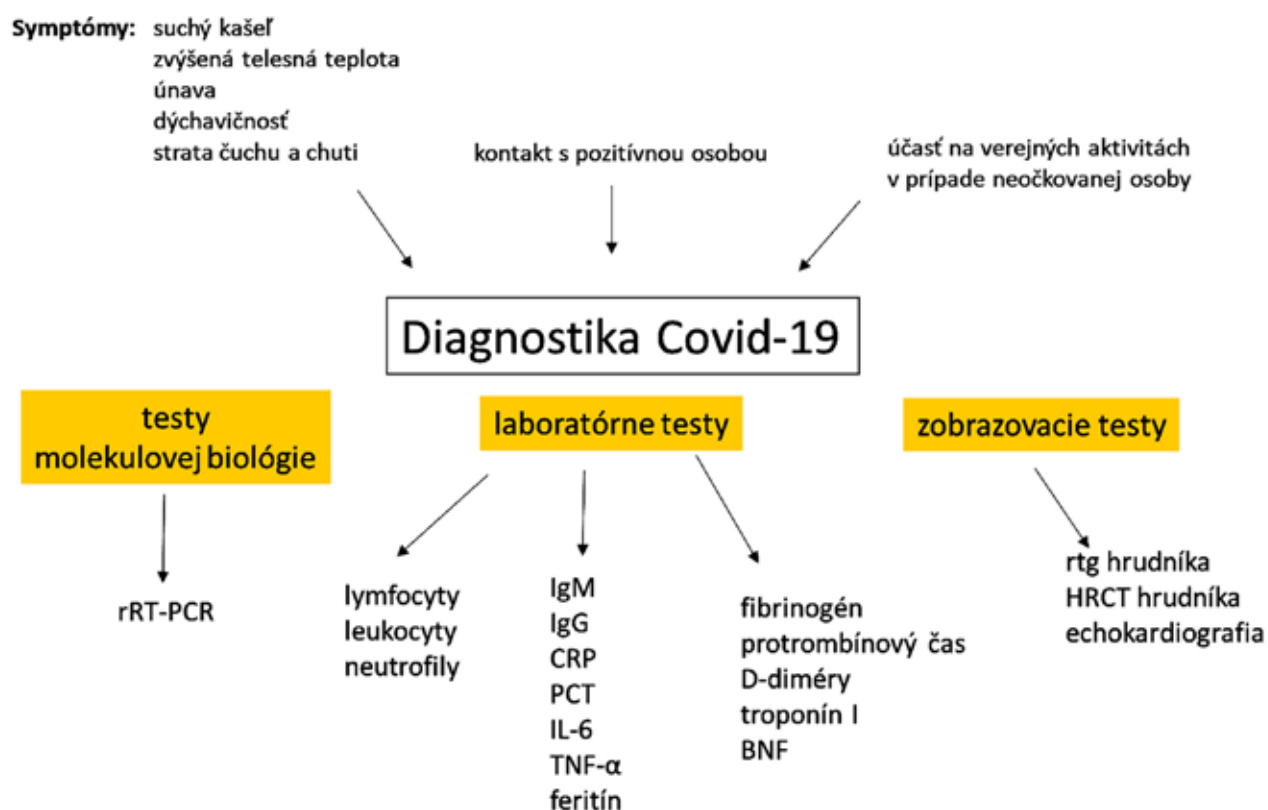
Čo všetko prispieva k vzniku „cytokínovej búrky“ vyvolanej SARS-CoV-2, nie je úplne známe, predpokladá sa však, že je tento proces obdobný ako pri iných koronavírusoch (SARS a MERS). Pri týchto ochoreniach zohráva úlohu rýchle rozmnožovanie sa vírusu, čo by mohlo viesť k silnému cytopatickému účinku a následne aj vyššej produkcii prozápalových cytokínov a chemokínov napadnutými pľúcnyimi epitelialnými bunkami (P e r l m a n, N e t l a n d, 2009; Channa p p a n a v a r, P e r l m a n, 2017). Tak tiež bolo pri animálnych ale i ľudských výskumoch zistené,

že po vírusovej infekcii dochádza k hromadeniu monocytov-makrofágov a neutrofilov v pľúcach, pričom tieto typy buniek sú dominantným zdrojom cytokínov a chemokínov pri smrteľných prípadoch SARS (N i c h o l l s a kol., 2003).

Klinická diagnostika Covid-19 a laboratórne markery komplikácií a predikcie priebehu ochorenia v súčasnosti

Po prijatí pacienta s podozrením na ochorenie Covid-19 so symptómami, ktorými sú najčastejšie horúčka, suchý kašeľ, slabosť, strata čuchu a chuti, ale i ďalšími ako sú problémy s dýchaním, bolesť hlavy a svalov, bolesť hrdla či nevoľnosť (WHO, 2021), sa prítomnosť vírusovej RNA potvrdzuje RT-PCR testom. Zároveň sa u symptomatických pacientov stanovujú viaceré hematologické, zápalové a koagulačné parametre (obrázok 2).

Pacienti s potvrdeným ochorením Covid-19 sa podľa priebehu klasifikujú do štyroch skupín (spracované podľa: NIH, 2021). Prvú skupinu tvoria pacienti s mier- nym priebehom ochorenia, čiže jednotlivci s akýmkoľvek symptómom COVID-19 (napr. horúčka, kašeľ a pod.) bez



Obrázok 2: Hlavný diagnostický protokol pre Covid-19.

dýchavičnosti alebo abnormálnej snímky hrudníka. Ďalšiu skupinu tvoria pacienti so stredne závažným priebehom ochorenia, ktorí podľa snímky alebo klinického hodnotenia vykazujú príznaky ochorenia dolných dýchacích ciest, ale saturácia krvi kyslíkom (SpO_2) je $\geq 94\%$. Závažný priebeh ochorenia je charakterizovaný frekvenciou dýchania ≥ 30 dychov za minútu, $\text{SpO}_2 < 94\%$; pomer arteriálneho parciálneho tlaku kyslíka k frakcii vdychovaného kyslíka ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) je nižší ako 300 mmHg alebo je na snímke pozorovaná viac ako 50 % prítomnosť pľúcnych infiltrátov. Medzi jedincov s kritickým priebehom ochorenia patria pacienti s respiračným zlyhaním (vyžadujúcim mechanickú ventiláciu), septickým šokom a/alebo dysfunkciami viacerých orgánov.

Možnými príčinami tohto obrazu podobného sepse môže byť už spomenutá dysregulovaná imunitná odpoveď, ktorá nie je schopná kontrolovať produkciu množstva cytokínov a chemokínov, konkrétne IL-2R, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , ale i ďalších (Leisman a kol., 2020). Z krvných nálezov u závažnejších priebehov Covid-19 je okrem zvýšených hladín cytokínov a chemokínov pozorovaný zvýšený počet leukocytov, neutrofilov, biomarkerov infekcie (ako CRP, PCT a feritín) a znížený počet lymfocytov (Hou a kol., 2020). Pneumónia vyvolaná ochorením COVID-19 zobrazuje širokú škálu nálezov v závislosti od závažnosti ochorenia a časového priebehu a môže sa prekrývať s rôznymi infekčnými a neinfekčnými pľúcnymi ochoreniami (Carrubi a kol., 2021).

Hematologické parametre

Množstvo leukocytov a lymfocytov je na začiatku ochorenia, a teda vtedy, kedy ešte symptómy nie sú špecifické, stále v norme alebo iba mierne znížené (Tepos a kol., 2020). S vývinom ochorenia, po 7 až 14 dňoch od nástupu symptómov, dochádza k výraznému nárastu leukocytov. Zvyšovanie množstva leukocytov počas hospitalizácie pacienta môže signalizovať klinické zhoršenie stavu pacienta a zvýšené riziko budúcich komplikácií (Henry a kol., 2020). Takto významné zvýšenie množstva bielych krviniek by mohlo súvisieť s narastajúcim množstvom neutrofilov, nakoľko množstvo lymfocytov, monocytov, či eozinofilov má klesajúci charakter (Henry a kol., 2020).

Množstvo lymfocytov v periférnej krvi je na začiatku ochorenia len mierne znížené (Tepos a kol., 2020), pričom pri zhoršovaní klinického stavu je pozorovaný už signifikantný pokles a vznik lymfocytopenie (Huang,

Pranata, 2020). Znížené množstvo lymfocytov bolo pozorované u pacientov s ARDS, závažným priebehom ochorenia vyžadujúcim prijatie na jednotku intenzívnej starostlivosti (JIS), ako aj u pacientov, ktorí neprežili (Huang, Pranata, 2020). Signifikantný rozdiel v množstve lymfocytov koreloval s mortalitou pacientov (Bairwa a kol., 2021). Vznik lymfocytopenie u pacientov v kritickom stave sa môže pripisovať viacerým mechanizmom. Prvý mechanizmus popisuje priamu vírusovú inváziu lymfocytov, ktoré na svojom povrchu v istej miere exprimujú ACE2 (Xu a kol., 2020), ktoré sú miestom vstupu vírusu do bunky (Zhou a kol., 2020). Takýmto spôsobom dochádza k priamemu infikovaniu lymfocytov vírusom, čo v konečnom dôsledku môže vyvolať ich lýzu a redukciu v ich počte (Tan a kol., 2020). Ďalší mechanizmus opisuje vplyv zvýšeného množstva interleukínov, najčastejšie IL-6, TNF- α ale i ďalších, ktoré by mohli vyvolať apoptózu lymfocytov (Aggarwal a kol., 1999), čo už bolo preukázané pri sepe (Urra a kol., 2020). Podstatná aktivácia cytokínov tiež môže byť spojená s atrofiou lymfoidných orgánov vrátane sleziny, čo následne zhoršuje premenu lymfocytov a vyvoláva tak ich redukciu (Singh a kol., 2014). U pacientov, u ktorých dochádza k zlepšeniu stavu, je pozorovaný aj nárast v % zastúpení lymfocytov, čo prispieva k využitiu toho parametra nie len ako prediktora závažnosti, ale i rekonvalescencie pre ochorenie Covid-19 (Tan a kol., 2020).

Zmeny v množstve leukocytov sa tiež využívajú aj pri stanovení pomeru neutrofilov k lymfocytom (NLR). NLR je bežne využívaným indikátorom zápalu, napríklad pri sepe (Huang a kol., 2020). U pacientov, ktorí boli prijatí na JIS dochádzalo pri zhoršovaní klinického stavu nie len k poklesu v množstve lymfocytov, ale aj súčasnému nárastu v hladinách neutrofilov. Čím signifikantnejší je nárast neutrofilov a zároveň aj pokles lymfocytov, tým viac narastá NLR demonštrujúci vyššiu mieru zápalu a prechod do kritického stavu (Yang a kol., 2020).

Zápalové markery

Ďalší významný parameter pri posudzovaní stavu pacienta, ktorý má taktiež dobrú prediktívnu hodnotu pre zhoršenie stavu pacienta, je interleukín 6 (IL-6). Hladiny IL-6 sú signifikantne zvýšené u viac ako polovice prijatých pacientov (Chen a kol., 2020), pričom vyššia hodnota tohto parametra koreluje so závažnosťou ochorenia a bilaterálnym postihnutím pľúc (Li a kol., 2020).

Kombináciou všetkých zápalových markerov, najmä cytokínov je možné získať obraz o vývoji syndrómu systémovej zápalovej reakcie (SIRS) u pacientov s ťažkým priebehom ochorenia (H e n r y a kol., 2020). Závažný priebeh Covid-19 je spojený s hypercytokinémiou (G i a m a r e l l o s - B o u r b o u l i s a kol., 2020), ktorá je vyvolaná najmä trvalou produkciou cytokínov ako je IL-6 a TNF- α cirkulujúcimi monocytmi, čím sa odlišuje Covid-19 od chrípky, či bakteriálnej sepsy (A u d o a kol., 2020).

Unikátnou črtou „cytokínovej búrky“ je výrazné zvýšenie IL-10, ktoré koreluje s nárastom IL-6 i ďalších zápalových markerov, ako je napríklad CRP (L u a kol., 2021). Zvýšenie koncentrácie IL-10 môže poukazovať na snahu organizmu brániť sa hyperinflamácii spôsobenej prudkým nárastom hladín cytokínov, avšak pozorovania vzťahu medzi závažnosťou ochorenia a hladinami IL-10 naznačujú, že IL-10 buď nie je schopný potlačiť zápal alebo nadobúda inú funkciu (I s l a m a kol., 2021). IL-10 je jedným z hlavných protizápalových cytokínov (mechanizmus negatívnej spätnej väzby), no v súčasnosti sa uvažuje, že aj keď skorá indukcia IL-10 po infekcii vírusom SARS-CoV-2 počas iniciačnej fázy v pľúcach by mohla mať síce protizápalovú funkciu, jeho následný nárast by mohol spôsobiť jeho prispievanie k zápalovej reakcii (L u a kol., 2021). Podobný mechanizmus je opísaný aj v súvislosti s ľudskou endotoxémiou, kde IL-10 stimuluje zvýšenie produkcie INF- γ (L a u w a kol., 2000), a teda IL-10 by mohol zosilňovať zápal súvisiaci s vírusovou sepsou pozorovanou u niektorých kriticky chorých pacientov (L i a kol., 2020). Nech už je nárast tohto interleukínu vyvolaný akýmkoľvek mechanizmom, faktom zostáva, že u kriticky chorých pacientov s Covid-19 sú pozorované dramaticky zvýšené hladiny IL-10, ktoré korelujú so závažnosťou ochorenia (L u a kol., 2021).

Spolu s interleukínmi dochádza k nárastu aj ďalších zápalových markerov ako je feritín, prokalcitonín či C-reaktívny proteín.

C-reaktívny proteín (CRP) je reaktantom akútnej fázy zápalu, pričom jeho hladiny sú zvyšované pri mnohých ochoreniach súvisiacich s infekciami a zápalom. Jeho hladiny výrazne stúpajú už po niekoľkých hodinách od vzniku najmä bakteriálneho zápalu a za zvýšenú produkciu je zodpovedný najmä IL-6. Dnes je už známe, že za zvýšenou koncentráciou CRP môže byť aj vírusová infekcia (M e l b y e a kol., 2004). V skorých štádiách ochorenia Covid-19 bol pozorovaný postupný nárast hladín CRP,

pričom najvyššie hladiny boli pozorované u kritických pacientov a postupne sa znižovali aj so závažnosťou stavu pacientov (W a n g, 2020).

Prokalcitonín (PCT) je glykoproteín, ktorý sa za fyziologického stavu syntetizuje tyroïdnými parafolikulárnymi C bunkami. PCT však môže byť počas bakteriálnej infekcie syntetizovaný a uvoľňovaný aj z extrafolikulárných buniek, na ktoré pôsobia pro-zápalové cytokíny, najmä TNF- α a IL-6 (L i p p i, C e r v e l l i n, 2018). U pacientov s vážnejším priebehom ochorenia Covid-19 bola pozorovaná približne 4-násobne vyššia hladina PCT oproti pacientom s miernym priebehom a u kritických pacientov išlo až o 8-násobný nárast voči skupine s miernym priebehom (H u a kol., 2020). Navyše u pacientov, ktorí boli z nemocnice prepustení, sa počas doby rekonvalescencie pozorovalo postupné znižovanie hladín. Tento parameter je ďalším vhodným markerom pri posudzovaní možného rizika závažnosti priebehu ochorenia.

Feritín je ďalším reaktantom akútnej fázy, jeho koncentrácie sa zvyšujú pri zápalových reakciách a pozitívne korelujú s ďalšími zápalovými markermi. Pri retrospektívnej analýze bolo zistené, že koncentrácie feritínu u pacientov s klinicky miernymi príznakmi vykazovali normálne hodnoty oproti neskôr kritickým prípadom, kde bola pozorovaná hyperferitinémia (G ó m e z - P a s t o r a a kol., 2020). Rozdiely boli tiež pozorované medzi pacientami, ktorí boli po prekonaní ochorenia z nemocnice prepustení oproti pacientom, ktorí nakoniec ochoreniu podľahli (G ó m e z - P a s t o r a a kol., 2020). Zvýšenie hladín feritínu nad určitú hranicu u niektorých pacientov predstavovalo závažné pľúcne postihnutie zistené aj pomocou CT vyšetrenia (C a r u b b i a kol., 2021).

Koagulačné parametre

Paralelne so systémovým zápalom dochádza k aktivácii koagulačnej kaskády cestou endotelu a tkanivového faktora (L e v i a kol., 2020; T a n g a kol., 2020). D-diméry sú malé proteínové fragmenty v krvnej plazme tvorené degradáciou fibrínu. U pacientov s COVID-19 sú významne zvýšené (H e l m s a kol., 2020) a pravdepodobne odrážajú trombózu pľúcneho cievneho lôžka a fibrinolýzu (D e n n i s M c G o n a g l e a kol., 2020). Základná príčina zvýšených hladín D-dimérov a trombotických prejavov môže byť dôsledok patofyziologicky odlišnej vírusovej koagulopatie alebo súvisí s aktiváciou koagulačného systému pri závažnom zápale, pričom superinfekcia a dysfunk-

cia orgánov môžu byť ďalšími možnými príčinami (W o o l, M i l l e r, 2021). U pacientov so závažným priebehom ochorenia a pacientov, ktorí ochoreniu podľahli, sa zároveň znižoval priemerný počet krvných doštičiek a predlžoval sa priemerný protrombínový čas, čo podporuje názor, že u pacientov infikovaných COVID-19 môže existovať riziko rozvoja diseminovanej intravaskulárnej koagulácie (P o l i m e n i a kol., 2021). Je však potrebné podotknúť, že pri porovnaní ochorenia Covid-19 s bakteriálnou sepsou spojenou s koagulopatiou je predĺženie protrombínového času, aktivovaný parciálny tromboplastínový čas, či zníženie aktivity antitrombínu menej časté (I b a a kol., 2020).

Potenciálne nové pľúcne markery

Nakoľko pandémia Covid-19 nie je stále v súčasnosti odvrátená, vyhľadávajú a testujú sa ďalšie vhodné markery pre zvýšenie špecifickosti a záchytu zhoršujúceho sa stavu pacientov. Potenciálnych „adeptov“ je mnoho (VCAM-1, P-selektín, E-selektín, RAGE, CXCL10, CCL3, MCP1...), nie všetky sa však ukazujú byť vhodným markerom pľúcneho poškodenia.

Faktor stimulujúci kolónie granulocytov a makrofágov

Jedným zo skúmaných markerov je faktor stimulujúci kolónie granulocytov a makrofágov (GM-CSF). Jeho úlohou spolu s faktorom stimulujúcim kolónie makrofágov (M-CSF) a faktorom stimulujúcim kolónie granulocytov (G-CSF) je podieľanie sa na produkcii monocytov, makrofágov, dendritických buniek a granulocytov (neutrofilov, eozinofilov a bazofilov) z progenitorových buniek (W i k t o r - J e d r z e j c z a k a kol., 1990; L i e s c h k e a kol., 1994; D a i a kol., 2002). Zatiaľ čo M-CSF a G-CSF sú v krvi detekovateľné za fyziologických podmienok, a teda pravdepodobne hrajú úlohu v homeostáze myelopoézy, hladiny GM-CSF sú takmer nedetekovateľné a predpokladá sa, že za normálneho stavu nemajú dôležitú úlohu pri udržiavaní tejto homeostázy (S t a n l e y a kol., 1994; B e c h e r a kol., 2016). GM-CSF je však v prípade infekcií kritickým homeostatickým faktorom v pľúcnych alveolách, kde slúži na vývoj a dlhodobé udržiavanie alveolárnych makrofágov (T r a p n e l l a kol., 2003; G u i l l i a m s a kol., 2013). Tento faktor zabezpečuje produkciu špecifických dendritických buniek, ktoré sú kriticky dôležité pri iniciácii CD8+ T buniek, čím môže zohrávať dôležitú úlohu pri obrane pľúc

hostiteľa (G r e t e r a kol., 2012; U n k e l a kol., 2012). Počas zápalu dochádza k jeho zvýšenej produkcii viacerými typmi buniek, vrátane epitelálnych buniek a leukocytov s následným možným iniciovaním reakcií vrodenej i adaptívnej imunity (L a n g a kol., 2020). Je známe, že k zvýšeniu GM-CSF dochádza pri mnohých ochoreniach, ktoré sú podobné neskorším štádiám Covid-19, ako napríklad SARS (R e g h u n a t h a n a kol., 2005), ARDS (M a t u t e - B e l l o a kol., 1997), syndróm uvoľnenia cytokínov (A h m e d, 2019) a pod. Počas ochorenia dochádza k jeho aberantnej produkcii s následným vznikom zápalu, chemotaxie, poškodenia tkaniva a zvýšenej produkcie cytokínov (H a m i l t o n a kol., 2016; H a m i l t o n, 2020). Pri ochorení Covid-19 boli v prípade stredne ťažkých a ťažkých prípadov hodnoty GM-CSF výrazne zvýšené a v priebehu času zostávali jeho hladiny relatívne stabilné. Vznikla tak domnienka, že zmeny v tomto parametri sa budú prejavovať už počas počiatočných fáz ochorenia. Počas prvých 4 dní od nástupu symptómov bolo u ťažkých prípadov pozorované výrazne zvýšenie niekoľkých parametrov (napríklad IL-6, IL-2), no rovnako aj GM-CSF oproti skupine so stredne ťažkým priebehom (T h w a i t e s a kol., 2021). Navyše je tento typ markera nielen dobrým prediktívnym parametrom pre odlíšenie stredne ťažkých a ťažkých priebehov ochorenia Covid-19 v skorých štádiách, ale je tiež cieľom mnohých výskumov pre vývin terapie (L a n g a kol., 2020).

Surfaktant proteín D

Surfaktant proteín D (SP-D) je súčasťou rodiny proteínov nazývaných kolektiny (lektíny typu C obsahujúce kolagén) a je syntetizovaný a uvoľňovaný z alveolárnych buniek II typu. Tieto proteíny sú súčasťou vrodenej imunity, viažu sa na mikroorganizmy čím môžu spustiť ich elimináciu pomocou opsonizácie, zvýšenia fagocytózy alebo spustenia produkcie oxidu dusnatého. Sú tiež schopné iniciovať adaptívnu imunitu prostredníctvom buniek prezentujúcich antigén (napr. makrofágy, dendritické bunky) a modulovať množstvo chemokínov a cytokínov. V prípade infekcie dochádza k proteolytickému rozpadu SP-D v pľúcach, pričom sa mení na trimernú formu a následne vytvára oligoméry. Pľúcny SP-D prechádza do krvného obehu v dôsledku straty integrity vzduchovo-krvnej bariéry v pľúcach (A l a y a kol., 2021) a táto cirkulujúca forma SP-D sa stáva biomarkerom poukazujúcim na poškodenie pľúc (S o r e n s e n, 2018). Ukázalo sa, že sérové hladiny

SP-D sú spojené s vývojom, progresiou a aj závažnosťou rôznych pľúcnych chorôb (W a r e a kol., 2013). V prípade vírusu SARS-Cov-2 dochádza k rozpadu pneumocytov typu II v pľúcach, produkcii zmenených surfaktantov, čo vedie k vzniku dyspnoe, ARDS a v najzávažnejších prípadoch aj k respiračnému zlyhaniu (G h a t i a kol., 2021). V akútnej fáze bola hladina SP-D v sére zvýšená u pacientov s ťažkou pneumóniou COVID-19 v porovnaní s pacientmi s mier- nym priebehom, čo naznačuje, že hladina SP-D v sére úzko súvisí so závažnosťou ochorenia a môže slúžiť ako prvý potenciálny biomarker závažnosti ochorenia na stra- tifikáciu pacientov s COVID-19 (T o n g a kol., 2021). Bolo tiež pozorované, že sérové hladiny SP-D boli v období po- čas zotavenia výrazne znížené v porovnaní s hladinami stanovenými pri prijatí u všetkých pacientov s COVID-19 (T o n g a kol., 2021). Taktiež boli pozorované signifikant- né rozdiely v koncentráciách medzi pacientmi s kritickým priebehom Covid-19 a pacientami s komunitne získanou pneumóniou, pričom sa zistilo, že u pacientov s Covid-19 sú koncentrácie tohto markera vyššie (A l a y, L a l o g l u, 2021).

Angiopoetín-2 a rozpustná medzibunková adhézna molekula-1

Angiopoetín-2 (Ang-2) a rozpustná medzibunková adhézna molekula-1 (ICAM-1) sa využívajú ako markery endotelového poškodenia, pričom v predchádzajúcich štúdiách boli skúmané ako biomarker pri prognóze mor- tality pacientov s klasickým ARDS (C a l f e e a kol., 2008, C a l f e e a kol., 2012). Tieto markery by teda mohli mať prognostickú relevanciu aj pri ARDS vzniknutej pri Co- vid-19. Vyššie hladiny Ang-2 boli pozorované v súvislos- ti so zvýšeným pľúcny cievny únikom (B h a n d a r i a kol., 2006; P a r i k h a kol., 2006) a zvýšená expresia ICAM-1 pľúcny endotelovými bunkami v reakcii na zá- pal (C a l f e e a kol., 2008; P a n a kol., 2020). Ďalšie štú- die naznačujú, že ICAM-1 môže viazať alveolárne makrofá- gy a zvyšovať produkciu zápalových cytokínov v alveolách (S c h m a l a kol., 1998). Hodnoty pre Ang-2 a ICAM-1 stanovené pri prijímaní na JIS boli vyššie u pacientov, ktorí ochoreniu Covid-19 podľahli oproti pacientom, ktorí pre- žili (S p a d a r o a kol., 2021). ICAM-1 bol navyše vhod- ným parametrom aj pri sledovaní stavu pacientov v čase – u pacientov, ktorí prežili boli hodnoty v čase po prijímaní na JIS nižšie ako u pacientov, ktorí neprežili, a počas hos- pitalizácie boli signifikantnejšie poklesy v hladinách toh-

to parametra u preživších pacientov (S p a d a r o a kol., 2021). Otázkou však zostáva, či sú tieto markery vhodné aj pri rozlišovaní klasického ARDS od ARDS vzniknutého pri ochorení Covid-19. U pacientov s klasickým ARDS boli po- zorované nižšie koncentrácie Ang-2 aj ICAM-1 oproti pa- cientom s Covid-19 súvisiacim ARDS (S p a d a r o a kol., 2021), čím sa tieto parametre stávajú ešte viac využiteľ- nými pri predikcii a rozlišovaní typov komplikácií u pacien- tov hospitalizovaných na JIS. Vyššie hodnoty týchto dvoch parametrov pľúcneho poškodenia u Covid-19 navodenom ARDS podporujú dôležité zistenia odlišnej patofyziolo- gickej dráhy oproti klasickému ARDS, ktoré boli nedávno navrhnuté (G a t t i n o n i, C h i u m e l l o a kol., 2020; R o b b a a kol., 2020).

ZÁVER

Identifikácia spoľahlivých markerov u pacientov s CO- VID-19 by mohla napomôcť pri klinickom rozhodovaní, prispôsobovaní terapeutických prístupov a v konečnom dôsledku aj zlepšovaní starostlivosti a prognózy vývo- ja ochorenia u týchto pacientov. Súčasnými markermi je dnes možné odlíšiť menej závažné prípady od tých ťažkých a pomocou nových markerov by mohlo byť možné odha- liť takých pacientov, ktorým hrozí riziko vývinu kritického priebehu tohto ochorenia už v začiatkoch štádiách.

LITERATÚRA

1. Aggarwal, S., Gollapudi, S., Gupta, S. (1999): Increased TNF-alpha-induced apoptosis in lymphocytes from aged humans: changes in TNF-alpha receptor expression and ac- tivation of caspases. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 162(4), p. 2154—2161. Dostupné na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9973490/> (Accessed: September 10, 2021).
2. Ahmed, O. (2019): CAR-T-cell neurotoxicity: hope is on the horizon. *Blood*, 133(20), p. 2114—2116. doi: 10.1182/blood-2019-03-900985.
3. Alay, H., Laloglu, E. (2021): The role of angiopoietin-2 and surfactant protein-D levels in SARS-CoV-2-related lung inju- ry: A prospective, observational, cohort study. *Journal of Med- ical Virology*, 93(10), p. 6008—6015. doi: 10.1002/jmv.27184.
4. Audo, A., et al. (2020): *Acute Pulmonary Embolism in SARS- CoV-2 Infection Treated With Surgical Embolectomy*. The

- annals of thoracic surgery, 110(5), p. e403—e404. doi: 10.1016/J.ATHORACSUR.2020.04.013.
5. **Bairwa, M., et al. (2021):** Hematological profile and biochemical markers of COVID-19 non-survivors: A retrospective analysis. *Clinical Epidemiology and Global Health*, 11, p. 100770. doi: 10.1016/J.CEGH.2021.100770.
6. **Becher, B., Tugues, S., Greter, M. (2016):** GM-CSF: From Growth Factor to Central Mediator of Tissue Inflammation. *Immunity*, 45(5), p. 963—973. doi: 10.1016/j.immuni.2016.10.026.
7. **Bhandari, V., et al. (2006):** Hyperoxia causes angiopoietin 2-mediated acute lung injury and necrotic cell death. *Nature Medicine*, 2006 12:11, 12(11), p. 1286—1293. doi: 10.1038/nm1494.
8. **Calfee, C. S., et al. (2008):** Soluble intercellular adhesion molecule-1 and clinical outcomes in patients with acute lung injury. *Intensive Care Medicine*, 2008 35:2, 35(2), p. 248—257. doi: 10.1007/S00134-008-1235-0.
9. **Calfee, C. S., et al. (2012):** Plasma angiopoietin-2 in clinical acute lung injury: Prognostic and pathogenetic significance. *Critical Care Medicine*, 40(6), p. 1731—1737. doi: 10.1097/CCM.0B013E3182451C87.
10. **Carubbi, F., et al. (2021):** Ferritin is associated with the severity of lung involvement but not with worse prognosis in patients with COVID-19: data from two Italian COVID-19 units. *Scientific Reports*, 11(1), 4863. doi: 10.1038/s41598-021-83831-8.
11. **Channappanavar, R., Perlman, S. (2017):** Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology, *Seminars in Immunopathology*, 39(5), p. 529. doi: 10.1007/S00281-017-0629-X.
12. **Chen, R., et al. (2020):** Longitudinal hematologic and immunologic variations associated with the progression of COVID-19 patients in China. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 146(1), p. 89. doi: 10.1016/J.JACI.2020.05.003.
13. **Clinical Spectrum|COVID-19 Treatment Guidelines** (no date). Available at: <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/overview/clinical-spectrum/> (Accessed: October 11, 2021).
14. **Dai, X. M., et al. (2002):** Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopenia, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood*, 99(1), p. 111—120. doi: 10.1182/BLOOD.V99.1.111.
15. **D'Ardes, D., et al. (2020):** COVID-19 and RAS: Unravelling an Unclear Relationship. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8), 3003. doi: 10.3390/IJMS21083003.
16. **Gattinoni, L., Chiumello, D., Rossi, S. (2020):** COVID-19 pneumonia: ARDS or not? *Critical Care*, 2020 24: 1, 24(1), p. 1—3. doi: 10.1186/S13054-020-02880-Z.
17. **Ghati, A., et al. (2021):** Exogenous pulmonary surfactant: A review focused on adjunctive therapy for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 including SP-A and SP-D as added clinical marker. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 51, p. 101413. doi: 10.1016/j.cocis.2020.101413.
18. **Giamarellos-Bourboulis, E. J., et al. (2020):** Complex Immune Dysregulation in COVID-19 Patients with Severe Respiratory Failure. *Cell Host & Microbe*, 27(6), p. 992—1000. doi: 10.1016/J.CHOM.2020.04.009.
19. **Gómez-Pastora, J., et al. (2020):** Hyperferritinemia in critically ill COVID-19 patients—Is ferritin the product of inflammation or a pathogenic mediator? *Clinica Chimica Acta*, 509, p. 249—251. doi: 10.1016/j.cca.2020.06.033.
20. **Greter, M., et al. (2012):** GM-CSF controls nonlymphoid tissue dendritic cell homeostasis but is dispensable for the differentiation of inflammatory dendritic cells. *Immunity*, 36(6), p. 1031—1046. doi: 10.1016/j.immuni.2012.03.027.
21. **Guilliams, M., et al. (2013):** Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *The Journal of experimental medicine*, 210(10), p. 1977—1992. doi: 10.1084/jem.20131199.
22. **Hamilton, J. A. (2020):** GM-CSF in inflammation. *The Journal of experimental medicine*, 217(1). doi: 10.1084/jem.20190945.
23. **Hamilton, J. A., Cook, A. D., Tak, P. P. (2016):** Anti-colony-stimulating factor therapies for inflammatory and autoimmune diseases. *Nature reviews. Drug discovery*, 16(1), p. 53—70. doi: 10.1038/nrd.2016.231.
24. **Han, H., et al. (2020):** Prominent changes in blood coagulation of patients with SARS-CoV-2 infection. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 58(7), p. 1116—1120. doi: 10.1515/CCLM-2020-0188.
25. **Helms, J., et al. (2020):** High risk of thrombosis in patients with severe SARS-CoV-2 infection: a multicenter prospective cohort study. *Intensive care medicine*, 46(6), p. 1089—1098. doi: 10.1007/S00134-020-06062-X.
26. **Henry, B. M., et al. (2020):** Hematologic, biochemical and immune biomarker abnormalities associated with severe illness and mortality in coronavirus disease 2019 (COVID-19): a meta-analysis. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 58(7), p. 1021—1028. doi: 10.1515/CCLM-2020-0369.

27. Hou, H., et al. (2020): Using IL-2R/lymphocytes for predicting the clinical progression of patients with COVID-19. *Clinical and Experimental Immunology*, 201(1), p. 76. doi: 10.1111/CEI.13450.
28. Hu, R., et al. (2020): Procalcitonin levels in COVID-19 patients. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 56(2), p. 106051. doi: 10.1016/J.IJANTIMICAG.2020.106051.
29. Huang, I., Pranata, R. (2020): Lymphopenia in severe coronavirus disease-2019 (COVID-19): systematic review and meta-analysis. *Journal of Intensive Care*, 8(1), p. 36. doi: 10.1186/S40560-020-00453-4.
30. Huang, Z., et al. (2020): Prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio in sepsis: A meta-analysis. *The American journal of emergency medicine*, 38(3), p. 641—647. doi: 10.1016/J.AJEM.2019.10.023.
31. Iba, T., et al. (2020): Coagulopathy in COVID-19. *Journal of thrombosis and haemostasis. JTH*, 18(9), p. 2103—2109. doi: 10.1111/jth.14975.
32. Islam, H., et al. (2021): Elevated Interleukin-10 Levels in COVID-19: Potentiation of Pro-Inflammatory Responses or Impaired Anti-Inflammatory Action? *Frontiers in Immunology*, 12. doi: 10.3389/fimmu.2021.677008.
33. Lang, F. M., et al. (2020): GM-CSF-based treatments in COVID-19: reconciling opposing therapeutic approaches. *Nature Reviews Immunology*, 20(8), p. 507—514. doi: 10.1038/s41577-020-0357-7.
34. Lauw, F., et al. (2000): Proinflammatory effects of IL-10 during human endotoxemia. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 165(5), p. 2783—2789. doi: 10.4049/JIMMUNOL.165.5.2783.
35. Leisman, D. E., et al. (2020): Cytokine elevation in severe and critical COVID-19: a rapid systematic review, meta-analysis, and comparison with other inflammatory syndromes. *The Lancet Respiratory Medicine*, 8(12), p. 1233—1244. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30404-5.
36. Levi, M., et al. (2020): Coagulation abnormalities and thrombosis in patients with COVID-19. *The Lancet. Haematology*, 7(6), p. e438—e440. doi: 10.1016/S2352-3026(20)30145-9.
37. Li, H., et al. (2020): SARS-CoV-2 and viral sepsis: observations and hypotheses. *Lancet* (London, England), 395(10235), p. 1517. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30920-X.
38. Lieschke, G. J., et al. (1994): Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood*, 84(6), 1737—1746.
39. Lippi, G., Cervellin, G. (2018): Procalcitonin for diagnosing and monitoring bacterial infections: for or against? *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (CCLM), 56(8), p. 1193—1195. doi: 10.1515/CCLM-2018-0312.
40. Liu, T., et al. (2020): The role of interleukin-6 in monitoring severe case of coronavirus disease 2019. *EMBO Molecular Medicine*, 12(7). doi: 10.15252/EMMM.202012421.
41. Lu, L., et al. (2021): A Potential Role of Interleukin 10 in COVID-19 Pathogenesis. *Trends in Immunology*, 42(1), p. 3. doi: 10.1016/J.IT.2020.10.012.
42. Matute-Bello, G., et al. (1997): Neutrophil apoptosis in the acute respiratory distress syndrome. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 156(6), p. 1969—1977. doi: 10.1164/ajrccm.156.6.96-12081.
43. McGonagle, D., et al. (2020): Immune mechanisms of pulmonary intravascular coagulopathy in COVID-19 pneumonia. *The Lancet. Rheumatology*, 2(7), p. e437—e445. doi: 10.1016/S2665-9913(20)30121-1.
44. Melbye, H., et al. (2004): The course of C-reactive protein response in untreated upper respiratory tract infection. *The British Journal of General Practice*, 54(506), p. 653. Available at: /pmc/articles/PMC1326064/ (Accessed: October 6, 2021).
45. Nicholls, J. M., et al. (2003): Lung pathology of fatal severe acute respiratory syndrome. *Lancet* (London, England), 361(9371), p. 1773. doi: 10.1016/S0140-6736(03)13413-7.
46. Pan, C., et al. (2020): Lung Recruitability in COVID-19-associated Acute Respiratory Distress Syndrome: A Single-Center Observational Study. <https://doi.org/10.1164/rccm.202003-0527LE>, 201(10), p. 1294—1297. doi: 10.1164/RCCM.202003-0527LE.
47. Parikh, S. M., et al. (2006): Excess Circulating Angiopoietin-2 May Contribute to Pulmonary Vascular Leak in Sepsis in Humans. *PLOS Medicine*, 3(3), p. e46. doi: 10.1371/JOURNAL.PMED.0030046.
48. Polimeni, A., et al. (2021): Differences in coagulopathy indices in patients with severe versus non-severe COVID-19: a meta-analysis of 35 studies and 6427 patients. *Scientific Reports*, 11(1), p. 10464. doi: 10.1038/s41598-021-89967-x.
49. Reghunathan, R., et al. (2005): Expression profile of immune response genes in patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. *BMC immunology*, 6(2). doi: 10.1186/1471-2172-6-2.
50. Robba, C., et al. (2020): Multiple organ dysfunction in SARS-CoV-2: MODS-CoV-2. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 14(9), 865—868. doi: 10.1080/17476348.2020.1778470.
51. Schmal, H., et al. (1998): Soluble ICAM-1 activates lung

- macrophages and enhances lung injury. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 161(7), p. 3685—3693.
52. **Singh, S., Sharma, A., Arora, S. K. (2014):** High Producer Haplotype (CAG) of -863C/A, -308G/A and -238G/A Polymorphisms in the Promoter Region of TNF- α Gene Associate with Enhanced Apoptosis of Lymphocytes in HIV-1 Subtype C Infected Individuals from North India. *PLoS ONE*, 9(5), e98020. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0098020.
 53. **Sorensen, G. L. (2018):** Surfactant Protein D in Respiratory and Non-Respiratory Diseases. *Frontiers in Medicine*, 5. doi: 10.3389/fmed.2018.00018.
 54. **Spadaro, S., et al. (2021):** Markers of endothelial and epithelial pulmonary injury in mechanically ventilated COVID-19 ICU patients. *Critical Care*, 2021 25:1, 25(1), p. 1—9. doi: 10.1186/S13054-021-03499-4.
 55. **Stanley, E., et al. (1994):** Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-deficient mice show no major perturbation of hematopoiesis but develop a characteristic pulmonary pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(12), p. 5592—5596. doi: 10.1073/pnas.91.12.5592.
 56. **Tan, C., et al. (2020):** C-reactive protein correlates with computed tomographic findings and predicts severe COVID-19 early. *Journal of Medical Virology*, 92(7), p. 856—862. doi: 10.1002/JMV.25871.
 57. **Tan, L., et al. (2020):** Lymphopenia predicts disease severity of COVID-19: a descriptive and predictive study. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1). doi: 10.1038/S41392-020-0148-4.
 58. **Tang, N., et al. (2020):** Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, 18(4), p. 844—847. doi: 10.1111/JTH.14768.
 59. **Terpos, E., et al. (2020):** Hematological findings and complications of COVID-19. *American Journal of Hematology*, 95(7), p. 834—847. doi: 10.1002/AJH.25829.
 60. **Thwaites, R. S., et al. (2021):** Inflammatory profiles across the spectrum of disease reveal a distinct role for GM-CSF in severe COVID-19. *Science Immunology*, 6(57). doi: 10.1126/sciimmunol.abg9873.
 61. **Tong, M., et al. (2021):** Serum surfactant protein D in COVID-19 is elevated and correlated with disease severity. *BMC Infectious Diseases*, 21(1), p. 737. doi: 10.1186/s12879-021-06447-3.
 62. **Trapnell, B. C., Whitsett, J. A., Nakata, K. (2003):** Pulmonary Alveolar Proteinosis. *New England Journal of Medicine*, 349(26), p. 2527—2539. doi: 10.1056/NEJMra023226.
 63. **Unkel, B., et al. (2012):** Alveolar epithelial cells orchestrate DC function in murine viral pneumonia. *The Journal of clinical investigation*, 122(10), p. 3652—3664. doi: 10.1172/JCI62139.
 64. **Urrea, J. M., et al. (2020):** Selective CD8 cell reduction by SARS-CoV-2 is associated with a worse prognosis and systemic inflammation in COVID-19 patients. *Clinical Immunology* (Orlando, Fla.), 217, p. 108486. doi: 10.1016/J.CLIM.2020.108486.
 65. **Vaduganathan, M., et al. (2020):** Renin-Angiotensin-Aldosterone System Inhibitors in Patients with Covid-19. *The New England journal of medicine*, 382(17), p. 1653—1659. doi: 10.1056/NEJMSR2005760.
 66. **Wang, L. (2020):** C-reactive protein levels in the early stage of COVID-19. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 50(4), p. 332—334. doi: 10.1016/J.MEDMAL.2020.03.007.
 67. **Ware, L. B., et al. (2013):** Biomarkers of lung epithelial injury and inflammation distinguish severe sepsis patients with acute respiratory distress syndrome. *Critical Care*, 17(5). doi: 10.1186/cc13080.
 68. **Wiktor-Jedrzejczak, W., et al. (1990):** Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(12), p. 4828—4832. doi: 10.1073/PNAS.87.12.4828.
 69. **Wool, G. D., Miller, J. L. (2021):** The Impact of COVID-19 Disease on Platelets and Coagulation. *Pathobiology*, 88(1), p. 15—27. doi: 10.1159/000512007.
 70. **Xu, H., et al. (2020):** High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *International Journal of Oral Science*, 12(1). doi: 10.1038/S41368-020-0074-X.
 71. **Yang, A. P., et al. (2020):** The diagnostic and predictive role of NLR, d-NLR and PLR in COVID-19 patients. *International Immunopharmacology*, 84. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106504.
 72. **Zhou, P., et al. (2020):** A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 579(7798), p. 270. doi: 10.1038/S41586-020-2012-7.
 73. **Zou, X., et al. (2020):** Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection, *Frontiers of medicine*, 14(2), p. 185—192. doi: 10.1007/s11684-020-0754-0.



Laboratórna Diagnostika, XXVI, 2, 2021: 41–53

VYUŽITIE NIEKTORÝCH LABORATÓRNYCH PARAMETROV PRE ODHAD PROGNÓZY U HOSPITALIZOVANÝCH PACIENTOV S COVID-19 – RETROSPEKTÍVNA ANALÝZA 304 PRÍPADOV THE USE OF SOME LABORATORY PARAMETERS FOR PROGNOSIS ESTIMATION IN HOSPITALIZED PATIENTS WITH COVID-19— RETROSPECTIVE ANALYSIS OF 304 CASES

Magula Daniel¹, Vaverková Gabriela¹, Kováčová Darina²

Lievajová Vladimíra³, Vinklerová Silvia¹

¹Oddelenie klinickej biochémie, Špecializovaná nemocnica sv. Svorada Zobor, n.o., Nitra

²II. oddelenie pneumológie a ftizeológie, Špecializovaná nemocnica sv. Svorada Zobor, n.o., Nitra

³I. oddelenie pneumológie a ftizeológie, Špecializovaná nemocnica sv. Svorada Zobor, n.o., Nitra

e-mail: magula@snzobor.sk

pôvodná práca

SÚHRN

Autori na súbore 304 hospitalizovaných pacientov s COVID-19 retrospektívne analyzovali vybrané laboratórne parametre z pohľadu ich potenciálu pre odhad prognózy a vývoja tohto ochorenia. Pomocou grafických, štatistických a epidemiologických analytických metód porovnávali laboratórne nálezy v skupine 54 zomrelých pacientov voči skupine 250 pacientov, ktorí ochorenie úspešne prekonali. Pri všetkých sledovaných parametroch: močovina (urea), C-reaktívny proteín (CRP), interleukín-6 (IL-6), počet leukocytov (LEU), podiel lymfocytov v leukograme (%LYM), pomer počtu neutrofilov k lymfocytom (NLR), saturácia artériovej krvi kyslíkom (SaO₂) a D-dimér zistili už pri iniciálnom vyšetrení pri prijatí na hospitalizáciu významné štatistické rozdiely (Mann-Whitneyho U-test), s výnimkou D-diméru. Pre tieto parametre definovali rozhodovacie limity (dis-

kriminačnú hodnotu, cut-off value) s následným určením základných prognostických ukazovateľov – relatívne riziko (RR) úmrtia, pomery šancí (odds ratio – OR) pri súčasnom stanovení diagnostickej účinnosti (DÚ) jednotlivých laboratórnych testov. Tieto ukazovatele sú nasledovné: urea: cut-off value $\geq 7,00$ mmol/l, RR = 3,47 (CI 95 % 2,00–6,01), OR = 4,54 (CI 95 % 2,37–8,68), DÚ = 0,651; CRP: $\geq 75,68$ mg/l, 1,88 (1,15–3,09), 2,20 (1,17–4,16), 0,711; IL-6: $\geq 51,60$ ng/l, 3,36 (2,06–5,46), 4,69 (2,47–8,89), 0,763; LEU: $\geq 11,50$ mld/l, 1,60 (0,9–2,66), 1,79 (0,94–3,41), 0,699; %LYM: $< 10,5$ %, 2,30 (1,41–3,74), 2,84 (1,51–2,85, 0,728; NLR: $\geq 7,56$, 2,13 (1,32–3,42), 2,60 (1,40–4,86), 0,723; SaO₂: $\leq 92,0$ %, 1,67 (1,00–2,77), 1,88 (1,00–3,54), 0,637; D-dimér: $\geq 2,00$ mg/l, 1,69 (0,88–3,23), 1,91 (0,83–4,38), 0,738.

Záverom autori konštatujú, že vhodná voľba a výber laboratórnych parametrov u pacientov hospitalizovaných s COVID-19 môže prispieť svojím prognostickým

potenciálom k odhadu prognózy a ďalšieho vývoja ochorenia, čo je v súlade aj s poznatkami iných autorov.

Kľúčové slová: COVID-19; laboratórne parametre; prognóza ochorenia; diagnostická účinnosť testu

ABSTRACT

The authors retrospectively analyze selected laboratory parameters in a group of 304 hospitalized patients with COVID-19 in terms of their potential for estimating the prognosis and further evolution of this disease. Using graphical, statistical and epidemiological analytical methods, they compared the laboratory findings in a group of 54 deceased patients to a group of 250 patients who successfully overcame the disease. For all monitored parameters: urea, C-reactive protein (CRP), interleukin-6 (IL-6), leukocyte count (LEU), lymphocyte count in leukogram (% LYM), neutrophil to lymphocyte count ratio (NLR), arterial oxygen saturation, (SaO₂) and D-dimer found significant statistical differences (Mann-Whitney U-test) at the initial examination at admission to hospital, with the exception of D-dimer. Besides of this initial assessment, the authors defined the decision limits (cut-off values) for these parameters with subsequent determination of basic prognostic indicators—relative risk (RR) of death, odds ratio (OR), and determined diagnostic efficiency (DE) in individual laboratory tests as well. These indicators are as follows: urea: cut-off value ≥ 7.00 mmol/l, RR = 3.47 (CI 95 % 2.00–6.01), OR = 4.54 (CI 95 % 2.37–8.68), DE = 0.651; CRP: ≥ 75.68 mg/l, 1.88 (1.15–3.09), 2.20 (1.17–4.16), 0.711; IL-6: ≥ 51.60 ng/l, 3.36 (2.06–5.46), 4.69 (2.47–8.89), 0.763; LEU: $\geq 11.50 \cdot 10^9$ /l, 1.60 (0.96–2.66), 1.79 (0.94–3.41), 0.699; % LYM: < 10.5 %, 2.30 (1.41–3.74), 2.84 (1.51–2.85, 0.728; NLR: ≥ 7.56 , 2.13 (1.32–3.42), 2.60 (1.40–4.86), 0.723; SaO₂: ≤ 92.0 %, 1.67 (1.00–2.77), 1.88 (1.00–3.54), 0.637; D-dimer: ≥ 2.00 mg/l, 1.69 (0.88–3.23), 1.91 (0.83–4.38), 0.738.

The authors conclude that the appropriate choice and selection of laboratory parameters in patients hospitalized with COVID-19 can contribute with its prognostic potential to estimate the prognosis and further evolution of the disease, which is consistent with the findings of other authors.

Key words: COVID-19; laboratory parameters; prognosis of the disease; diagnostic test efficiency

ÚVOD

COVID-19 je infekčné ochorenie, ktorého vyvolávateľom je koronavírus SARS-CoV-2. Po prvýkrát bolo identifikované 31. decembra 2019 vo Wuchane v Číne, následne sa ochorenie rýchle šíri po celom svete. Dňa 11. marca 2020 vyhlásila Svetová zdravotnícka organizácia (WHO) šírenie infekcie a ochorenie COVID-19 za globálnu pandémiu (Svetová zdravotnícka organizácia, 2020, Cucinotta, Vaneli, 2020).

U väčšiny nakazených prebieha ochorenie s miernymi príznakmi, u malej časti ochorenie progreduje do akútnej respiračnej insuficiencie s hypoxiou, ktorá si vyžaduje hospitalizáciu. U hospitalizovaných pacientov môže v istej časti prípadov ochorenie ďalej progredovať do syndrómu akútnej respiračnej tiesne s multiorgánovým zlyhaním, nutnosťou umelej pľúcnej ventilácie spojenej s vysokou mierou úmrtnosti (Laššák, Kríšťák, 2021).

U infikovaných jedincov sa uvádza úmrtnosť v rozmedzí 0,5 %–10,0 %, mortalita hospitalizovaných presahuje 20 % (Izcovič, 2020). V slovenských podmienkach bola zaznamenaná priemerná mortalita u všetkých hospitalizovaných pacientov na vrchole druhej vlny vo februári 2021–22 %, u pacientov ležiacich na jednotkách intenzívnej starostlivosti dosiahla 48 % a u pacientov, u ktorých bola aplikovaná umelá pľúcna ventilácia bola mortalita až 53 % (Červený a kol., 2021).

Jednou z prvých a principiálnych rozhodnutí lekára zoči-voči hospitalizovanému pacientovi s COVID-19 je iniciálne určenie rizika (stratifikácia pacientov s infekciou SARS-CoV-2) na základe posúdenia jeho celkového klinického stavu, zhodnotenia pomocných vyšetrení - zobrazovacích RTG, USG, CT, prípadne HRCT a využitia celej palety laboratórných parametrov.

Práve laboratórne parametre boli pre široké spektrum možností ich výberu, relatívne jednoduchú dostupnosť od počiatku predmetom záujmu, čo sa odrazilo i na vysokom počte publikovaných prác zaoberajúcimi sa touto problematikou, či už v kazuistikách, pôvodných prácach a na nich nadväzujúcich systematických prehľadoch, či metaanalýz, ktoré ešte viac upresňujú používanie a úlohu laboratórných markerov pri novom ochorení COVID-19.

Prvú metaanalýzu spracovali britskí a talianski autori na čínskych a singapurských dátach (H e n r y a kol., 2020) ako výstup hodnotenia 21 štúdií u 3377 pacientov a 33 laboratórnych parametrov na odlíšenie priebehu COVID-19 s ťažkým a miernym priebehom, a zhodnotením troch štúdií na počte 393 pacientov – na odlíšenie skupín zomrelých a preživších pacientov. Zaznamenali vzostup počtu leukocytov pri súčasnom poklese počtu lymfocytov a trombocytov, vzostup zápalových markerov, prítomnosť kardiálneho a svalového poškodenia, porušenia funkcií pečene a obličiek, zmien koagulačných parametrov. Veľmi významné zmeny boli zaznamenané rozdiely pri vyšetreniach interleukínu-6 a 10 a feritínu.

P o n t i a kol.(2020) v systematickom prehľade uvádzajú prehľad laboratórnych markerov s reálnym i potenciálnym využitím pri COVID-19 v rozdelení na hematologické, biochemické, hemokoagulačné, zápalové parametre a uvádza i potenciálne nové biomarkery.

Sledovanie pacientov s COVID-19 monitorovaním rutinných laboratórnych testov k predikcii budúceho priebehu choroby (prognózy) považujú za kriticky dôležité aj kanadskí autori (K a v s a k a kol., 2020).

CIEĽ PRÁCE

V nadväznosti na početné práce, ktoré sa zaoberali hodnotením rôznych laboratórnych parametrov v odhade prognózy u hospitalizovaných pacientov s COVID-19 z hľadiska závažnosti priebehu ochorenia (stratifikácie rizika), odhadu prežitia, resp. úmrtia chorých pacientov, sme na vlastnom súbore 304 hospitalizovaných pacientov retrospektívne analyzovali, či vyšetrenie niektorých laboratórnych parametrov pri začiatku hospitalizácie môže odlíšiť pacientov, ktorí ochorenie úspešne zvládnu (vyliečia sa, prežijú) od skupiny pacientov, u ktorých bude priebeh ochorenia fatálny (neprežijú). Na skupinách zomrelých a preživších pacientov sme analyzovali prediktívny potenciál jednotlivých laboratórnych parametrov, a to metódami deskriptívnej a epidemiologickej štatistiky.

METÓDA

Náš súbor pozostával z 304 pacientov ($m = 179$, $ž = 125$), ktorí boli v období druhej vlny pandémie koronavi-

rusovej infekcie SARS-CoV-2 (19. októbra 2020–22. apríla 2021) hospitalizovaní pre COVID-19 na reprofelizovanom lôžkovom fonde Špecializovanej nemocnice sv. Svorada Zobor, n. o.

Vekový medián hospitalizovaných bol 69,0 rokov, doba hospitalizácie činila v mediáne 13,0 dňa.

Všetci pacienti mali infekciu detegovanú RT-PCR testom na SARS-CoV-2, mali COVID-19 potvrdený RTG vyšetrením. Závažnosť stavu bola posudzovaná lekárom-pneumoftizeológom klinicky (anamnéza, fyzikálne vyšetrenie), pomocou zobrazovacích metód (CT, resp. HRCT, USG) ako aj laboratórnymi (biochemickými, hematologickými a hemostazeologickými) metódami. U všetkých hospitalizovaných bol aplikovaný štandardizovaný terapeutický protokol – podávanie kyslíka 2–25 litrov za minútu, kortikosteroidy, antibiotiká, nízkomolekulové heparíny, imunomodulačná liečba a prípadne špecifická liečba (prekonzultovaná s infektológom).

V súbore 304 hospitalizovaných sme zaznamenali 54 úmrtí (17,8 % hospitalizovaných), 250 pacientov ochorenie úspešne prekonalo. Tieto dve skupiny boli považované za referenčné z hľadiska porovnávania dát, t. j. hodnot jednotlivých sledovaných laboratórnych parametrov v čase prijatia na hospitalizáciu (1., resp. 2. deň hospitalizácie) a v čase ukončenia hospitalizácie (jeden, max. dva dni pred ukončením hospitalizácie).

Pre účely hodnotenia boli vybraté tie laboratórne parametre, ktoré boli vyšetrované štandardne a pravidelne u každého pacienta pri prijatí, boli využívané i na monitorovanie priebehu počas a pri ukončení hospitalizácie, a zároveň to boli parametre, ktoré v zmysle doterajších skúseností a publikovaných prác čo najlepšie a najúplnejšie laboratórne charakterizujú chorobnú jednotku COVID-19.

Rationale výberu laboratórnych parametrov v našom súbore vychádzalo z charakteristík ochorenia COVID-19, ktoré je:

- *de facto* pneumóniou vzniknutou v komunite (z validovaného stratifikačného indexu CURB-65 je jedinou laboratórnou zložkou vyšetrenie urey – písmeno „U“ akronymu),
- ochorením zápalovým – laboratórne parametre vybrané do retrospektívneho sledovania boli C-reaktívny proteín (CRP), interleukín-6 (IL-6) – marker charakterizujúci prítomnosť tzv. „cytokínovej búrky“ pri COVID-19, počet leukocytov (LEU), podiel lymfocytov

v diferenciálnom leukograme (% LYM), resp. pomer počtu neutrofilov k lymfocytom (tzv. NLR index),

- ochorením s trombogénnou zložkou (tvorbou mikrotrombov) – laboratórny pendant D-dimér,
- ochorením, ktoré charakterizuje intersticiálny edém pľúc, obmedzujúci prenos kyslíka z alveol do artériovej krvi – laboratórne charakterizované vyšetrením saturácie artériovej krvi kyslíkom (SaO_2).

Laboratórne parametre v diagnostickom procese neboli posudzované z pohľadu ich referenčného rozsahu hodnôt, ale z pohľadu hodnoty parametra ako rozhodovacieho limitu (decision limit, diskriminačná hodnota, cut-off value) – teda takej hodnoty, ktorá má potenciál dostatočne diskriminovať skupinu tých pacientov, ktorí ochorenie úspešne zvládnu (vyliečia sa, prežijú) voči skupine pacientov, ktorí ochoreniu podľahnú (zomreli), pri čo najvyššej miere diagnostickej účinnosti (diagnostic efficiency).

Hodnotenie každého jednotlivého parametra bolo vykonané dvoma prístupmi:

- a) Grafickým zobrazením pomocou škatuľových grafov (box and whisker plot) s kvartilovým rozdelením nameraných hodnôt, uvedeným mediánom, pri prijatí na hospitalizáciu a pri jej ukončení, v skupine zomrelých aj preživších pacientov (použité nástroje Microsoft Excel). Štatistické hodnotenie bolo vykonané pomocou Mann-Whitneyho U-testu (porovnanie dvoch nerovnakých súborov s non-Gaussovskou distribúciou hodnôt laboratórných testov).
- b) Využitím niektorých nástrojov deskriptívnej (percentilové rozdelenie hodnôt) a epidemiologickej štatistiky za využitia binárnych (kontingenčných) tabuliek, výpočtov senzitivity, špecificity, diagnostickej účinnosti testu, určenia rizika úmrtia v skupine pacientov s hodnotou vyššou, resp. nižšou ako diskriminačná hodnota, výpočtom tzv. odds. Diskriminačné hodnoty (cut-off values) boli určené buď prijatím arbitrárnych hodnôt (napr. z indexu CURB-65) alebo výpočtom, zvyčajne prijatím hodnoty zodpovedajúcej 75-temu percentilu rozdelenia hodnôt.

Uvádzať použité prístrojové vybavenie (výrobca), diagnostické súpravy (výrobca), analytickú variabilitu metódy CV % v uvedenom období podľa interných kontrol kvality: biochemický analyzátor Bio Majesty JCA-BM 6010/c (Jeol Ltd.): Urea (DiaSys), CV 1,8 %; C-reaktívny proteín – CRP FS* (DiaSys), CV 8,0 %; D-dimér (DiaSys), CV 12 %. Imunochemický analyzátor Cobas E411 (Roche): IL-6 – Elecsys

IL-6 (Cobas®), CV 8,2 %, hematologický analyzátor Sysmex KX-21N (Sysmex): Leukocyty, % lymfocytov, CV 2,4 % a vypočítaný index NLR, acidobázický analyzátor ABL-830 (Radiometer): saturácia artériovej krvi kyslíkom – CV 0,1 %.

VÝSLEDKY

a) Zhodnotenie grafickou analýzou (škatuľové grafy – box and whisker plots – s kvartilovým rozdelením a vyznačením hodnoty mediánu) podľa jednotlivých laboratórných parametrov v skupine zomrelých (v grafe vyznačené červenou farbou) vs. preživších (v grafe zelenou farbou) pri prijatí (s vyznačením p-hodnoty – Mann-Whitneyho U-test) a pri ukončení hospitalizácie (grafy č. 1 až 8).

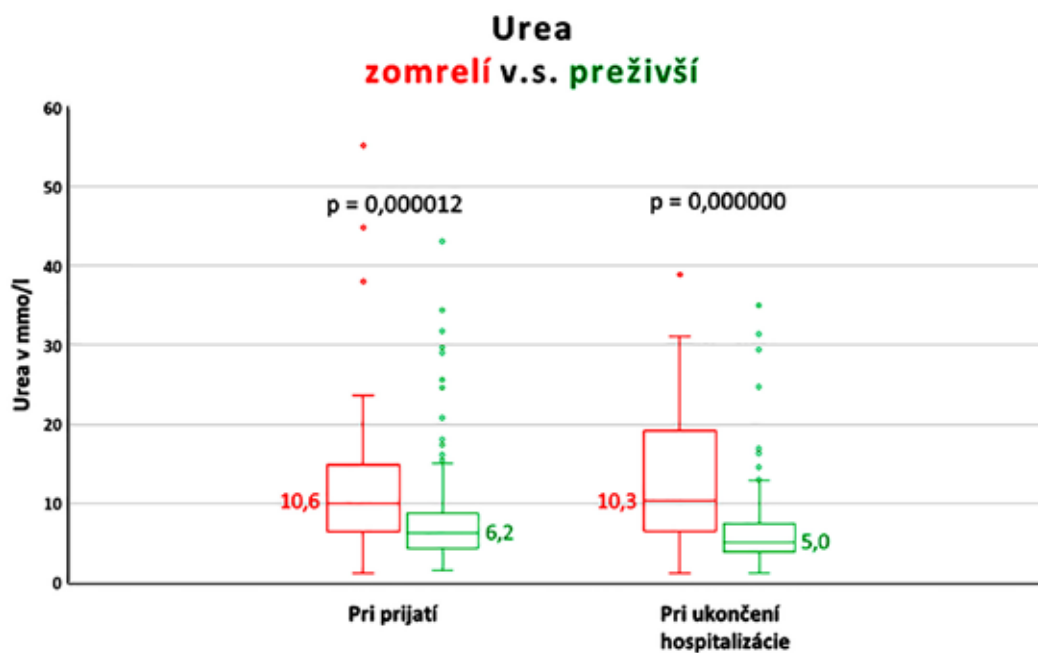
b) Hodnotenie jednotlivých laboratórných parametrov metódami epidemiologickej štatistiky za použitia binárnych (kontingenčných) tabuliek z pohľadu prognózy pacientov s COVID-19 prezentujeme na príklade urey (Tab. 1) s vyjadrením výstupov pri zadanej diskriminačnej hodnoty (cut-off value) – riziko a relatívne riziko úmrtia, pomery šancí (odds ratio) s príslušnými intervalmi spoľahlivosti pri 95 % pravdepodobnosti a vyjadrením diagnostickej účinnosti príslušného testu. Pri ďalších parametroch tieto údaje uvádzame už iba v texte.

Pri CRP a diskriminačnej hodnote cut-off $\geq 75,68$ mg/l bolo zaznamenaných 20 úmrtí zo 75 hodnotených (20/75), pri hodnote nižšej ako 75,68 mg/l 32 úmrtí z 226 sledovaných (32/226), s relatívnym rizikom úmrtia 1,88 (CI 95 % 1,15–3,09), pomerom šancí (odds ratio – OR) 2,20 (CI 95 % 1,17–4,16) a diagnostickej účinnosti (DÚ) testu 0,711.

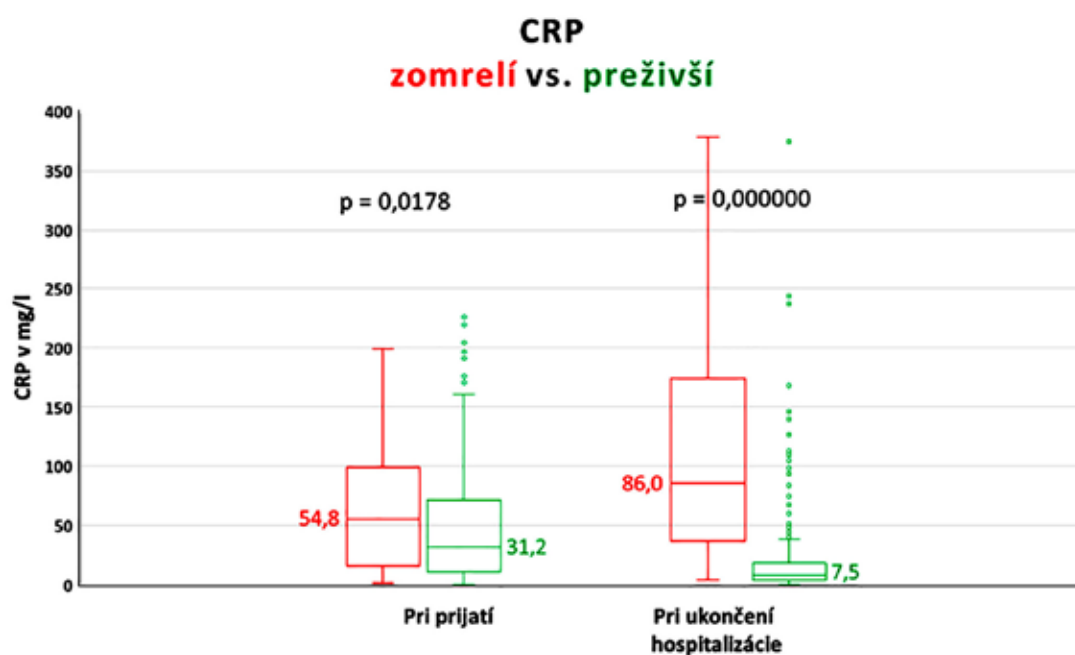
Obdobne pre IL-6 pri diskriminačnej hodnote cut-off $\geq 51,60$ ng/l (26/72), pri hodnote $< 51,60$ ng/l (24/223), boli hodnoty RR = 3,36 (CI 95 % 2,06–5,46), OR = 4,69 (CI 95 % 2,47–8,89), DÚ = 0,763.

Pre počet leukocytov (LEU) boli zistené výstupy nasledovné: pri cut-off $\geq 11,5$ mld/l (18/75), pri cut-off $< 11,5$ mld/l (34/227), RR = 1,60 (CI 95 % 0,96–2,66), OR = 1,79 (CI 95 % 0,94–3,41), DÚ = 0,699.

Pre podiel lymfocytov v diferenciálnom leukograme (% LYM) boli zistené výstupy nasledovné: pri cut-off $< 10,5$ % (22/74), pri cut-off $\geq 10,5$ % (29/224), RR = 2,30 (CI 95 % 1,41–3,74), OR = 2,84 (CI 95 % 1,51–2,85), DÚ = 0,728.



Graf 1. Urea – grafická analýza



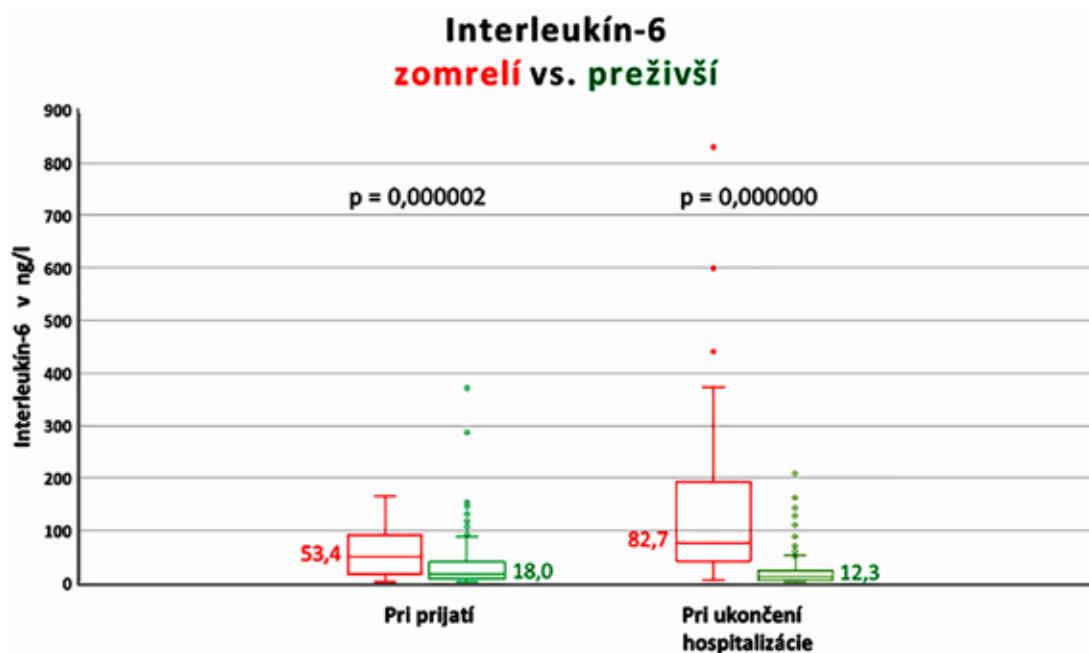
Graf 2. C-reaktívny proteín – grafická analýza

Pre index NLR boli zistené výstupy nasledovné: pri cut-off $\geq 7,56$ (22/74), pri cut-off $< 7,56$ (32/229), $RR = 2,13$ (CI 95 % 1,32–3,42), $OR = 2,60$ (CI 95 % 1,40–4,86), $DÚ = 0,723$.

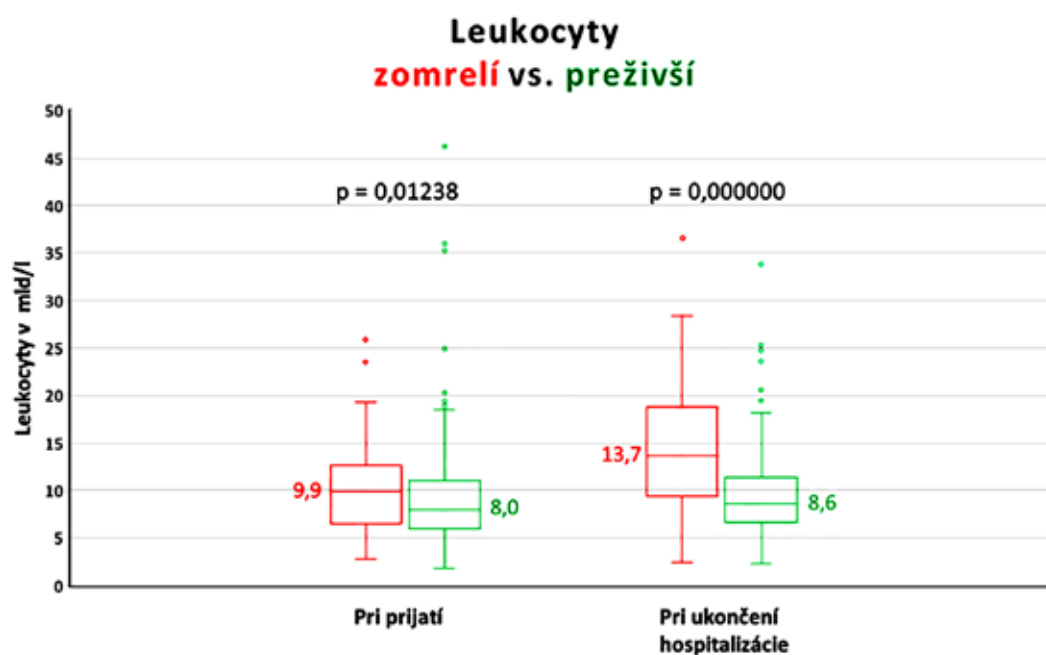
Pre saturáciu artériovej krvi (SaO_2) boli zistené nasledovné výstupy: pri cut-off $\leq 92,0\%$ (23/95), pri cut-off $> 92,0\%$ (25/172), $RR = 1,67$ (CI 95 % 1,00–2,77), $OR = 1,88$ (CI 95 % 1,00 – 3,54), $DÚ = 0,637$.

Pre D-dimér boli zistené nasledovné výstupy: pri cut-off $\geq 2,00$ mg/l (10/41), pri cut-off $< 2,00$ mg/l (25/173), $RR = 1,69$ (CI 95 % 0,88–3,23), $OR = 1,91$ (CI 95 % 0,83–4,38), $DÚ = 0,738$.

Celkový prehľad pre jednotlivé analyzované laboratórne parametre v poradí podľa diagnostickej účinnosti testov uvádzame v tabuľke 2.



Graf 3. Interleukín-6 – grafická analýza



Graf 4. Počet leukocytov – grafická analýza

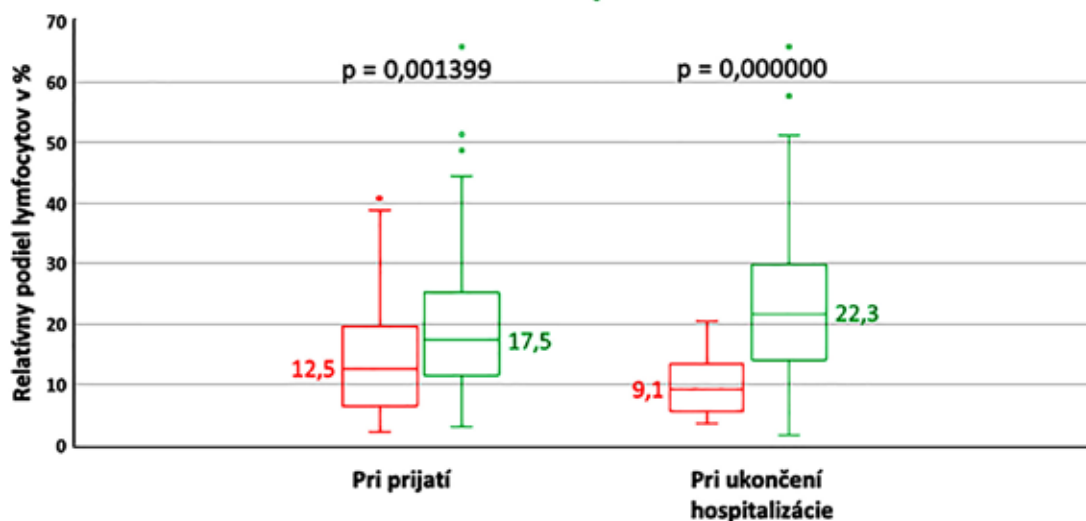
DISKUSIA

S objavením sa nového ochorenia – COVID-19, ktorého šírenie zaznamenalo pandemický priebeh s vysokou mierou úmrtnosti sa postupne vyvíjajú aj názory na jeho priebeh, diagnostiku, liečbu, hodnotenie rizikových faktorov ochorenia. Priebeh ochorenia je vo väčšine prípadov ľahší, avšak u pacientov s rizikovými faktormi, medzi ktoré patrí najmä vek nad 65 rokov, prítomnosť iných chronic-

kých ochorení – kardiovaskulárne (srdcové zlyhávanie, artériová hypertenzia), respiračné (chronická obštrukčná choroba pľúc, a i.), chronické obličkové ochorenie, obezita, diabetes mellitus, onkologické ochorenia a ďalšie ochorenia spojené s imunodeficitom, stavy po transplantáciách, ochorenie často prechádza do ťažšieho priebehu s vysokou mierou letality (Laššák, Krístek, 2021).

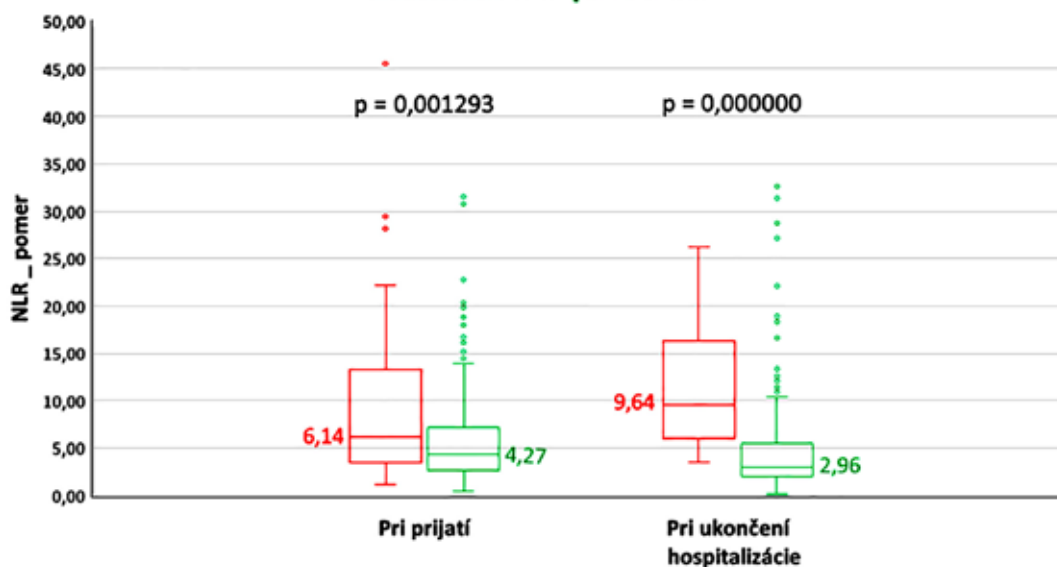
Okrem diagnostiky ochorenia – najmä molekulovo-genetických vyšetrení prítomnosti patogénu (RT-PCR),

% Lymfocytov z celkového počtu leukocytov zomrelí vs. preživší



Graf 5. Podiel lymfocytov v diferenciálnom leukograme v % – grafická analýza

Pomer počtu neutrofilov k lymfocytom - NLR zomrelí vs. preživší



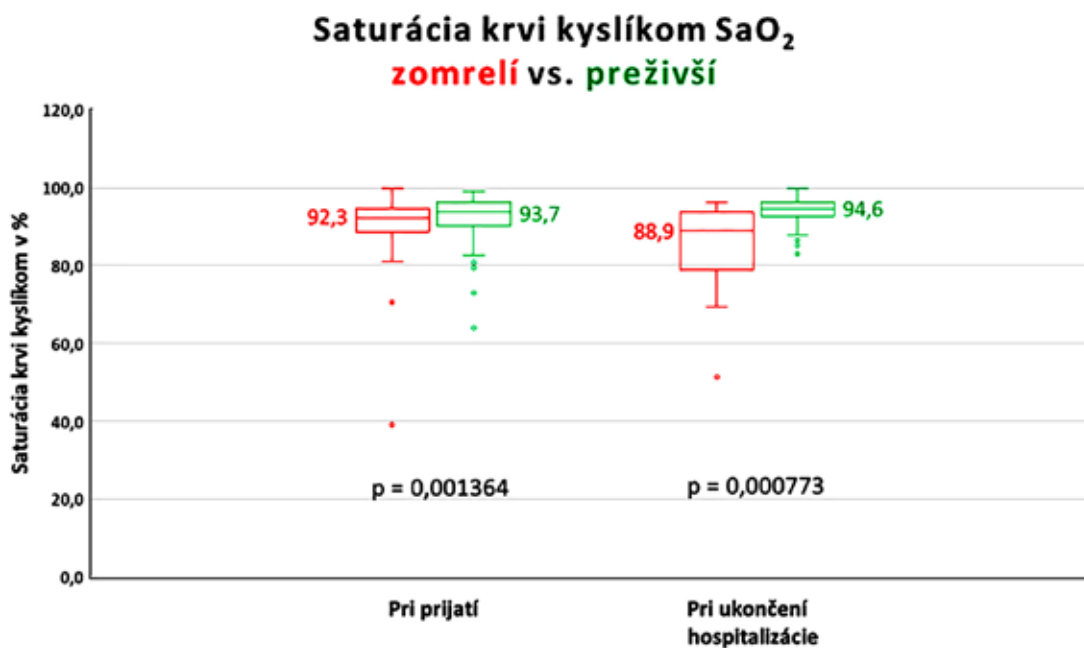
Graf 6. Pomer počtu neutrofilov k lymfocytom v leukograme (index NLR) – grafická analýza

klinického hodnotenia priebehu, využitia zobrazovacích pomocných vyšetrení (najmä RTG, CT, resp. HRCT) sa pri hodnotení priebehu ochorenia a odhade prognózy ochorenia využívajú v hojnej miere aj laboratórne parametre, ktoré sa prakticky od počiatku stali predmetom záujmu mnohých pôvodných prác, prehľadov, metaanalýz.

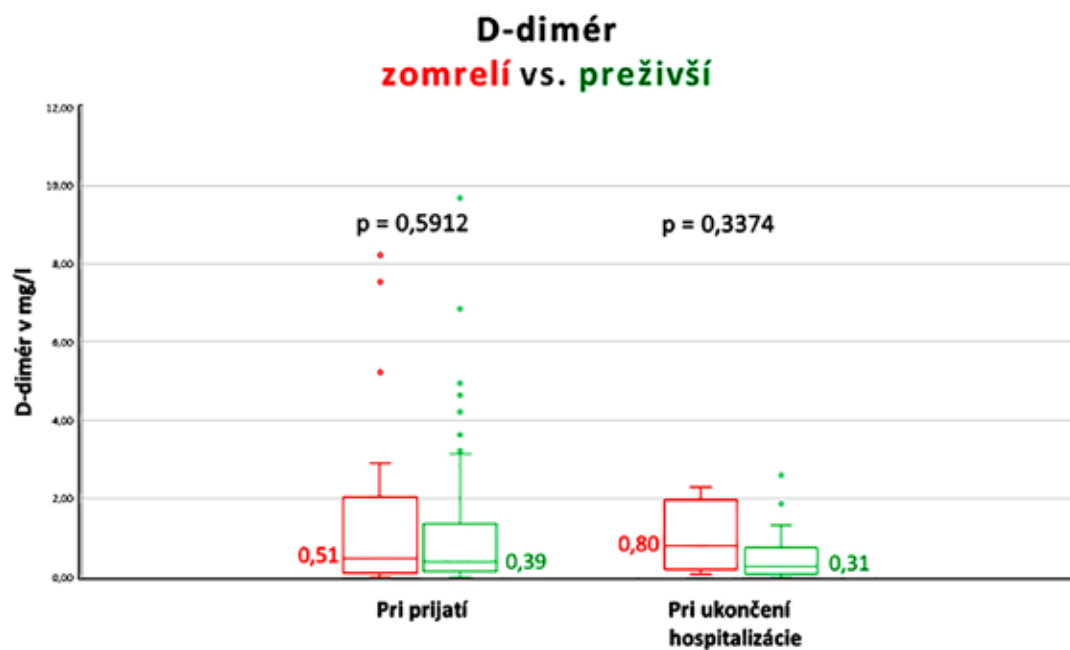
V júni 2020 pracovná skupina IFCC publikovala prácu, ktorá sumarizovala zásady diagnostiky, sérológie a sledovania zmien rutinných laboratórnych parametrov pri hod-

notení priebehu a prognózy ochorenia COVID-19 (Bohn a kol., 2020). V našich krajoch zhrnuli v prehľadnom článku prvotné informácie k využitiu rutinných laboratórnych vyšetrení pri COVID-19 z pohľadu spektra ich využitia, monitorovania zmien v priebehu ochorenia ako i pohľadu využitia týchto parametrov v odhade prognózy pacientov s COVID-19 Friedecký, Kratochvíla (2020).

V našom súbore 304 hospitalizovaných pacientov s potvrdenou diagnózou COVID-19 sme sa v retrospektívnom



Graf 7. Saturácia artériovej krvi kyslíkom – grafická analýza



Graf 8. D-dimér – grafická analýza

zhodnotení zamerali na porovnanie rozdielov v hodnotách vybraných laboratórnych parametrov v skupine pacientov, ktorí ochorenie úspešne zvládli (prežili) voči skupine pacientov s nepriaznivým priebehom hospitalizácie (zomrelí, n = 54, 17,8 %).

Už pri porovnaní hodnôt laboratórnych parametrov pri začiatku hospitalizácie sme zaznamenali štatisticky významné rozdiely medzi oboma porovnávanými skupinami (zomrelí vs. preživší) pri všetkých sledovaných paramet-

roch, s výnimkou D-diméru, ako sme to ukázali v grafických znázorneniach. Vo vývoji zmien hodnôt týchto laboratórnych parametrov sme ku koncu hospitalizácie pri všetkých parametroch zaznamenali ich ďalšie zhoršenie v skupine zomrelých, kým v skupine preživších sa hodnoty meraných parametrov ku koncu hospitalizácie zlepšili.

Druhým cieľom práce bolo posúdenie miery rizika úmrtia (odhad prognózy) v závislosti od zadefinovanej hodnoty rozhodovacieho limitu (decision limit, diskriminačná hod-

Tab. 1, Urea – analýza laboratórneho testu z pohľadu diagnostickej účinnosti a prediktívnej hodnoty testu pre odhad prognózy pri uvedenej diskriminačnej hodnote (cut-off value)

UREA		ZOMRELÍ PREŽIVŠÍ				
cut-off	$\geq 7,00 \text{ mmol/l}$	39	90	129	30,2%	nízko úmrtia
	$< 7,00 \text{ mmol/l}$	15	157	172	8,7%	nízko úmrtia
relatívne riziko (RR)					3,47	(CI95% 2,00-6,01)
odds ratio (OR)					4,54	(CI95% 2,37-8,68)
senzitivnosť			0,722			
špecifickosť			0,636			
diagnostická účinnosť			0,651			

Hodnotenie:

Relatívne riziko úmrtia u pacientov s hladinou urey pri prijatí $\geq 7,00 \text{ mmol/l}$ je **3,47-krát** vyššie voči pacientom s hladinou urey $< 7,00 \text{ mmol/l}$.

Tab. 2. Diskriminačné (cut-off) hodnoty jednotlivých laboratórných parametrov pre riziko úmrtia vyšetrených pri začiatku hospitalizácie pre COVID-19 zoradené podľa diagnostickej účinnosti testov

Parameter	Cut-off value	RR úmrtia	Odds ratio	DÚ testu	Poznámka
IL-6	$\geq 51,60 \text{ ng/l}$	3,36	4,69	0,763	časovo predchádza vzostupu CRP o 24—48 hod.
D-dimér	$\geq 2,00 \text{ mg/l}$	1,69	1,91	0,738	
% Lymfocyty	$< 10,5\%$	2,30	2,84	0,728	
NLR	$\geq 7,56$	2,13	2,60	0,723	
CRP	$\geq 75,68 \text{ mg/l}$	1,88	2,20	0,711	
Leukocyty	$\geq 11,50 \text{ mld/l}$	1,60	1,79	0,699	
Urea	$\geq 7,00 \text{ mmol/l}$	3,47	4,54	0,651	súčasť CURB-65
% SaO2	$\leq 92,0\%$	1,67	1,88	0,637	

Legenda: RR - relatívne riziko, DÚ - diagnostická účinnosť

nota, cut-off value) pre každý jednotlivý sledovaný parameter pri iniciálnom laboratórnom zhodnotení pacientov. Hodnoty rozhodovacích limitov pre jednotlivé parametre boli určené buď na základe prijatých arbitrárnych hodnôt (napr. pri stratifikačno-prognostickom indexe CURB-65), alebo boli odvodené z percentilového rozdelenia všetkých nameraných hodnôt, zväčša na úrovni 75-teho percentilu (rozhranie 3. a 4. kvartilu) a následnej analýzy za využitia binárnych (kontingenčných) tabuliek pri čo najvyššej diag-

nostickej účinnosti testu. Odhad prognózy (rizika úmrtia) pri danej diskriminačnej hodnote každého jednotlivého parametra sme hodnotili metódami epidemiologickej štatistiky (senzitivnosť, špecifickosť, diagnostická účinnosť, analýza rizika) (M o c á k a kol., 2008).

Diskriminačná hodnota pre ureu na úrovni $7,00 \text{ mmol/l}$ je hodnota určená arbitrárne ako súčasť v klinickej praxi zaužívaného stratifikačného a prognostického indexu CURB-65, ktorý sa využíva ako prediktor mortality

v komunite vzniknutej pneumónie, kam možno zaradiť aj ochorenie COVID-19 ako komunitnú pneumóniu vírusového pôvodu. Iba samotný parameter urea vyššia ako 7,00 mmol/l indikuje pri klasickej komunitnej pneumónii 30-dňovú úmrtnosť na úrovni 2,7 %. Pokiaľ sa pridruží aj vek vyšší ako 65 rokov, tak sa riziko 30-dňovej mortality zvýši na 6,8 % (M a c f a r l a n e, 2021).

N g u y e n a kol. (2020) pri aplikácii skóre CURB-65 u 279 pacientov s COVID-19 zistili, že pacienti s týmto ochorením mali horší priebeh (letalita 18,3 %), ako by ukazoval tento etablovaný prediktor pri klasickej komunitnej pneumónii, čiže využite tohto skórovacieho systému pri COVID-19 podhodnocuje závažnosť prognózy tohto ochorenia. Zdôvodňujú to aj tým, že CURB-65 nezahŕňa v sebe špecifika charakteristické pre COVID-19, a to najmä hypoxémiu vyžadujúcu oxygenoterapie, ako i vírusom indukovanú „cytokínovú búrku“, ktorej markerom je IL-6. So stanovením urey ako laboratórneho parametra prognostického skóre CURB-65 uvažujú pri COVID-19 aj Kavsa k a kol. (2020). Aj v našom prípade sme preukázali vyššie riziko mortality pacientov s COVID-19 pri hladinách urey vyšších ako 7,00 mmol/l (na čo však môžu vplývať aj iné rizikové faktory, najmä vek vyšší ako 65 rokov). Relatívne riziko úmrtia u pacientov s ureou vyššou ako 7,00 mmol/l voči skupine s ureou nižšou ako 7,00 mmol/l bolo takmer 3,5-krát vyššie.

Využitie zápalových laboratórnych markerov v monitorovaní priebehu a odhadu prognózy je pri zápalovom ochorení, akým je i COVID-19 viac-menej logické. Do úvahy prichádzajú bežne využívané zápalové markery – CRP, počet leukocytov, ale i napr. prokalcitonín, či feritín. Vzhľadom na vírusový pôvod ochorenia je však netypickým nálezom pomerne vysoký vzostup CRP, ktorý skôr sprevádza zápalové ochorenia baktériového pôvodu. V prípade tohto ochorenia je však potrebné vziať do úvahy patogenézu ochorenia – vírus SARS-CoV-2 atakuje nielen bunky imunitné (monocyty/makrofágy), ale aj bunky epitelu a cievneho endotelu, ktoré na sprievodnú tkanivovú hypoxiu reagujú vysokou produkciou cytokínov, najmä IL-6, ktorý ako najstabilnejší z nich má najlepšie predpoklady aj pre laboratórne stanovenie (T h o m a s, 1999). IL-6 je hlavnou signálnou molekulou na produkciu (proteosyntézu) CRP v pečeni ako markera akútnej fázy zápalu, a tak časovo predchádza laboratórnemu záchytu vzostupu CRP o 24–48 hodín (T h o m a s a kol., 1999). Na druhej strane cirkulujúci CRP aktivuje produkciu solubilného receptora

pre interleukín-6 (sIL-6R) a potencuje tak rozvoj zápalového procesu vytváraním komplexu sIL-6R/IL-6 (Jones a kol., 1999). Vyššie hladiny IL-6, CRP (porovnanie najvyššieho kvartilu voči najnižšiemu kvartilu) sú spojené s vyššou mortalitou (pri IL-6 1,9-násobok, pri CRP 1,6-násobok), ako to jednoznačne na 1293 zdravých starších jedincoch preukázali H a r r i s o v á a kol. (1999).

K a v s a k a kol. (2020) považujú CRP ako dôležitý diskriminačný parameter pri porovnaní skupín pacientov s COVID-19 zomrelých ($n = 113$) vs. prežijúcich ($n = 161$) a uvádzajú mediánovú diskriminačnú hladinu CRP 113 mg/l, rovnako tak aj IL-6, kde diskriminačnú hodnotu kladú v mediáne na úroveň 72 ng/l. Mortalitu u pacientov s COVID-19 pri iniciálnom vstupnom vyšetrení CRP vyššom ako 100 mg/l na úrovni 42 %, a pri iniciálnej hodnote pod 100 mg/l na úrovni 37 % zistili pri rozbere 95 hospitalizovaných pacientov s COVID-19 autori z Bardejova (H u d á k o v á a kol., 2021). Oba parametre – CRP aj IL-6 – môžu odlíšiť aj závažnosť priebehu COVID-19, ako to ukázali L i u a kol. (2020), pričom diskriminačnú hodnotu CRP stanovili na 41,8 mg/l a IL-6 na 32,1 ng/l.

V metaanalýze dát z 207 prác uvádzajú I z c o v i c h a kol. (2020) pri vysokom CRP (viac ako 100 mg/l) riziko mortality na úrovni odds ratio (OR) 6,6.

V našom súbore sme pri iniciálnej vstupnej hladine CRP vyššej ako 75,68 mg/l zistili riziko úmrtia na COVID-19 na úrovni 26,7 %, 1,88-krát vyššie voči pacientom, ktorí pri vstupnom vyšetrení mali hladinu CRP nižšiu ako uvedená cut-off hodnota (odds ratio 2,2). Obdobne v prípade vyšetrenia hladiny IL-6 pri prijatí vyššej ako 51,6 ng/l sme v našom súbore stanovili riziko úmrtia na úrovni 36,1 %, čo je 3,35-krát vyššie voči pacientom, u ktorých sa pri prijatí stanovila hladina IL-6 nižšia ako táto cut-off hodnota. Ďalšími zo zápalových parametrov, ktoré môžu odlíšiť priebeh ochorenia COVID-19 sú prokalcitonín (PCT) a feritín (L i u a kol., 2020, K a v s a k a kol., 2020, H u d á k o v á a kol., 2021). Prokalcitonín však v našom súbore bol vyšetrovaný iba nepravidelne, pri feritíne boli iniciálne vyšetrenia síce častejšie, avšak v menšom súbore dát sme nezistili štatisticky významnú diskriminačnú hodnotu. K a v s a k a kol., 2020 udávajú pri feritíne diskriminačnú hodnotu na úrovni 1418 µg/l, L i u a kol., 2020 pri PCT 0,07 µg/l.

Vírusový pôvod ochorenia sa však významne prejavuje v zmene diferenciálneho leukogramu, najmä poklesom lymfocytov (čo je pre väčšinu vírusových ochorení typic-

kou známkou), či už v absolútnom alebo relatívnom vyjadrení, ako i zmenami indexov odvodených výpočtami, napr. pomeru počtu neutrofilov ku lymfocytom.

Metaanalýza 207 prác (I z c o v i c h a kol., 2020) uvádza pre riziko mortality pri COVID-19 aj vysoký počet leukocytov (vyšší ako 10 mld/l) – odds ratio 4,06, pokles počtu lymfocytov (o 1 mld/l) – odds ratio 3,57, hodnoty D-diméru vyššie ako 1,00 mg/l, odds ratio 4,81.

V našom súbore sme pri cut-off celkového počtu leukocytov vyššieho ako 11,5 mld/l zachytili 1,6-krát vyššie riziko úmrtia ako v skupine pacientov s hladinami leukocytov nižšími (OR = 1,79), pri relatívnom počte lymfocytov pod 10,5 % ako diskriminačnej hodnote bolo riziko úmrtia 2,3-krát vyššie ako u pacientov, nad touto hranicou relatívneho počtu lymfocytov (OR = 2,85). Rovnako pri hodnotení indexu NLR v našom súbore vyššom ako 7,56 bolo riziko úmrtia 2,1-krát vyššie ako u pacientov s indexom NLR nižším ako uvedená diskriminačná hodnota (OR = 2,61). Zvýšenie indexu NLR je spôsobené dysreguláciou expresie zápalových cytokínov, upreguláciou génov, ktoré zapríčiňujú zánik (smrť) lymfocytov – spôsobenou mechanizmom infekcie SARS-CoV-2. Vzostup NLR je teda indikátorom závažnosti COVID-19, napríklad Ponti a kol. (2020) uvádzajú, že až 75,8 % pacientov s ťažkým priebehom COVID-19 počas hospitalizácie malo index NLR vyšší ako 2,973. Rovnako i metaanalýza piatich prác zaoberajúcich sa pomerom NLR u pacientov s COVID-19 preukázala signifikantný nárast pomeru NLR u pacientov s ťažkým priebehom COVID-19 (L a g u n a s - R a n g e l, 2020).

U pacientov s ťažšími formami COVID-19 je jedným z typických nálezov obmedzenie pľúcnych funkcií, i keď u hospitalizovaných sa má obmedziť vyšetrenie iba na testy, ktoré sú nevyhnutné pre rozhodnutia o okamžitej liečbe, pričom vyšetrenia krvných plynov z artériového odberu medzi takéto vyšetrenia patria (L a š š á n, K r i š t ú f e k, 2021). Tieto boli vyšetrované aj v našom súbore, pričom už pri prijatí sme zistili štatistickú významnosť pri vyšetrovaní saturácie artériovej krvi kyslíkom (v %) v skupine zomrelých a skupine preživších, pričom v priebehu hospitalizácie v skupine zomrelých prišlo ešte k ďalšiemu zhoršeniu saturácie artériovej krvi kyslíkom. Pri SaO_2 menšej ako 92 % bolo riziko úmrtia 24,2 % (približne 1,7-krát vyššie ako u pacientov so saturáciou vyššou ako takto určená diskriminačná hodnota). Podobné výsledky zaznamenali aj bardejovskí autori (H u d á k o v á

a kol., 2021), ktorí pri saturácii krvi kyslíkom pod 90 % pri prijatí uvádzajú úmrtnosť 40 %.

Posledným hodnoteným prognostickým markerom bolo vyšetrovanie D-diméru, ktorý poukazuje na úroveň fibrinolytického procesu pri rozpúšťaní vznikajúcich trombov (fibrínu), čo je pri COVID-19 charakteristické. D-dimér sa všeobecne považuje za ukazovateľ prognózy pri COVID-19, i keď arbitrárne prijatá diskriminačná hodnota vyššia ako 0,5 mg/l používaná za bežných okolností hlavne pri vylúčení trombogénneho procesu, mala nízky diskriminačný potenciál a v našom súbore až cut-off hodnota vyššia ako 2,0 mg/l mala dostatočný diskriminačný potenciál (relatívne riziko 1,7, OR = 1,91), i keď ako jediný zo sledovaných markerov bez štatistickej významnosti. Vyššia diskriminačná hodnota poukazuje práve na vyšší trombogénny potenciál COVID-19 ale i na vyššiu úroveň fibrinolytickej aktivity organizmu, pri ktorej ešte priebeh ochorenia môže byť priaznivý. Diskriminačnú hodnotu u hospitalizovaných pacientov na úrovni 2,0 mg/l pri prijatí uvádzajú ako optimálnu cut-off hodnotu aj čínski autori (Z h a n g a kol., 2020) pri analýze súboru 343 hospitalizovaných pacientov, s rizikom úmrtia viac ako 50-násobne vyšším ako u pacientov s hladinami D-diméru nižšími ako uvedená diskriminačná hodnota. Paradoxne vyššiu mortalitu (až 40 %) zaznamenali H u d á k o v á a kol. (2021) pri fyziologických hodnotách D-diméru pri prijatí, kým pri zvýšených hodnotách D-diméru pri prijatí bola zachytená mortalita na úrovni 30 %.

Pri zhodnotení jednotlivých laboratórnych parametrov používaných v našom súbore sme podľa hodnoty diagnostickej účinnosti jednotlivých testov (pri zadaných diskriminačných cut-off hodnotách) určili aj ich prediktívny potenciál pri odhade prognózy vývoja pacientov hospitalizovaných pre COVID-19. Vo všetkých prípadoch, s výnimkou vyšetrenia D-diméru, sme zachytili štatisticky významný potenciál (vyjadrený aj mierou diagnostickej účinnosti). Poukazuje to na významný prínos vyšetrovania laboratórnych parametrov pre odhad prognózy hospitalizovaných pacientov s COVID-19, čo je v súlade i so závermi publikovaných systematických prehľadov a metaanalýz. Výsledky tak v konečnom dôsledku môžu prispievať k ďalšiemu upresňovaniu a posilňovaniu medicíny, resp. laboratórnej medicíny založenej na dôkazoch (EBM, resp. EBLM), čo sa spektra výberu a diskriminačných hodnôt jednotlivých laboratórnych parametrov týka.

ZÁVER

Na základe analýz výsledkov vlastnej práce, ktoré sú v súlade s výsledkami početných prác svetového písomníctva, možno skonštatovať, že laboratórne parametre svojou diagnostickou informáciou prispievajú k správnosti a komplexnosti nielen iniciálneho posúdenia klinického stavu hospitalizovaného pacienta s COVID-19 ale i k priebežnému hodnoteniu jeho priebehu. Znalosť výberu parametrov a ich diskriminačných hodnôt môže prispieť k odhadu prognózy a stratifikácii rizika pacienta pri ochorení s vysokou mierou letality, akým je COVID-19. Cieľom práce je poskytnúť „iný“ pohľad na prognostický potenciál bežne používaných laboratórnych parametrov (napr. urea, CRP, počet leukocytov, lymfocytov), ako i niektorých menej často používaných markerov (napr. IL-6, index NLR). Využívanie laboratórnych parametrov tak môže v klinickej praxi významne prispievať k stratifikácii rizika hospitalizovaného pacienta s COVID-19, jeho následnom manažmente (včasnom prijatí najvhodnejších diagnosticko-terapeutických postupov), čím sa laboratórna diagnostika stáva základnou súčasťou integrovaného klinického a laboratórneho diagnostického algoritmu koronavírusovej infekcie a COVID-19.

LITERATÚRA

1. Bohn, M. K., Lippi, G., Horvath, A., et al. (2020): Molecular, serological and biochemical diagnosis and monitoring of COVID-19. IFCC Task force evaluation of the latest evidences. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2020, roč. 58, č. 7, p. 1037—1052.
2. Cucinotta, D., Vanelli, M. (2020): WHO Declares COVID-19 a Pandemic. *Acta Biomed.*, 2020; roč. 91, č. 1, p. 157—160. DOI: 10.23750/abm.v91i1.9397.
3. Červený, J., Mišík, M., Šufliarsky, K. (2021): Hospitalizácie počas pandémie SARS-CoV-2 Komentár o hospitalizáciách v súvislosti s koronavírusovou infekciou Inštitút zdravotných analýz. Ministerstvo zdravotníctva Slovenskej republiky. 23. februára 2021, 12 s. + dodatok A 3 s. Dostupné na: <https://www.health.gov.sk/?iza> (cit. 15. 10. 2021). Analýzy/ Komentár k základným štatistikám hospitalizácií pacientov s Covid19 na Slovensku (23. 2. 2021).
4. Friedecký, B., Kratochvíla, J. (2020): Laboratorní aspekty COVID-19. Diagnostika, epidemiologie, prognóza pacientů. *Klin. Biochem. Metab.*, (2020), roč. 28 (49), č. 3, p. 97—105.
5. Harris, T. B., Ferucci, L., Tracy, R. P., et al. (1999): Associations of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly. *Am. J. Med.*, 1999, roč. 106, p. 506—512.
6. Henry, B. M., Santos de Oliveira, M. H., Benoit, S., et al. (2020): Hematologic, biochemical and immune biomarker abnormalities associated with severe illness and mortality in coronavirus disease 2019 (COVID-19): a meta-analysis. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2020, 58 (7), 1023—1028, doi: 10.1515/cclm-2020-0369.
7. Hudáková, J., Chovanec, J., Oslacká, J., et al. (2021): Výskyt infekcie COVID-19 na internom oddelení NsP Bardejov počas druhej vlny pandémie COVID-19 (súbor pacientov). *Interná med.*, 2021, roč. 21, č. 6: p. 287—291.
8. Izcovich, A., Ragusa, M. A., Tortosa, F., et al. (2020): Prognostic factors for severity and mortality in patients infected with COVID-19: A systematic review. *PLOS One*, 15(11): e0241955. doi: 10.1371/journal.pone.0241955.
9. Jones, S. A., Novick, D., Horiuchi, S., et al. (1999): C-reactive protein: a physiological activator of interleukin 6 receptor shedding. *J. Exp. Med.*, 1999, roč. 189, č. 3, p. 599—604.
10. Kavsak, P. A., DeWit, K., Worster, A. (2020): Emerging key laboratory tests for patients with COVID-19. *Clin. Biochem.*, 2020, 81: 13—14.
11. Lagunas-Rangel, F. A. (2020): Neutrophil-to-lymphocyte ratio and lymphocyte-to-C-reactive protein ratio in patients with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): A meta-analysis. *J. Med. Virol.*, 2020, p. 1—2. doi: 10.1002/jmv.25819.
12. Laššán, Š., Krištúfek, P. (2021): COVID 19. *Respiro*, 2021, roč. 19, č. 2, p. 44—50.
13. Liu, F., Li, L., Xu, M., et al. (2020): Prognostic value of interleukin-6, C-reactive protein, and procalcitonin in patients with COVID-19. *J. Clin. Virol.*, 2020; roč. 127, <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104370>.
14. Macfarlane, J. (2021): CURB-65-score-pneumonia-severity. MD+Calc. Dostupné: <https://www.mdcalc.com/curb-65-score-pneumonia-severity> (cit. 15. 10. 2021).
15. Mocák, J., Balla, B. (2008): Hodnotenie úspešnosti laboratórnych testov a možnosti počítačom podporovanej klinickej diagnózy, p. 67—72. In Gaško, R. (ed.), 2008: *Štatistické metódy pre klinickú epidemiológiu a laboratórnu prax*. Košice: Vydavateľstvo APRILLA, 1. vyd., 91 p., ISBN-978-80-89346-00-4.
16. Nguyen, Y., Corre, F., Honsel, V., et al. (2020): Applicability of the CURB-65 pneumonia severity score for outpatient

- treatment of COVID-19. *J. Infection*, 2020, roč. 81, p. e96—e98. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.05.049>.
17. **Ponti, G., Maccaferri, M., Ruini, C., et al. (2020):** Biomarkers associated with COVID-19 disease progression. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 2020, doi: 10.1080/10408363.2020.1770685.
18. **Svetová zdravotnícka organizácia (WHO)** práve prehlásila nový koronavírus za pandémiu. 11. 3. 2020. Dostupné na: <https://www.omeiach.com/strucne/17397-mimoriadna-sprava-svetova-zdravotnicka-organizacia-who-prave-pre-hlasila-novy-koronavirus-za-pandemiu> (cit. 7. 3. 2021).
19. **Thomas, L. (ed.), (1999):** *Clinical Laboratory Diagnostics. Use and Assessment of Clinical Laboratory Results*. Frankfurt/Main TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, 1. English Edition, 1527 p., ISBN 3-9805215-4-0.
20. **Zhang, L., Yan, X., Fan, Q., et al. (2020):** D-dimer levels on admission to predict -in-hospital mortality in patients with Covid-19. *J. Thromb. Haemost.*, 2020 Jun; 18(6): 1324—1329. doi: 10.1111/jth.14859.



Laboratórna Diagnostika, XXVI, 2, 2021: 54–59

PRIMÁRNE VÝSLEDKY SKRÍNINGU POLYMORFIZMOV PLAZMATICKEJ CHOLÍNESTERÁZY ZODPOVEDNÝCH ZA JEJ ZNÍŽENÚ AKTIVITU PRIMARY RESULTS OF SCREENING FOR PLASMA CHOLINESTERASE POLYMORPHISMS RESPONSIBLE FOR ITS REDUCED ACTIVITY

Čuchráč Lukáš¹, Mydlárová-Blašáková Marta², Firment Jozef¹
Šimonová Jana¹, Bernasovská Jarmila², Janka Vašková³

¹I. Klinika anestéziológie a intenzívnej medicíny, UPJŠ LF, Košice

²Katedra Biológie, FHPV PU, Prešov

³Ústav lekárskej a klinickej biochémie, UPJŠ LF, Košice

e-mail: janka.vaskova@upjs.sk
pôvodná práca

SÚHRN

Pretrvávajúca pooperačná svalová paralýza následkom použitia nervovosvalových blokátorov sa vyskytuje pomerne často. Incidencia je závislá tak od druhu blokátora ako aj liečiva použitého na reverziu neuromuskulárnej blokády. Je spájaná s hypoxiou, slabosťou vedúcou k respiračnému zlyhaniu a zvýšeniu perioperačnej morbidity. Vzhľadom na prítomnosť početných polymorfizmov v géne pre plazmatickú acetylcholinesterázu ovplyvňujúcich jej aktivitu a následne aj reakciu na podávané liečivá, je práca zameraná na skríning dvoch polymorfizmov, ktoré znižujú jej aktivitu približne o 30 %. Prvotné výsledky naznačujú pomerne vysoký výskyt alel variantu K.

Kľúčové slová: acetylcholinesteráza; butyrylcholinesteráza; cholinesteráza; nervovosvalový blokátor; polymorfizmus; reziduálna kurarizácia

ABSTRACT

Persistent postoperative muscle paralysis due to the use of neuromuscular blockers is relatively common. The incidence depends either on the type of blocker or the drugs used to reverse neuromuscular blockade. It is associated with hypoxia, weakness leading to respiratory failure and increased perioperative morbidity. Due to the presence of numerous plasma acetylcholinesterase gene polymorphisms affecting its activity and subsequently the response to administered drugs, the work is focused on the screening of two polymorphisms that reduce its activity by approximately 30 %. Initial results suggest a relatively high incidence of K variant alleles.

Key words: acetylcholinesterase; butyrylcholinesterase; cholinesterase; neuromuscular blocker; polymorphism; residual curarisation

ÚVOD

Neuromuskulárnej blokátory (NMBA) sú súčasťou každodennej anestetickkej praxe na celom svete. Len v USA sa odhaduje, že sa uskutoční 51,4 milióna chirurgických zákrokov ročne (B r u l l, K o p m a n, 2017). V Európe sa odhaduje 34,8 milióna postupov (W e i s e r a kol., 2008). Kombinované celosvetové odhady predpokladajú celkový objem 234,4 milióna chirurgických zákrokov ročne. Pooperačná reziduálna kurarizácia (PORC, Post-Operative Residual Curarization) je charakterizovaná ako prítomnosť svalovej únavy, vyčerpania alebo nedostatočnosti následkom použitia NMBA s predĺženým pooperačným účinkom. PORC je asociovaná s hypoxiou, slabosťou vedúcou k respiračnému zlyhaniu a zvýšením perioperačnej morbidity. Tieto príznaky, ako slabosť, hypoxia či nemožnosť odkašľať sa môžu vyskytovať relatívne často, ale málokedy sa dávajú do spojitosti s reziduálnou kurarizáciou.

Štúdie preukázali výskyt PORC v rozmedzí od 4 do 50% v závislosti na diagnostických kritériách, od druhu použitého NMBA a od podania medikamentov, ktoré zvrátia svalovú paralýzu (B u t t e r l y a kol., 2010; P l a u d a kol., 2010). Dokonca M u r p h y, B r u l l (2010) uvádzajú incidenciu v rozmedzí od 2 % do 64 %. Tento problém má značné klinické dôsledky spojené so svalovou slabosťou, poklesom arteriálnej saturácie krvi kyslíkom, alveolárnym kolapsom až akútnym respiračným zlyhaním, ktoré môže viesť k vážnemu poškodeniu mozgu až smrti.

Sukcynylcholín a rokurónium sú typicky používané NMBA, keď je potrebná neuromuskulárna blokáda na rýchle uľahčenie tracheálnej intubácie (T r a n a kol., 2015). Sukcynylcholín je hydrolyzovaný butyrylcholínesterázou (BCHE, plazmatická cholínesteráza, pseudochocholínesteráza) a obnovenie neuromuskulárnej funkcie je u pacientov s normálnou aktivitou BCHE približne 9 minút, ale s výraznou variabilitou. Táto variabilita môže súvisieť so získanými a dedičnými faktormi (B r e t l a u a kol., 2013). Rokurónium nie je metabolizované BCHE, a pretrvávajúca svalová blokáda môže byť zvrátená sugammadexom (K e a t i n g, 2016). Rokurónium však nemusí byť ideálne pre všetkých pacientov, pretože nepôsobí tak krátko ako sukcinylcholín a môže byť spojené s hepatotoxicitou (S a u e r et al., 2017). Okrem toho použitie rokurónia v celkovej anestézii v pôrodníctve bolo spojené s nepriaznivými dôsledkami pre novorodencov v porovnaní so sukcinylcholínom (K o s i n o v a et al., 2017). Na-

vyššie zvrátenie bloku sugammadexom nie je vždy úspešné u myastenických pacientov (F e r n a n d e s a kol., 2019).

Nedostatok BCHE má autozomálne recesívnu dedičnosť, s mnohými variantami, ktoré môžu spôsobiť určitý stupeň zníženého metabolizmu esteru cholínu, ale nepredstavuje žiadne ďalšie zdravotné riziká, preto je možné ho zistiť až po použití sukcinylcholínu alebo mivakúria. Približne 25 % kaukazskej populácie má mutácie v géne pre BCHE (L o c k r i d g e, M a s s o n, 2000; G ä t k e a kol., 2005). Väčšina doteraz opísaných variant je výsledkom jednonukleotidového polymorfizmu (G o o d a l l, 2004). Nedávno však bola preukázaná asociácia polymorfizmu rs1803274 v BCHE géne so zvýšeným rizikom koronárnej restenózy in-stentu (P l e v a a kol., 2015), Alzheimerovou chorobou (N o r d b e r g a kol., 2013), ale aj metabolickými rizikovými faktormi (kardiovaskulárnymi, obezitou, krvným tlakom, diabetes) (B e n y a m i n a kol., 2011).

Účelom tejto štúdie je zistiť frekvenciu výskytu polymorfizmov v BCHE géne, zodpovedných za zníženie aktivity BCHE u pacientov podstupujúcich chirurgický výkon na Slovensku.

MATERIÁL A METODIKA

Štúdia bola schválená Etickou komisiou UNLP Košice č. 115/EK/18. Účastníci (18) podstúpili operačný výkon v celkovej anestézii s použitím nedepolarizačného relaxancia – rokurónium s intermediárnou dĺžkou pôsobenia. Všetci účastníci boli extubovaní na operačnej sále a v doprovode anestéziológa a anestéziologickej sestry transportovaní do zotavovacej izby, kde boli ihneď napojení na monitor vitálnych funkcií. Bol im aplikovaný kyslík tvárovou maskou v rámci oxygenoterapie a na predlaktie pripevnený monitor svalovej relaxácie TOF-Watch (Organon, SwordsCo., Dublin, Írsko). TOF stimuláciou bol stimulovaný ulnáry nerv (4 pulzy v trvaní 0,2 ms a s frekvenciou 2 Hz). Tri po sebe idúce merania TOF boli vykonané s odstupom 15 minút a vypočítal sa priemer. Zo zotavovacej miestnosti boli prepustení až po dosiahnutí hodnôt TOF ratio $\geq 0,9$. Zaznamenané boli aj váha, výška (z nich vypočítané BMI), pohlavie, vek, dĺžka výkonu, telesná teplota a ASA (American Society of Anaesthesiologist physical status classification). Do protokolu sa zaznamenali informácie aj o dekurarizácii pacienta a podaní sugammadexu.

Genomická DNA bola izolovaná z periférnej krvi pa-

cientov do skúmaviek s obsahom antikoagulačného činidla (K3EDTA) podľa pokynov výrobcu komerčne vyrobeného kitu UltraClean® Blood non-spin® DNA Isolation Kit (Carlsbad, CA, USA). Polymorfizmy génu BCHE (rs1799807, rs1803274) boli vybraté na základe štúdií, ktoré sa spájajú so zníženou aktivitou butyrylcholinesterázy. Genotypizácia bola uskutočnená prostredníctvom TaqMan SNP Assay (C__2411904_20; C__27479669_20) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) na základe štandardného protokolu. Florescencia bola detegovaná prostredníctvom metódy Real-Time PCR s využitím prístroja 7500 Fast Real-Time PCR Systém (Applied Biosystem). Mutantný genotyp bol overený sekvenovaním a následne bol použitý ako pozitívna kontrola pre každý experiment. Genotypovanie bolo uskutočnené prostredníctvom TaqMan SNP genotyping assay (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Pre BCHE bolo identifikovaných najmenej 75 genetických variantov (Lockridge, 2015). Genetické varianty v BCHE spôsobujú nedostatok aktivity enzýmu BCHE, čo vedie k vyšším plazmatickým koncentráciám succinylcholínu, a tým k predĺženej neuromuskulárnej blokade. Pacienti s týmito genetickými variantmi sú zvyčajne asymptomatickí, kým nie sú vystavení succinylcholínu počas chirurgického zákroku (Solda, 2010). Najznámejší variant BCHE je atypický variant (variant „A“). Podkladom atypického variantu je jednonukleotidový substitučný polymorfizmus rs 1799807 (G), ktorý vedie k zámene aspartátu za glycín na sekundárnom väzbovom mieste substrátu/inhibítora. Forma „A“ BCHE má o 30% nižšiu enzýmovú aktivitu (Zhu, 2020). Atypický variant je najčastejšou príčinou predĺženej apnoe (Delacour, 2016), a pacientom s homozygotným genotypom pre tento variant použitie succinylcholínu odporúčané nie je. Z našich počiatkových analýz 18-tich vzoriek bol iba jeden jedinec rizikový pre použitie succinylcholínu s ohľadom na heterozygotný genotyp (Tabuľka 1).

Alela A jednonukleotidového polymorfizmu rs1803274 kóduje variantu Kalow (K) spôsobenú zamenou guanínu za adenín na nukleotide 1615, čo vedie k zmene kodónu GCA na ACA a zámene aminokyselín alanín za treonín v kodóne 539 (Ala539Thr). V dôsledku toho je aktivita BCHE znížená a vedie k 30 % predĺženiu trvania neuromusku-

Tabuľka 1. Frekvencie alel a genotypov polymorfizmov rs1799807 a rs1803274 génu BCHE u pacientov podstupujúcich chirurgický výkon

Polymorfizmus	Frekvencie alel		Frekvencie genotypov		
	G	A	GG	GA	AA
rs1799807	1	35	0	1	17
	2.78%	97.22%	0.00%	5.56%	94.44%
rs1803274	29	7	12	5	1
	80.56%	19.44%	66.66%	27.78%	5.56%

lárnej blokády aj po podaní mivakúria (Gätker, 2005; Levan, 2005). Výskyt rizikovej alely pre polymorfizmus rs1803274 bol v zatiaľ malej vyšetrenej vzorke pomerne vysoký (19.44 %) a takmer 28 % jedincov nieslo rizikový genotyp. Jeden z vyšetrených pacientov bol pre variant K homozygotný. Kombinácie najčastejšie sa vyskytujúcich genotypov zatiaľ nepotvrdili súčasný výskyt oboch variantov u homozygotných jedincov. Ako vyplýva z tabuľky 2, iba jeden pacient bol nositeľom rizikových alel pre oba varianty. Význam K-variantu pre trvanie účinku succinylcholínu nebol dobre preštudovaný, aj keď frekvencia alel K-variantu je pomerne vysoká 0,12 až 0,27 v niektorých populáciách s pôvodom v Severnej Amerike (Lockridge, Mason, 2000; Levan, 2008), Japonsku (Izumi, 1994), Brazílii (Mikami, 2008), Taliansku (Landi, 2003), Dánsku (Jensen, 1996) a približne 1 z každých 63 pacientov je nositeľom homozygotného genotypu (Levan, 2008).

Nedepolarizujúce relaxanciá účinkujú kompetitívnym obsadením receptorov acetylcholínu. Napríklad atrakúrium nie je metabolizované BCHE, ale hydrolýzou esterovej väzby alebo Hoffmanovou elimináciou. Vekurónium a rokurónium sú vylučované žľazou (Beaumont, 2001). V štúdii bolo použité výlučne rokurónium, ktoré nie je metabolizované BCHE. U troch pacientov (16.6 %) bolo nutné zvrátiť účinok rokurónia sugammadexom, ktorý s ním vytvára komplex, alebo neostigmínom, ktorý inhibuje hydrolýzu acetylcholínu kompetíciou o miesta cholinergnej transmisie na acetylcholinesteráze. Atypická BCHE je odolná voči inhibícii kladne nabitými liečivami neostigmínom a fyzostigmínom. 50 % inhibícia aktivity atypickej BCHE v ľudskom sére si vyžaduje 20-krát vyššie koncentrácie fyzostigmínu a neostigmínu ako v prípade divokého typu BCHE (Kalow, Davies, 1959). Traja pacienti, ktorým bola podaná dekurarizácia však boli nositeľmi variantu K. Predpokladá sa, že genetické varianty

Tabuľka 2. Výskyt kombinovaných genotypov a ďalších sledovaných parametrov u pacientov podstupujúcich chirurgický výkon

	rs1799807	rs1803274	Pohlavie	vek	BMI	hmotnosť	ASA	neostigmin	sugammadex	dĺžka anes- tézie	Telesná tep- lota	TOF
1	AA	AA	ž	48	34.95	94	3	0	0	150	36.2	100
2	AA	GG	m	70	24.62	78	3	0	0	220	36.4	95
3	AA	GG	m	53	33.69	102	2	0	0	720	36	93
4	AA	GA	m	73	24.62	87	3	2.5	0	180	35.5	34
5	AA	GG	ž	63	28.28	77	2	0	0	200	36.2	92
6	AA	GG	ž	64	37.78	87	3	0	0	240	36.1	100
7	AA	GG	ž	61	37.25	93	2	0	0	245	36.2	100
8	AA	GG	ž	50	30.97	106	2	0	0	245	35.9	90
9	AA	GA	m	72	22.77	65	3	0	200	225	36	20
10	AA	GG	ž	70	29.76	84	2	0	0	200	36	92
11	GA	GA	ž	28	20.55	58	1	0	0	295	36	97
12	AA	GA	ž	68	42.98	117	3	0	200	135	36.1	48
13	AA	GA	ž	36	29.3	75	1	0	0	330	36.6	95
14	AA	GG	ž	53	25	64	2	0	0	270	36.5	83
15	AA	GG	m	63	38.99	114	3	2.5	0	205	36.6	94
16	AA	GG	ž	67	22.2	68	2	0	0	185	36.3	94
17	AA	GG	m	63	32.87	95	3	2.5	0	120	35.9	84
18	AA	GG	ž	66	29.75	81	3	2.5	0	150	36.1	80

s abnormálne nízkymi hladinami BCHE vrátane K-variantov a tichých variantov sú naopak na nízke dávky neobvykle citlivé (Lo c k r i d g e a kol., 2016).

ZÁVER

Genetické analýzy polymorfizmov BCHE na identifikáciu pacientov s rizikom predĺženej postsukcynylcholínovej neuromuskulárnej blokády môžu v klinickej praxi umož-

niť jednoduchšie rozhodovanie pri výbere alternatívnych NMBA. Použitie nedepolarizujúcich relaxancií, ktoré nie sú metabolizované acetylcholinesterázou, nie je definitívnym východiskom pre predchádzanie pooperačnej reziduálnej kurarizácie, nakoľko efektívnosť liečiv ovplyvňujúcich reverziu neuromuskulárnej blokády je taktiež ovplyvnená prítomnosťou alebo neprítomnosťou genetického variantu acetylcholinesterázy. Skrining výskytu variantov bude nápomocný pre rýchlu a adekvátnu liečbu pooperačnej reziduálnej kurarizácie.

Podakovanie

Práca je realizovaná s podporou grantu SSAIM pre rok 2021 „Sledovanie hladiny cholinesterázy“.

LITERATÚRA

1. Beaufort, T. M., Proost, J. H., Maring, J. G., et al. (2001): Effect of hypothermia on the hepatic uptake and biliary excretion of vecuronium in the isolated perfused rat liver. *Anesthesiology*, 94(2), 270—279. doi: 10.1097/00000542-200102000-00017.
2. Benyamin, B., Middelberg R. P., Lind, P. A., et al. (2011): GWAS of butyrylcholinesterase activity identifies four novel loci, independent effects within BCHE and secondary associations with metabolic risk factors. *Human Molecular Genetics*, 20(22), 4504—4514. doi: 10.1093/hmg/ddr375.
3. Bretlau, C., Sørensen, M. K., Vedersøe, A. Z., et al. (2013): Response to Succinylcholine in Patients Carrying the K-Variant of the Butyrylcholinesterase Gene. *Anesthesia & Analgesia*, 116(3), 596–601. doi: 10.1213/ANE.0b013e318280a3f3.
4. Brull, S. J., Kopman, A. F. (2017): Current status of neuromuscular reversal and monitoring: challenges and opportunities. *Anesthesiology*, 126(1), 173—190. doi: 10.1097/ALN.0000000000001409.
5. Butterly, A., Bittner, E. A., George, E., et al. (2010): Postoperative residual curarization from intermediate-acting neuromuscular blocking agents delays recovery room discharge. *British Journal of Anaesthesia*, 105(3), 304—309. doi:10.1093/bja/aeq157.
6. Delacour, H., Dedome, E., Courcelle, S., et al. (2016): Butyrylcholinesterase deficiency. *Annales Biologie Clinique (Paris)*, 74(3), 279–285. doi: 10.1684/abc.2016.1141.
7. Fernandes, H. D. S., Ximenes, J. L. S., Nunes, D. I., et al. (2019): Failure of reversion of neuromuscular block with sugammadex in patient with myasthenia gravis: case report and brief review of literature. *BMC Anesthesiology*, 19(1), 160. doi: 10.1186/s12871-019-0829-0.
8. Gätke, M. R., Viby-Mogensen, J., Ostergaard, D., et al. (2005): Response to mivacurium in patients carrying the K variant in the butyrylcholinesterase gene. *Anesthesiology*, 102(3), 503—508. doi: 10.1097/00000542-200503000-00005.
9. Goodall, R. A. (2004): Association of Clinical Biochemists Analytical Investigations Standing Committee. (2004). Cholinesterase: phenotyping and genotyping. *Annals of Clinical Biochemistry*, 41(Pt 2), 98—110. doi: 10.1258/000456304322879971.
10. Izumi, M., Maekawa, M., Kanno, T. (1994): Butyrylcholinesterase K-variant in Japan: frequency of allele and associated enzyme activity in serum. *Clinical Chemistry*, 40(8), 1606—1607.
11. Jensen, F. S., Nielsen, L. R., Schwartz, M. (1996): Detection of the plasma cholinesterase K variant by PCR using an amplification-created restriction site. *Human Heredity*, 46(1), 26—31. doi: 10.1159/000154321.
12. Kalow, W., Davies, R. O. (1959): The activity of various esterase inhibitors towards atypical human serum cholinesterase. *Biochemical Pharmacology*, 1, 183—192. doi: 10.1016/0006-2952(59)90097-8.
13. Keating, G. M. (2016): Sugammadex: a review of neuromuscular blockade reversal. *Drugs*, 76(10), 1041—1052. doi: 10.1007/s40265-016-0604-1.
14. Kosinova, M., Stourac, P., Adamus, M., et al. (2017): Rocuronium versus suxamethonium for rapid sequence induction of general anaesthesia for caesarean section: influence on neonatal outcomes. *International Journal of Obstetrics Anesthesia*, 32, 4—10. doi: 10.1016/j.ijoa.2017.05.001.
15. Lando, G., Mosca, A., Bonora, R., et al. (2003): Frequency of butyrylcholinesterase gene mutations in individuals with abnormal inhibition numbers: an Italian-population study. *Pharmacogenetics*, 13(5), 265—270. doi: 10.1097/00008571-200305000-00005.
16. Levano, S., Ginz, H., Siegemund, M., et al. (2005): Genotyping the butyrylcholinesterase in patients with prolonged neuromuscular block after succinylcholine. *Anesthesiology*, 102(3), 531—535. doi: 10.1097/00000542-200503000-00009.
17. Levano, S., Keller, D., Schobinger, E., et al. (2008): Rapid and accurate detection of atypical and Kalow variants in the butyrylcholinesterase gene using denaturing high performance liquid chromatography. *Anesthesia & Analgesia*, 106(1), 147—51. doi: 10.1213/01.ane.0000296455.31211.bd.
18. Lockridge, O. (2015): Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. *Pharmacology & Therapeutics*, 148, 34—46. doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.11.011.
19. Lockridge, O., Masson, P. (2000): Pesticides and susceptible populations: people with butyrylcholinesterase genetic variants may be at risk. *Neurotoxicology*, 21(1—2), 113—126.
20. Lockridge, O., Norgren, R. B., Johnson, R. C., et al. (2016): Naturally occurring genetic variants of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase and their potential impact on the risk of toxicity from cholinesterase inhibitors. *Chemistry*

- cal Research in Toxicology*, 29(9), 1381—1392. doi: 10.1021/acs.chemrestox.6b00228.
21. Mikami, L. R., Wieseler, S., Souza, R. L., et al. (2008): Five new naturally occurring mutations of the BCHE gene and frequencies of 12 butyrylcholinesterase alleles in a Brazilian population. *Pharmacogenet Genomics*, 18(3), 213—218. doi: 10.1097/FPC.0b013e3282f5107e.
 22. Murphy, G. S., Brull, S. J. (2010). Residual neuromuscular block: lessons unlearned. Part I: definitions, incidence, and adverse physiologic effects of residual neuromuscular block. *Anesthesia & Analgesia*, 111(1), 120—128. doi: 10.1213/ANE.0b013e3181da832d.
 23. Nordberg, A., Ballard, C., Bullock, R., et al. (2013): A Review of Butyrylcholinesterase as a Therapeutic Target in the Treatment of Alzheimer's Disease. *Primary Care Companion for CNS Disorders*, 15(2), PCC.12r01412. doi: 10.4088/PCC.12r01412.
 24. Plaud, B., Debaene, B., Donati, F., et al. (2010): Residual Paralysis after Emergence from Anesthesia. *Anesthesiology*, 112(4), 1013—1022. doi: 10.1097/ALN.0b013e3181cded07.
 25. Pleva, L., Kovarova, P., Faldynova, L., et al. (2015). The rs1803274 polymorphism of the BCHE gene is associated with an increased risk of coronary in-stent restenosis. *BMC Cardiovascular Disorders*, 15, 135. doi: 10.1186/s12872-015-0128-8.
 26. Sauer, M., Piel, I., Haubner, C., et al. (2017): Rocuronium is more hepatotoxic than succinylcholine *in vitro*. *European Journal of Anaesthesiology*, 34(9), 623—627. doi: 10.1097/EJA.0000000000000666.
 27. Soliday, F. K., Conley, Y. P., Henker, R. (2010): Pseudocholinesterase deficiency: a comprehensive review of genetic, acquired, and drug influences. *AANA Journal*, 78(4), 313—320.
 28. Tran, D. T., Newton, E. K., Mount, V. A., et al. (2015): Rocuronium versus succinylcholine for rapid sequence induction intubation. *Cochrane Database Systematic Reviews*, 10, CD002788.
 29. Weiser, T. G., Regenbogen, S. E., Thompson K. D., et al. (2008): An estimation of the global volume of surgery: a modelling strategy based on available data. *Lancet*, 372(9633), 139—144. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60878-8.
 30. Zhu, G. D., Dawson, E., Huskey, A., et al. (2020): Genetic testing for BCHE variants identifies patients at risk of prolonged neuromuscular blockade in response to succinylcholine. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*, 13, 405—414. doi: 10.2147/PGPM.S263741.



Laboratórna Diagnostika, XXVI, 2, 2021: 60–66

RIZIKOVÉ FAKTORY PARODONTITÍDY RISK FACTORS OF PERIODONTITIS

Kluknavská Jana¹, Vašková Janka²

¹I. stomatologická klinika LF UPJŠ a UNLP, Košice

²Ústav lekárskej a klinickej biochémie LF UPJŠ, Košice

pôvodná práca

SÚHRN

Parodontitída je ochorenie, ktoré môže byť príčinou predčasnej straty zubov a s tým spojených ďalších ťažkostí. Mikroorganizmy nachádzajúce sa v mikrobiálnom plaku spôsobujú deštrukciu parodontálnych tkanív. Rozsah poškodenia závisí tiež od imunitnej odpovede hostiteľa a ďalších rizikových faktorov, ktoré podporujú zápalový proces. Medzi rizikové faktory parodontitídy môžeme zaradiť fajčenie, diabetes, nedostatočnú ústnu hygienu, lokálne dráždenie a ďalšie. Okrem toho samotný stav parodontu môže tiež ovplyvňovať celkové zdravie. V tejto štúdii sme hodnotili výskyt rizikových faktorov a iných podmienok, ktoré môžu podporovať parodontitídu a ich zastúpenie v jednotlivých skupinách s ochorením parodontu v porovnaní so zdravou skupinou. Vzhľadom na malý počet pacientov, niektoré parametre nebolo možné štatisticky vyhodnotiť.

Kľúčové slová: parodontitída; zápal; rizikové faktory

ABSTRACT

Periodontitis is a disease that can cause premature tooth loss and other associated problems. Microorga-

nisms found in microbial plaque cause the destruction of periodontal tissues. The extent of the damage also depends on the host's immune response and other risk factors that support the inflammatory process. Risk factors for periodontitis include smoking, diabetes, poor oral hygiene, local irritation and others. In addition, the condition of the periodontium itself can also affect overall health. In this study, we evaluated the occurrence of risk factors and other conditions that may promote periodontitis and their representation in individual groups with periodontal disease compared to a healthy group. Due to the small number of patients, some parameters could not be statistically evaluated.

Key words: periodontitis; inflammation; risk factors

ÚVOD

Parodontitída je chronické zápalové ochorenie parodontu, vznikajúce v dôsledku pôsobenia baktérií a tiež iných podporných faktorov. Je to druhá najčastejšie príčina predčasnej straty zubov. V súčasnosti je známe, že okrem pôsobenia mikroorganizmov, v patogenéze parodontálnych ochorení zohráva úlohu tiež imunitná odpoveď hostiteľa. Zápalové zmeny spočiatku postihujú len tkanivo

gingívy čo vedie k jej zápalu, následne ak včas nie je započatá liečba, zápalový proces postihuje hlbšie štruktúry až dochádza k narušeniu spojivového epitelu. V dôsledku narušenia spojivového epitelu vznikajú parodontálne vaky, zápalový proces deštruuje hlbšie štruktúry a následne môže viesť až k predčasnej strate zubov.

Podľa štúdie „Global Burden of Disease Study 2016“ je závažné ochorenie parodontu 11. najrozšírenejším na svete (GBD, 2017). Prevalencia parodontálnych ochorení sa na celom svete pohybuje od 20 % do 50 % (S a n z, 2010). Počas obdobia od roku 1990 do roku 2010 došlo až k 57,3 % nárastu výskytu ochorení parodontu (J i n et al., 2016).

Okrem základných faktorov pre vznik parodontitídy (mikrobiálny povlak a imunitná odpoveď hostiteľa) sú dnes známe rizikové a podporné faktory, ktoré podporujú vznik alebo progresiu parodontálneho ochorenia. Niektoré rizikové faktory sú ovplyvniteľné ako fajčenie, diabetes a tiež lokálne faktory (nevýhovujúce výplne a protetické práce, nevhodné použitie matríc alebo kofferdamu a ďalšie) a niektoré faktory sú neovplyvniteľné ako vek, pohlavie a tiež genetický podklad (V a n D y k e, D a v e, 2005).

Okrem toho, že celkové faktory môžu zvyšovať riziko a progresiu parodontitídy taktiež parodontálne patogény môžu mať priamy alebo nepriamy vplyv na celkové zdravie. Aj keď sú potrebné ďalšie štúdie na pochopenie tohto vzťahu je zrejmé, že zlepšenie ústneho zdravia má pozitívny vplyv na celkové ochorenia (B u i a kol., 2019).

MATERIÁL A METÓDY

Štúdia bola schválená Etickou komisiou Univerzitetnej nemocnice Louisa Pasteura v Košiciach pod č. 2018/EK/2010. Potenciálni účastníci štúdie boli pred zaradením do štúdie podrobne oboznámení s priebehom výskumu, následne podpísali informovaný súhlas a vyplnili predložený dotazník. Štúdie sa zúčastnilo 101 respondentov, v období od januára 2019 do marca 2020, s odberom vzoriek a vypísaním súvisiaceho dotazníka na I. stomatologickej klinike LF UPJŠ a UNLP.

Respondenti boli rozdelení do štyroch skupín. Zdravú, kontrolnú skupinu tvorilo 43 jedincov, u ktorých neboli pozorované žiadne zápalové zmeny gingívy, žiadna resorpcia alveolárnej kosti, parodontálne vaky neboli prítomné a taktiež neboli prítomné nánosy mikrobiálneho plaku a kameňa. Druhú skupinu tvorilo 17 pacientov, u ktorých

bola pozorovaná gingivitída. Pri klinickom vyšetrení gingíva bola začervenaná, edematózne presiaknutá a taktiež bolo prítomné krvácanie na podnet po sondovaní. Okrem toho boli prítomné nánosy mikrobiálneho plaku a kameňa. Parodontálne vaky sondované neboli, rovnako resorpcia alveolárnej kosti na RTG viditeľná nebola. Pri hodnotení indexu CPITN boli namerané hodnoty 1, svedčiace pre krvácanie a hodnota 2 svedčiaca pre nánosy zubného kameňa alebo previslé výplne. Tieto hodnoty boli merané vo väčšine sextantov u týchto pacientov. Do tretej skupiny bolo zaradených 23 pacientov s chronickou parodontitídou (CP). Pri klinickom vyšetrení u týchto pacientov boli pozorované charakteristické znaky parodontitídy. Zápalové zmeny gingívy, ktoré sa prejavili začervenaním, edematóznym presiaknutím a krvácaním po sondovaní. Prítomné boli parodontálne vaky s hĺbkou do 6 mm čomu prislúcha hodnota 3 CPITN indexu a parodontálne vaky hĺbky viac ako 6 mm, ktorým bola priradená hodnota 4 CPITN indexu. Taktiež bola pozorovaná resorpcia alveolárnej kosti na RTG snímku a nánosy mikrobiálneho plaku a kameňa. Poslednú skupinu tvorilo 16 pacientov, u ktorých bola diagnostikovaná agresívna parodontitída (AP). U týchto pomerne mladých jedincov boli pozorované parodontálne vaky hĺbky viac ako 6 mm. Gingíva bola prevažne ružovej farby s bodkovitým krvácaním po sondovaní. Celkovo stav ústnej hygieny nezodpovedal rozsahu poškodenia parodontu, keďže pri pomerne dobrej a dostatočnej hygiene došlo k výraznej deštrukcii parodontu v pomerne mladom veku a v anamnéze boli zistené opakované zápalové ataky približne od 20. roku života. Na RTG snímkach bola pozorovaná horizontálna resorpcia alveolárnej kosti a v niektorých oblastiach tiež vertikálna či miskovitá resorpcia. U skupiny s chronickou aj agresívnou formou bola vyhodnotená parodontitída ako generalizovaná forma.

Dotazník, ktorý vyplňali obsahoval otázky ohľadom veku, hmotnosti, výšky, vzdelania, celkových ochorení, fajčenia, rodinnej anamnézy a tiež otázky o ústnej hygiene.

Jednotlivé rizikové faktory a ďalšie parametre (pohlavie, vek, BMI, vzdelanie, rodinná anamnéza, fajčenie, stav ústnej hygieny a systémové ochorenia) boli zhodnotené pomocou deskriptívnych a induktívnych štatistických metód za použitia programu Microsoft Excel a tiež dostupných štatistických tabuliek. Hodnotili sme priemerné hodnoty, smerodajné odchýlky, maximálne a minimálne hodnoty. Vzťah jednotlivých skupín a pohlavia, rodinnej anamnézy a fajčenie sme hodnotili za použitia *chi*-kvadrát

testu a vzťah jednotlivých skupín s vekom a BMI za použitia ANOVA, Tukey HSD testu.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Pohlavie

Do štúdie bolo zapojených 42 mužov a 58 žien. V skupine zdravých jedincov bolo 28 žien a 15 mužov. V skupine s AP bolo viac mužov v porovnaní so ženami a naopak v skupine s CP bolo viac žien ako mužov. Predpokladaná bola hypotéza, že viac mužov trpí chronickou parodontitídou a naopak agresívnou parodontitídou viac žien. Rozdiely pohlaví medzi skupinami v našej štúdii neboli štatisticky významné ($\chi^2 = 3,66$; $p = 0,301$; výsledky nie sú štatisticky významne pri $p < 0,05$).

V niektorých štúdiách bol pozorovaný vyšší výskyt parodontálneho ochorenia u mužov avšak príčina tohto vzťahu nie je úplne jasná, pravdepodobne je to spôsobené horším stupňom ústnej hygieny u mužov (Al-Jehani a kol., 2014; Mack a kol., 2004; Genco, 1996). Čo sa týka agresívnej parodontitídy, štúdie naopak popisujú vyšší výskyt u žien (Cortelli a kol., 2002; Hørmann a kol., 1979; Fátima, Desai, 2016; Meisel a kol., 2008). Na rozdiel od spomínaných štúdií sme dospeli k opačným výsledkom keďže v skupine s CP boli vyššie počty žien a naopak v skupine s AP vyšší počet mužov.

Vek

Nasledujúca tabuľka zobrazuje priemerný vek v jednotlivých skupinách a tiež minimá, maximá a smerodajné odchýlky. Predpokladané boli rozdiely v jednotlivých skupinách s ochorením parodontu s najvyšším vekom v sku-

pine s CP. Rozdiely medzi jednotlivými skupinami boli štatisticky významné pri $p < 0,05$ (f-test = 54,738; $p < 0,001$).

Viacere štúdie popisujú vyššiu prevalenciu a tiež závažnosť parodontálnych ochorení s vyšším vekom, čo môže byť spôsobené zmenami kapacity hojenia buniek a tkanív a tiež vystavením prozápalovým stavom. Aj keď sa stav parodontu v posledných desaťročiach u starších ľudí zlepšil, prevalencia parodontitídy je stále pomerne vysoká (Al-Jehani a kol., 2014; Lopez a kol., 2017). Tadjedin a kol. (2017) v štúdii hodnotenia vzťahu veku a parodontálneho ochorenia dospeli k nasledujúcim výsledkom – častejší výskyt CP vo veku 46–55 (23 %), výskyt AP v skupine 36–45 ročných (33 %) a najvyššia prevalencia gingivitídy v skupine 17–25 ročných (35 %). K podobným výsledkom sme dospeli v našej štúdii s najvyšším priemerným vekom v skupine CP ($\mu = 53,87$), pacienti s AP v nižšom vekovom rozsahu ($\mu = 41,94$) a v skupine s gingivitídou prevažne mladí jedinci ($\mu = 21,95$).

Vzdelanie

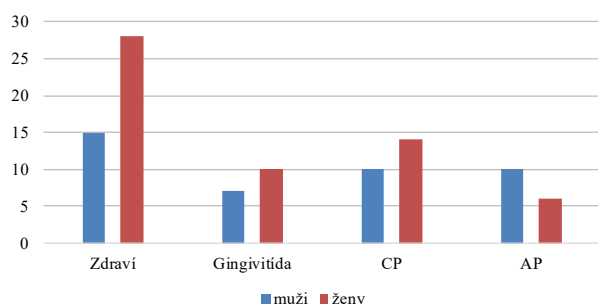
V najvyšších hodnotách bolo vo všetkých skupinách dosiahnuté stredoškolské vzdelanie. Priemerne bolo 85 % respondentov s ukončeným stredoškolským vzdelaním v každej skupine a 14 % s ukončeným vysokoškolským

Tabuľka č. 1: Vek v jednotlivých skupinách

	priemer	min	max	SD
Zdraví	21,95	19	29	2,08
Gingivitída	31,94	19	74	16,83
CP	53,87	31	70	10,30
AP	41,94	24	71	11,88

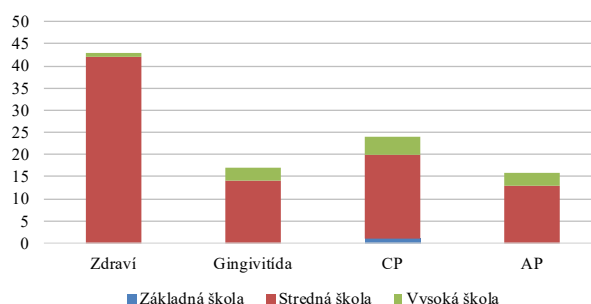
CP – chronická parodontitída, AP – agresívna parodontitída

Pohlavie



Obrázok č. 1: Zastúpenie mužov a žien v jednotlivých skupinách

Ukončené vzdelanie



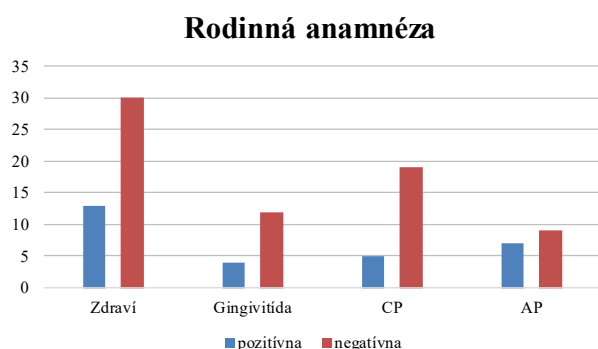
Obrázok č. 2: Ukončené vzdelanie v jednotlivých skupinách

vzdelaním. Medzi skupinami neboli štatisticky významné rozdiely pri $p < 0.05$ ($\chi^2 = 5,960$; $p = 0.114$).

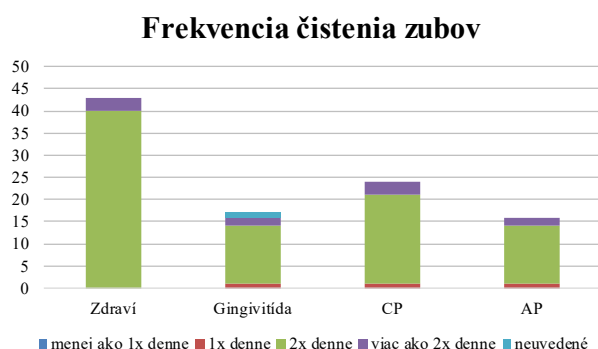
Nižšie dosiahnuté vzdelanie môže zvyšovať riziko parodontálneho ochorenia (Akhiohare, Ojehanon, 2016). Roy a kol. (2019) dospeli k štatisticky významnej asociácii medzi úrovňou vzdelania a zápalovými zmenami tkanív parodontu. Rovnako Boillot a kol. (2011) poukázali na to, že socioekonomický status ovplyvňuje riziko parodontálnych ochorení. V našej štúdii bolo najviac respondentov s dosiahnutým stredoškolským vzdelaním a medzi jednotlivými skupinami s parodontálnym ochorením sme štatisticky významné rozdiely nepozorovali.

Rodinná anamnéza

Predpokladaný bol vyšší počet pacientov s pozitívnou rodinnou anamnézou v skupine pacientov s AP. Vo všetkých skupinách boli vo vyššom počte pacienti s negatívnou rodinnou anamnézou avšak v skupine s AP bol pozorovaný nižší pomer medzi pacientmi s pozitívnou a negatívnou anamnézou. Výsledky neboli štatisticky významné pri $p < 0,05$ ($\chi^2 = 2.605$; $p = 0.457$).



Obrázok č. 3: Rodinná anamnéza v jednotlivých skupinách



Obrázok č. 4: Frekvencia čistenia zubov v jednotlivých skupinách

Medzi rizikové faktory parodontitídy patrí tiež genetická predispozícia (Sherer a kol., 2011). Viaceré štúdie (Zukať a kol., 2016; Monteiro a kol., 2015) poukazujú na častú kladnú odpoveď na otázku výskytu parodontitídy v rodine. V našej štúdii sme nedospeli k štatisticky významným rozdielom medzi skupinami s ochorením parodontu a zdravou skupinou.

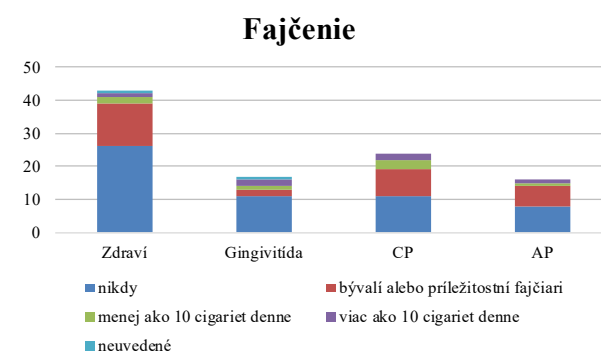
Frekvencia čistenia zubov

Vo všetkých sledovaných skupinách bola najčastejšia odpoveď na otázku frekvencie čistenia zubov 2x denne, v menšej miere viac ako 2x denne. Vo všetkých skupinách s ochorením parodontu sa vyskytli respondenti, ktorí si čistili chrup 1x denne, tieto hodnoty sa však štatisticky vyhodnotiť nedali vzhľadom na nízke počty v jednotlivých skupinách. Rozdiely medzi skupinami neboli štatisticky významné pri $p < 0,05$ (χ^2 -kvadrát $\chi^2 = 0,989$; $p = 0,804$).

Keďže je známe, že mikrobiálny povlak má hlavnú úlohu v patogenéze parodontitídy, dôležitú úlohu preto zohráva pravidelné čistenie zubov (Attin, Hornecke, 2005). Viaceré štúdie poukázali na pozitívny vplyv čistenia zubov na prevalenciu parodontálneho ochorenia. V našej štúdii sme nedospeli k štatisticky významným rozdielom medzi skupinami aj keď vo všetkých skupinách s ochorením parodontu sa vyskytli respondenti s frekvenciou čistenia zubov 1x denne zatiaľ čo v zdravej skupine sa takýto jedinec nevyskytol.

Fajčenie

Najvyššie zastúpenie súčasných alebo bývalých fajčiarov bolo v skupine s CP (54,17 %) a následne v skupine s AP (50 %). V skupine zdravých jedincov bolo 37,2 % aktuálnych alebo bývalých fajčiarov. Zistené rozdiely me-



Obrázok č. 5: Rozsah fajčenia v jednotlivých skupinách

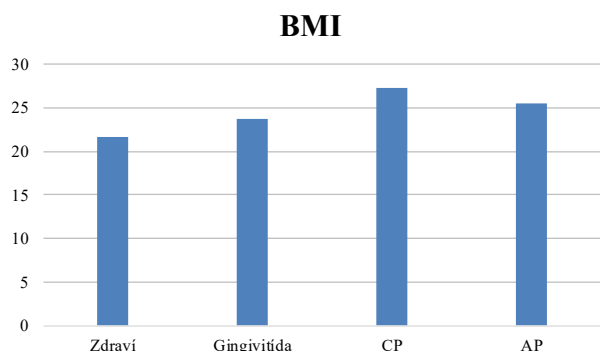
dzi skupinami neboli štatisticky významné pri $p < 0,05$ ($\chi^2 = 6.83$; $p = 0.655$).

Známa je v súčasnosti súvislosť medzi fajčením a výskytom a závažnosťou parodontitídy. Fajčenie urýchľuje deštrukciu parodontálnych tkanív a stratu „attachmentu“ (Gautam a kol., 2011). Vouras a kol. (2009) poukazujú na pozitívnu koreláciu medzi stratou tkaniva (attachmentu) a rozsahom fajčenia. Rovnako ďalšie štúdie (Calsina a kol., 2002; Kedvongbundit, Wikesjö, 2000; Preshaw a kol., 2005) poukázali na negatívny vplyv fajčenia na parodontálne tkanivá. Podobne v našej štúdií najvyšší počet súčasných alebo bývalých fajčiarov bol v skupinách s parodontitídou.

BMI

BMI je index telesnej hmotnosti, v norme sú hodnoty 18,5–24,9; mierna nadváha 25,0–29,9; obezita 30,0–34,9 a extrémna obezita viac ako 35. Najvyššie priemerné hodnoty BMI boli v skupinách s parodontitídou, ktoré zasahovali do miernej nadváhy (CP – $\mu = 27,23$; SD 4,92 a AP – $\mu = 25,47$; SD = 4,27). Zdravá skupina a pacienti s gingivitídou boli v rozmedzí normy (zdraví – $\mu = 21,69$; gingivitída – $\mu = 23,72$). Predpokladaný bol výskyt chronickej parodontitídy u jedincov s obezitou. Rozdiely v jednotlivých skupinách nie sú štatisticky významné pri $p < 0,05$ (f-test = 0,722; $p = 0,540$).

Literatúra popisuje súvislosť medzi nadváhou alebo obezitou so vznikom parodontálneho ochorenia aj keď presný mechanizmus ešte nie je známy (Martinez-Herrera a kol., 2017). Li a kol. (2018) dospeli tiež k záveru, že vyššie BMI má spojitost s rozsiahlejším zápalom parodontu. Podobne v našej štúdií sme pozorovali vyššie hodnoty BMI (mierna nadváha) v skupinách s CP a AP.



Obrázok č. 6: Priemerné hodnoty BMI v jednotlivých skupinách

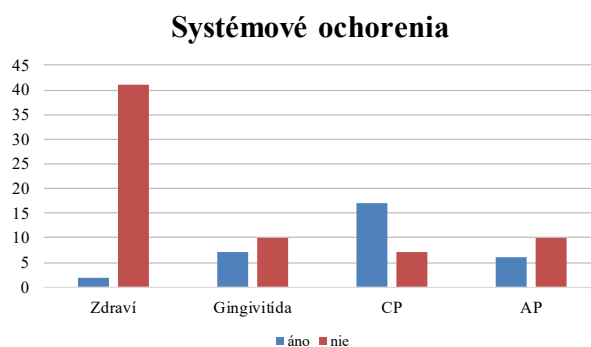
Systémové ochorenia

Na nasledujúcom obrázku č. 7 je znázornený výskyt systémových ochorení v jednotlivých skupinách. V zdravej skupine boli dvaja respondenti s ochorením štítnej žľazy. V skupinách s ochorením parodontu sa vyskytli najčastejšie ochorenia ako hypertenzia, ochorenia štítnej žľazy a diabetes 2. typu zvlášť v skupinách s parodontitídou. Okrem týchto spomenutých sme v skupine s gingivitídou pozorovali výskyt Crohnovej choroby, celiakie, karcinómu prostaty, hypotyreózy a hypertenzie ako je už spomenuté. V skupinách s chronickou a agresívnou parodontitídou to boli okrem diabetu a hypertenzie, alergie, astma, osteoporóza, ochorenia štítnej žľazy, anémia, migréna, epilepsia, psoriatická artritída a reumatologické ochorenia.

Parodontálne patogény v ústnej dutine môžu tiež ovplyvňovať imunitnú odpoveď aj v iných oblastiach a tým zohrávať úlohu v rozvoji systémových ochorení. Rastie množstvo štúdií, ktoré poukazujú na súvislosť medzi parodontitídou a systémovými ochoreniami ako sú kardiovaskulárne ochorenia, diabetes mellitus, Alzheimerova choroba, nádorové zmeny v oblasti tráviaceho traktu a v neposlednom rade nepriaznivý vplyv parodontitídy v období tehotenstva (Bui a kol., 2019).

ZÁVER

Viacere štúdie poukazujú na úlohu rizikových faktorov v patogenéze parodontitídy. Úlohou liečby parodontitídy je zredukovať baktérie a zabrániť ich pôsobeniu na parodontálne tkanivá. Okrem toho je však nutné pred samotnou liečbou získať informácie o celkovom zdravotnom stave pacienta a možných faktoroch, ktoré ovplyvňujú stav



Obrázok č. 7: Výskyt systémových ochorení v jednotlivých skupinách

parodontu a následne informovať pacienta o nutnosti redukcie ovplyvniteľných rizikových faktorov ako nevyhnutnej súčasti liečebného plánu. Poznanie a porozumenie vzťahu parodontitídy a rizikových faktorov môže prispieť k zlepšeniu výsledkov liečby a voliť liečbu individuálne u daného pacienta.

Podakovanie

Práca vznikla s podporou grantu VEGA 1/0559/18.

LITERATÚRA

1. Akhionbare, O., Ojehanon, P. (2016): A study of the effect of frequency of teeth brushing on the prevalence of onflammatory periodontal diseases. *Port Harcourt Medical Journal*, 10(3), 119—123. doi: 10.4103/0795-3038.197750.
2. AlJehani, Y. A. (2014): Risk factors of periodontal disease: review of the literature. *International Journal of Dentistry*, 2014, 182513. <https://doi.org/10.1155/2014/182513> (Retraction published *Int. J. Dent.*, 2021 Feb 12; 2021: 8735071)
3. Attin, T. E. Hornecker, E. (2005): Tooth brushing and Oral Health: How frequently and when should tooth brushing be performed? *Oral Health & Preventive Dentistry*, 3(3), 135—140.
4. Boillot, A., El Halabi, B., Batty, G. D., Rangé, H., Czer-nichow, S., Bouchard, P. (2011): Education as a predictor of chronic periodontitis: a systematic review with meta-analysis population-based studies. *PLoS One*, 6(7), e21508. doi: 10.1371/journal.pone.0021508.
5. Bui, F. Q., Almeida-da-Silva, C. L. C., Huynh, B., et al. (2019): Association between periodontal pathogens and sys-temic disease. *Biomedical Journal*, 42(1), 27—35. doi: 10.1016/j.bj.2018.12.001.
6. Calsina, G., Ramón, J. M., Echeverría, J. J. (2002): Effects of smoking on periodontal tissues. *Journal of Clinical Peri-odontology*, 29(8), 771—776. doi: 10.1034/j.1600-051x.2002.290815.x.
7. Cortelli, J. R., Cortelli, S. C., Pallos, D., et al. (2002): Pre-valência de periodontite agressiva em adolescentes e adultos jovens do Vale do Paraíba [Prevalence of aggressive peri-odontitis in adolescents and young adults from Vale do Paraí-ba]. *Pesquisa Odontologica Brasileira*, 16(2), 163—168. Portu-guese. doi: 10.1590/s1517-74912002000200012.
8. Fatema, R., Desai, V. B. (2016): Prevalence of aggressive periodontitis in patients visiting Ajman University Dental Clinics—radiographic study. *International Dental Journal of Study*, 4(3), 108—110.
9. Gautam, D. K., Jindal, V., Gupta, S. C., et al. (2011): Ef-fect of cigarette smoking on the periodontal health status: A comparative, cross sectional study. *Journal of Indian So-ciety of Periodontology*, 15(4): 383—387. doi: 10.4103/0972-124X.92575.
10. GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators (2017): Global, regional, and national inci-dence, prevalence, and years lived with disability for 328 dis-eases and injuries for 195 countries, 1990—2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet* 390(10100), 1211—1259.
11. Genco, R. J. (1996): Current view of ris factors for peri-odontal diseases. *Journal of Periodontology*, 67(10 Suppl.), 1041—1049. doi: 10.1902/jop.1996.67.10.1041.
12. Hørmann, J., Frondes, A. (1979): Juvenile periodontitis lo-calization of bone loss in relation to age, sex and teeth. *Jour-nal of Clinical Periodontology*, 6(6), 407—416. doi: 10.1111/j.1600-051X.1979.tb01939.x.
13. Jin, L., Lamster, I., Greenspan, J., et al. (2016): Global bur-den of oral diseases: emerging concepts, management and in-terplay with systemic health. *Oral Diseases*, 22(7), 609—619.
14. Kerdvongbundit, V., Wikesjö, U. M. (2000): Effect of smok-ing on periodontal health in molar teeth. *Journal of Periodon-tology*, 71(3), 433—437. doi: 10.1902/jop.2000.71.3.433.
15. Li, L. W., Wong, H. M., McGrath, C. P. (2018): Longitudinal association between obesity and periodontal diseases among secondary school students in Hong Kong: a prospective co-hort study. *BMC Oral Health*, 18, 189. doi: 10.1016/j.jped.s.2017.06.050.
16. López, R., Smith, P. C., Göstemeyer, G., et al. (2017): Age-ing, dental caries and periodontal diseases. *Journal of Clini-cal Periodontology*, 44(Suppl 18), S145—S152. doi: 10.1111/jcpe.12683.
17. Mack, F., Mojon, P., Budtz-Jørgensen, E., et al. (2004): Car-ies and periodontal disease of the elderly in Pomerania, Ger-many: results of the Study of Health in Pomerania. *Gerodon-tology*, 21(1), 27—36. doi: 10.1046/j.1741-2358.2003.00001.x.
18. Martinez-Herrera, M., Silvestre-Rangil, J., Silvestre, F. J. (2017): Association between obesity and periodontal disease. A systematic review of epidemiological studies and controlled clinical trials. *Medicina Oral, Patologia Oral, Cirugia Bucal*, 22(6), e708—e715. doi: 10.4317/medoral.21786.
19. Meisel, P., Reifenberger, J., Haase, R., et al. (2008): Wom-en are periodontally healthier than men, but why don't they

- have more teeth than men? *Menopause*, 15(2), 270—275. doi: 10.1097/gme.0b013e31811ece0a.
20. **Monteiro, Mde F., Casati, M.Z., Taiete, T., et al. (2015):** Periodontal clinical and microbiological characteristics in healthy versus generalized aggressive periodontitis families. *Journal of Clinical Periodontology*, 42(10), 914—921. doi: 10.1111/jcpe.12459.
 21. **Preshaw, P.M., Heasman, L., Stacey, F., et al. (2005):** The effect of quitting smoking on chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 32(8), 869—879. doi: 10.1111/j.1600-051X.2005.00779.x.
 22. **Roy, S.S., Malawat, A., Mitra, D., et al. (2019):** Association between Education level and life style on periodontal health status in adults (35—44): A cross sectional study. *International Journal of Scientific Research*, 8(8), 24—28. doi: 10.36106/ijsr.
 23. **Sanz, M. (2010):** European workshop in periodontal health and cardiovascular disease. *European Heart Journal Supplements*, 12(Suppl B), B2.
 24. **Shearer, D.M., Thomson, W.M., Caspi, A., et al. (2011):** Inter-generational continuity in periodontal health: findings from the Dunedin family history study. *Journal of Clinical Periodontology*, 38(4), 301—309. doi: 10.1111/j.1600-051X.2011.01704.x.
 25. **Tadjoedin, F.M., Sulijaya, B., Kuswandani, S.O., et al. (2017):** The correlation between age and periodontal diseases. *Journal of International Dental and Medical Research*, 10(2), 327—332.
 26. **Van Dyke T.E., Dave, S. (2005):** Risk Factors for Periodontitis. *The Journal of International Academy of Periodontology*, 7(1), 3—7.
 27. **Vouros, I.D., Kalpidis, C.D., Chadjipantelis, T., et al. (2009):** Cigarette smoking associated with advanced periodontal destruction in a Greek sample population of patients with periodontal disease. *Journal of International Academy of Periodontology*, 11(4), 250—257.
 28. **Ziukaite, L., Slot, D.E., Loos, B.G., et al. (2016):** Family history of periodontal disease and prevalence of smoking status among adult periodontitis patients: a cross-sectional study. *International Journal of Dental Hygiene*, 15(4), e28—e34. doi: 10.1111/idh.12224.



Laboratórna Diagnostika, XXVI, 2, 2021: 67–73

STATÍNY A FIBRÁTY V LIEČBE DYSLIPOPROTEINÉMIE U LIEČENÝCH HYPERTONIKOV

STATINS AND FIBRATES IN THE TREATMENT OF DYSLIPOPROTEINEMIA IN PATIENTS WITH TREATED HYPERTENSION

Oravec Stanislav, Potočárová Mária, Kováčová Eva, Bulas Jozef

I. Interná klinika LFUK a UNB Staré Mesto, Bratislava

e-mail: stanislav@yahoo.com
pôvodná práca

SÚHRN

Analýza rizikových faktorov rozvoja aterosklerotického poškodenia ciev u osôb s ochorením kardiovaskulárneho systému patrí k dennej rutine ošetrojúceho lekára, ktorý individuálne nastavuje liečbu s cieľom jej optimalizácie pre konkrétnu rizikovú osobu.

Porucha metabolizmu lipoproteínov, spojená so zvýšenou koncentráciou cholesterolu, triacylglycerolov a aterogénnych lipoproteínových subfrakcií, včítane malých denzných LDL, je indikáciou pre liečbu hypolipidemiakami. Liečba statínmi a fibrátmi účinne dokáže znížiť koncentráciu lipidov a lipoproteínov v krvi, a tým znížiť kardiovaskulárne riziko postihnutých osôb. Hypolipidemiká typu statíny a fibráty – ako dokazujú aj výsledky predkladanej klinickej štúdie – má stále prvé miesto v liečbe degeneratívnych poškodení srdca a ciev. Liečbu statínmi je potrebné indikovať pri hypercholesterolémii prípadne pri kombinovanej hyperlipo-proteinémii a liečbu fibrátmi, včítane odporúčenia zmeny diétného režimu indikujeme pri zvýšenej hladine triacylglycerolov v krvi.

Kľúčové slová: dyslipoproteinémia, artériová hypertenzia, statíny, fibráty, aterogénny lipoproteínový profil, malé denzné LDL, malé HDL

ABSTRACT

Analysis of risk factors for the development of a degenerative atherosclerotic injury of vessels in subjects with cardiovascular diseases, belongs to the daily routine work of physician, who according to the results adjusts a treatment for everyone risk person individually.

An impairment of lipoprotein metabolism characterized by increased concentration of cholesterol, triglycerides, lipoprotein(a) and atherogenic lipoprotein subfractions, including small dense LDLs (sdLDL) in blood, is the indication for treatment with hypolipidemics. Treatment with statins and fibrates is effective in reducing the levels of lipids and lipoproteins in the blood, thereby reducing the risk of people at higher cardiovascular risk.

Treatment with statins and fibrates—according to the results of our clinical study—has till now one of the first places in the treatment of degenerative damages of heart and vessels. Statins for treatment of hypercholesterolemia resp.combined hyperlipidemia, and fibrates together with a dietary recommendations there, where the triglycerides become higher.

Key words dyslipoproteinemia, arterial hypertension, statins, fibrates, atherogenic lipoprotein profile, small dense LDL, small HDL

ÚVOD

Najčastejšie rizikové faktory vzniku srdcovo-cievnych ochorení predstavujú artériová hypertenzia a hyperlipoproteinémia. Oba rizikové faktory sú ovplyvniteľné a cieľom liečby je odstránenie ich negatívneho vplyvu na zdravotný stav postihnutej osoby, resp. zníženie negatívneho vplyvu. Podcenenie nutnosti liečby dyslipoproteinémie a artériovej hypertenzie v neindikovaní liečby terapeutom, nedostatočnom manažmente liečby, ale aj zlej compliance liečby zo strany pacienta (T o t h, 2016), môže mať fatálne dôsledky pre postihnutú osobu (I k e z a k i a kol., 2021). Pri liečbe hyperlipoproteinémie a artériovej hypertenzie je potrebné určiť komplexný liečebný postup, akým je zmena stravovacích návykov, zmena životného štýlu a správny výber farmakologickej liečby. Optimálna hypolipidemická liečba v kombinácii s antihypertenzívnou liečbou účinne znižuje kardiovaskulárne riziko, incidencia náhlych koronárnych a cerebrovaskulárnych príhod a zlepšuje prognózu liečenej a klinicky sledovanej osoby (D u k á t a kol., 2012).

Porucha metabolizmu lipoproteínov, spojená so zvýšenou koncentráciou cholesterolu, triacylglycerolov, lipoproteínu (a), aterogénnych lipoproteínových subfrakcií, včítane malých denzných LDL (mdLDL), je indikáciou pre liečbu hypolipidemikami. Liečba statínmi a fibrátmi účinne dokáže znížiť koncentráciu lipidov a lipoproteínov v krvi, a tým znižovať kardiovaskulárne riziko postihnutých osôb (O r a v e c a kol., 2014; O r a v e c a kol., 2015; D u r a n a kol., 2020).

Liečba hypolipidemikami: statínmi a fibrátmi – ako dokazujú aj výsledky predkladanej klinickej štúdie – má stále prvé miesto v liečbe degeneratívnych aterosklerotických poškodení srdca a ciev (O k o p i e n a kol., 2017; O k o p i e n a kol., 2018).

V našej klinickej štúdii sa liečili hypertonici, u ktorých pretrvávala dyslipoproteinémia hypolipidemikami: statínmi a fibrátmi. Cieľom práce bolo porovnať účinok statínovej liečby a liečby fibrátmi. Všeobecne je známa indikačná oblasť pre liečbu statínmi a fibrátmi pri poruchách metabolizmu lipidov (V a l l e j o - V a z a kol., 2018; M a c h a kol., 2020). V klinickej práci sa viac indikuje liečba statínmi, chápaná často ako univerzálna liečba, hoci hypertriacylglycerolémia by sa mala liečiť skôr fibrátmi. Klinické štúdie hodnotiace benefit liečby fibrátmi u pacientov s izolovanou hypertriacylglycerolémiou, ale aj s kombino-

vanou hyperlipoproteinémiou sú málo zastúpené. Prepojenie metabolizmu triacylglycerolov s tvorbou aterogénnych mdLDL, kde fibráty modulujú tvorbu mdLDL tým, že znižujú koncentráciu triacylglycerolov v krvi, je známou skutočnosťou, na ktorú sa v klinickej praxi, žiaľ, zabúda (W a t t s, C h a n, 2020). Z pochopenia prepojenia metabolizmu sacharidov a lipidov, ako aj patomechanizmov pri tvorbe lipoproteínov bohatých na triacylglyceroly, malých denzných LDL a ďalších aterogénnych subpopulácií lipoproteínov, by mohli profitovať nielen klinici – terapeuti skvalitňovaním svojich liečiteľských schopností, ale predovšetkým pacienti s ochoreniami kardiovaskulárneho systému: diabetici, osoby s nadváhou, pacienti s artériovou hypertenziou a osoby s metabolickým syndrómom. Stalo by sa to vtedy, ak by sa liečba zameraná na znižovanie hladiny sdLDL – silne aterogénnej lipoproteínovej subfrakcie – stala záväzným liečebným postupom pre ošetrovúcich lekárov (O r a v e c a kol., 2019).

Pacienti

Do súboru pacientov s liečenou artériovou hypertenziou a hyperlipoproteinémiou bolo zaradených 300 osôb. Z nich kontrolnú skupinu tvorilo 56 pacientov. Títo boli liečení na artériovú hypertenziu a v čase štúdie boli normotenzní, s priemernými hodnotami krvného tlaku (TK) 125/80 torr a s hodnotami lipidových parametrov v rámci referenčných hodnôt. Kontrolnú skupinu tvorilo 23 mužov vo veku 56 ± 6 rokov a 33 žien vo veku 59 ± 6 rokov.

112 pacientov s preliečenou artériovou hypertenziou a s hyperlipoproteinémiou (HLP) bolo liečených statínmi: 50 mužov vo veku 55 ± 8 rokov a 62 žien vo veku 58 ± 8 rokov. Pri testovaní boli normolipemickí a normotenzní.

70 pacientov s preliečenou artériovou hypertenziou a s kombinovanou HLP bolo liečených fibrátmi: 33 mužov vo veku 53 ± 8 rokov a 37 žien vo veku 56 ± 8 rokov. Pri testovaní pacientov boli normolipemickí a normotenzní.

Ďalšiu skupinu pacientov s liečenou artériovou hypertenziou tvorilo 62 osôb: 22 mužov vo veku 60 ± 8 rokov a 40 žien vo veku 66 ± 8 rokov. U nich sa artériová hypertenzia upravila antihypertenzívnou liečbou na hodnoty TK 127/80 torr. Indikovanú hypolipidemickú liečbu tieto osoby pre vedľajšie nepriaznivé účinky netolerovali, a od hypolipidemickej liečby sa v ďalšom upustilo. V čase testovania boli títo pacienti – 62 osôb – normotenzní, pretrvávala hyperlipoproteinémia a ani dietetické odporúčania neboli na úpravu HLP dostatočne účinné.

Liečba artériovej hypertenzie bola založená na antagónistoch osi renin-angiotenzín-aldosterón (sartany a inhibítory ACE) v kombinácii s antagonistami kalciového kanála (prevažne amlodipín) a v prípade potreby doplnená o in-dapamid.

Pre liečbu hyperlipoproteinémie sa odporúčili statíny a fibráty: atorvastatin 40 mg/deň, alternatíva simvastatin 40 mg/deň, alebo fenofibrát v dávke 160 mg, resp. 215 mg/deň.

Informovaný súhlas s účasťou v klinickej štúdii deklarovali všetky testované osoby.

Štatistické vyhodnotenie sa vykonalo nepárovým študentovým *t*-testom. Za signifikantnosť v rozdieloch porovnávaných parametrov sa deklarovala hodnota $p < 0.05$.

METÓDY ANALÝZY

Celkový cholesterol a triacylglyceroly sa analyzovali enzymatickou CHOD-PAP metódou fa Roche-Diagnostics, FRG. Analýza subpopulácií LDL a HDL sa vykonala elektroforetickou metódou delenia lipoproteínov na polyakrylamidovom géli (PAG): Lipoprint LDL System (H o e f n e r a kol., 2001) a Lipoprint HDL System (M o r a i s a kol., 2003), fa Quantimetrix, Ca, USA.

VÝSLEDKY

Tab. 1. Porovnáva sa koncentrácia sledovaných lipidových a lipoproteínových parametrov medzi skupinou, ktorá sa liečila statínmi a skupinou pacientov s neliečenou HLP. Všetky sledované lipidové a lipoproteínové

parametre v skupine liečených statínmi poklesli oproti hodnotám pacientov s neliečenou HLP vysoko signifikantne ($p < 0.002...p < 0.0001$). Výsledky potvrdzujú vysokú účinnosť liečby statínmi. V liečenej skupine výrazne klesla aj koncentrácia LDL1 – ateroprotektívnej LDL subfrakcie a mierne klesla koncentrácia – ateroprotektívnej HDL.

Tab. 2. V skupine neliečenej HLP liečba fibrátmi znižuje koncentráciu IDL3 ($p < 0.0001$), subpopuláciu LDL1 ($p < 0.001$) a HDL ($p < 0.0001$). Fibráty v našej štúdii nesignifikantne znižujú koncentráciu triacylglycerolov, VLDL, celkového cholesterolu, celkového LDL a mdLDL, čo možno hodnotiť ako slabý hypolipidemický účinok liečby fibrátov v našej štúdii.

Tab. 3. Porovnávajú sa lipidové parametre normolipemickej kontrolnej skupiny s neliečenou skupinou hyperlipoproteinemikov. Koncentrácia ateroprotektívnej LDL1 subpopulácie v skupine neliečených hyperlipoproteinemikov je prekvapivo vysoká a je signifikantne vyššia ($p < 0.0001$), než v kontrolnej normolipemickej skupine. U všetkých sledovaných parametrov zisťujeme signifikantné rozdiely v koncentrácii lipidov a lipoproteínových subpopulácií u hyperlipoproteinemikov a normolipemickej kontroly ($p < 0.01...p < 0.0001$).

Tab. 4. V skupinách testovaných osôb sú uvedené hodnoty sérových lipidov a lipoproteínov pri liečbe statínmi porovnávané s normolipemickou kontrolnou skupinou. Ide o ilustračnú tabuľku, ktorá ukazuje, že liečba statínmi účinne znižuje koncentrácie lipoproteínových parametrov k hodnotám v kontrolnej skupine normolipemikov. Pri LDL1 subpopulácii je pokles koncentrácie ešte výraznejší a koncentrácia LDL1 nižšia ($p < 0.0001$), než v skupine neliečenej normolipemickej kontroly.

Tab. 1. Súbor pacientov po liečbe statínmi (n = 112) v. s. pacienti s neliečenou hyperlipoproteinémiou (n = 62)

VLDL	IDL1	IDL2	IDL3	LDL1	LDL2	mdLDL	HDL	T-chol.	T-LDL	TAG
[mmol/l $\pm$ SD]										
Neliečená HLP, n = 62										
0.91 $\pm$ 0.25	0.74 $\pm$ 0.21	0.44 $\pm$ 0.14	0.59 $\pm$ 0.22	1.42 $\pm$ 0.36	0.84 $\pm$ 0.43	0.17 $\pm$ 0.17	1.42 $\pm$ 0.43	6.53 $\pm$ 0.64	4.20 $\pm$ 0.65	1.84 $\pm$ 1.21
Th-Statíny, n = 112										
0.70 $\pm$ 0.25	0.52 $\pm$ 0.16	0.29 $\pm$ 0.10	0.39 $\pm$ 0.16	1.00 $\pm$ 0.31	0.41 $\pm$ 0.22	0.02 $\pm$ 0.02	1.24 $\pm$ 0.32	4.60 $\pm$ 0.77	2.65 $\pm$ 0.57	1.40 $\pm$ 0.80
HLP v. s. statíny										
$p < 0.0001$							$p < 0.002$	$p < 0.0001$		$p < 0.001$

Tab. 2. Súbor pacientov liečených fibrátmi (n = 70) v.s. pacienti s neliečenou hyperlipoproteinémiou (n = 62)

VLDL	IDL1	IDL2	IDL3	LDL1	LDL2	mdLDL	HDL	T-choL.	T-LDL	TAG
[mmol/l ±SD]										
Neliečená HLP, n = 62										
0.91 ± 0.25	0.74 ± 0.21	0.44 ± 0.14	0.59 ± 0.22	1.42 ± 0.36	0.84 ± 0.43	0.17 ± 0.17	1.42 ± 0.43	6.53 ± 0.64	4.20 ± 0.65	1.84 ± 1.21
Th-Fibráty, n = 70										
0.96 ± 0.33	0.69 ± 0.26	0.41 ± 0.14	0.45 ± 0.15	1.19 ± 0.39	1.00 ± 0.40	0.15 ± 0.15	1.10 ± 0.28	6.13 ± 1.53	4.08 ± 1.23	1.69 ± 0.49
HLP v. s. fibráty										
ns	ns	ns	p < 0.0001	p < 0.00	p < 0.03	ns	p < 0.0001	ns	ns	ns

Tab. 3. Súbor pacientov s normolipémiou – kontrolná skupina (n = 56) v.s. pacienti s neliečenou hyperlipoproteinémiou (n = 62)

VLDL	IDL1	IDL2	IDL3	LDL1	LDL2	mdLDL	HDL	T-Chol.	T-LDL	TAG
[mmol/l ± SD]										
Neliečená HLP, n = 62										
0.91 ± 0.25	0.74 ± 0.21	0.44 ± 0.14	0.59 ± 0.22	1.42 ± 0.36	0.84 ± 0.43	0.17 ± 0.17	1.42 ± 0.43	6.53 ± 0.64	4.20 ± 0.65	1.84 ± 1.21
Kontrola, n = 56										
0.66 ± 0.19	0.55 ± 0.14	0.27 ± 0.08	0.43 ± 0.15	1.20 ± 0.26	0.43 ± 0.27	0.03 ± 0.03	1.21 ± 0.27	4.79 ± 0.50	2.90 ± 0.43	1.27 ± 0.56
HLP v. s. kontrola										
p < 0.0001							p < 0.01	p < 0.0001		p < 0.003

Tab. 4. Súbor pacientov po liečbe statínmi (n = 112) v. s. kontrolná skupina (n = 56)

VLDL	IDL1	IDL2	IDL3	LDL1	LDL2	mdLDL	HDL	T-choL.	T-LDL	TAG
[mmol/l ±SD]										
Th-Statíny, n = 112										
0.70 ± 0.25	0.52 ± 0.16	0.29 ± 0.10	0.39 ± 0.16	1.00 ± 0.31	0.41 ± 0.22	0.02 ± 0.02	1.24 ± 0.32	4.60 ± 0.77	2.65 ± 0.57	1.40 ± 0.80
Kontrola, n = 56										
0.66 ± 0.19	0.55 ± 0.14	0.27 ± 0.08	0.43 ± 0.15	1.20 ± 0.26	0.43 ± 0.27	0.03 ± 0.03	1.21 ± 0.27	4.79 ± 0.50	2.90 ± 0.43	1.27 ± 0.56
Statíny v. s. kontrola										
p < 0.0001								p < 0.01		

Tab. 5. HDL subpopulácie v súbore pacientov liečených statínmi (n = 112) v.s. kontrola (n = 56)

Subpopulácie HDL [mmol/l]	Pacienti liečení statínmi n = 112	Kontrola n = 56	Pacienti liečení statínmi v.s. kontrola
Large HDL	0.45	0.44	n.s.
Intermediate HDL	0.61	0.64	n.s.
Small HDL	0.15	0.15	n.s.

Tab. 6. HDL subpopulácie v súbore neliečenej hyperlipoproteinémie (n = 62) v.s. kontrola (n = 56)

Subpopulácie HDL [mmol/l]	Pacienti – neliečená HLP n = 62	Kontrola n = 56	Pacienti liečení statínmi v.s. kontrola
Large HDL	0.52	0.44	n.s.
Intermediate HDL	0.71	0.64	0,02
Small HDL	0.20	0.15	0,005

Tab. 7. HDL subpopulácie v súbore pacientov liečených statínmi (n = 112) v.s. neliečená hyperlipoproteinémia (n = 62)

Subpopulácie HDL [mmol/l]	Pacienti liečení statínmi n = 112	Pacienti – neliečená HLP n = 62	Pacienti liečení statínmi v.s. neliečená HLP
Large HDL	0,45	0,52	n.s.
Intermediate HDL	0,61	0,71	0,0001
Small HDL	0,15	0,20	0,0001

HDL subpopulácie analyzované systémom Lipoprint HDL

Pri analýze subpopulácií HDL, majú small (malé) HDL najvyššiu koncentráciu 0.20 mmol/l v neliečenej skupine hyperlipoproteinemikov s aterogénnou lipoproteínovou konšteláciou, čo relativizuje ateroprotektívne vlastnosti (Tab.6, Tab.7).

Statíny účinne znižujú koncentráciu small HDL na úroveň small HDL v kontrolnej normolipemickej skupine 0.15 mmol/l ($p < 0.0001$) (Tab. 5, Tab. 6, Tab. 7).

DISKUSIA

Monitorovanie rizikových parametrov ochorení kardiovaskulárneho systému (KVS) u osôb s diagnostikovaným ochorením srdca a ciev (Hoogeteen a kol., 2014) je už rutinnou prácou klinikov, ktorou dokážu optimalizovať a individuálne nastaviť liečbu pacienta. K liečbe hypercholesterolémie a kombinovanej hyperlipoproteinémie sa odporúčajú statíny, k liečbe hypertriacylglycerolémie fibráty. Pri kombinovanej hyperlipoproteinémii sa menej často indikuje liečba fibrátmi, hoci fibráty znižujú

nielen hladinu triacylglycerolov, ale aj koncentráciu mdLDL a čiastočne aj celkového cholesterolu. Pri sledovaní účinnosti hypolipidemickej liečby je optimálne sledovať hladinu celkového cholesterolu, LDL- a HDL-cholesterolu, triacylglycerolov, ale aj aterogénnych lipoproteínov. Predstavuje to nové možnosti posúdenia kardiovaskulárneho rizika pacienta a účinnosť hypolipidemickej liečby. Ide predovšetkým o určovanie koncentrácie malých denzných LDL (mdLDL) a malých HDL častíc (Johnson a kol., 2021; Sampson a kol., 2021; Hirano a kol., 2021).

Liečba statínmi a fibrátmi – ako dokazujú aj výsledky predloženej štúdie – má stále prvotné miesto v liečbe dyslipoproteinémie u pacientov s kardiovaskulárnym ochorením. (Katsiki a kol., 2013; Komýia a kol., 2021; Rosenblit 2019; Mach a kol., 2020). Precizovať ich indikáciu a individuálne upravovať ich dávkovanie, je tým dôležitým benefitom, ktorý lekár pacientovi poskytuje. Monitorovanie hladiny aterogénnych lipoproteínových subpopulácií v krvi pacienta, akými sú malé denzné LDL a malé HDL (Kasko a kol., 2014) poskytuje navyše klinicko presnejšie informácie o tom, ako optimalizovať liečbu a znižovať reziduálne riziko.

Naša klinická štúdia prináša informácie o tom, že cieľená hypolipidemická liečba znižuje koncentráciu celkového cholesterolu a LDL-cholesterolu. Navyše sa zistil pokles koncentrácie HDL v sére, čo nie je optimálnym prínosom statínovej liečby v našej štúdii. Statíny tiež, signifikantne znižujú ($p < 0.0001$) koncentráciu subfrakcie LDL1 (Tab. 1, Tab. 3, Tab. 4). Diskusia ostáva otvorená, či aj zníženie koncentrácie ateroprotektívnej LDL1 navodenej hypolipidemickej liečbou, je pre pacienta terapeutickým benefitom.

Liečba fibrátmi znížila hladinu triacylglycerolov, malých denzných LDL hoci sa očakávalo, že účinok liečby fibrátmi bude u sledovaných pacientov prenikavejší. Čiastočne to možno vysvetliť tým, že naši pacienti neboli diabetici.

U diabetikov sa prepojenie metabolizmu triacylglycerolov a patomechanizmy tvorby malých denzných LDL potvrdilo vo viacerých prácach. To napomáha k správnej interpretácii hypertriacylglycerolémie ako silného rizikového faktora rozvoja ochorenia kardiovaskulárneho systému (fibraty-PPAR receptor agonisti) (T e n e n b a u m, F i s h m a n, 2012; K o m y i a a kol., 2021).

Originálnym sledovaním v našej štúdii je zistenie, že v skupine neliečenej hyperlipoproteínémie je LDL1 subfrakcia výrazne zvýšená (Tab. 1, Tab. 2) a dokonca vyššia než v kontrolnej skupine. V kontexte tvorby ateroprotektívneho lipoproteínového spektra vyššia koncentrácia LDL1 v plazme predstavuje pre pacienta s dyslipoproteínómiou určitý benefit. Ak by sa u novo vyvíjaných hypolipidemík, podarilo odstrániť znižovanie koncentrácie LDL1 u liečených osôb, bol by to pre pacienta prínos liečby. Statíny znižujú koncentráciu mdLDL, čo je pozitívnym prínosom liečby. Pri fibrátoch sa tento optimálny terapeutický účinok na hladinu mdLDL (K a t s i k i a kol., 2013) potvrdil len čiastočne.

V skupine pacientov s neliečenou hyperlipoproteínómiou, sa potvrdila vysoká koncentrácia aterogénnych mdLDL, čo predstavuje negatívny prognostický index v zmysle akcelerácie ochorenia u neliečených hyperlipoproteinemikov (H i r a y a m a, M i i d a, 2012). Pri analýze subpopulácií HDL sa v tejto skupine zistila aj vysoká koncentrácia malých HDL ($p < 0,003$), čo prispieva k poznaniu nie ateroprotektívneho charakteru malých HDL = HDL3 subfrakcie (H i r a n o, 2016; K a s k o a kol., 2018).

LITERATÚRA

1. **Dukat, A., et al. (2012):** Size of low-density lipoprotein particles in patients after stroke. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*, 122 (Suppl 1): 30—31. doi: 10.20452/pamw.1491.
2. **Duran, E. K., et al. (2020):** Triglyceride-Rich Lipoprotein Cholesterol, Small Dense LDL, and Incident Cardiovascular Disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 5, 75(17), 2122—2135. doi: 10.1016/j.jacc.2020.02.059.
3. **Hirano, T. (2016):** Small dense LDL, HDL 2,3. *The Japanese Journal of Clinical Pathology*, 64(6), 636—642.
4. **Hirano, T., et al. (2021):** Metabolic Properties of Low-density Lipoprotein (LDL) Triglycerides in Patients with Type 2 Diabetes, Comparison with Small Dense LDL-Cholesterol. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. doi: 10.5551/jat.62789.
5. **Hirayama, S., Miida, T. (2012):** Small dense LDL: An emerging risk factor for cardiovascular disease. *Clinica Chimica Acta*, 414: 215—224. doi: 10.1016/j.cca.2012.09.010.
6. **Hoefner D. M., et al. (2001):** Development of a rapide quantitative method for LDL subfractions with use of the Quantimetrix Lipoprint LDL System. *Clinical Chemistry*, 472: 266—274. doi: 10.1093/clinchem/47.2.266.
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. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 34: 1069—1077. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.303284.
8. **Ikezaki, H., et al. (2021):** Small Dense Low-Density Lipoprotein Cholesterol is the most Atherogenic Lipoprotein Parameter in the Prospective Framingham Offspring Study. *Journal of the American Heart Association*, 10(5), e019140. doi: 10.1161/jaha.120.019140.
9. **Johannesen, C. D. L., et al. (2021):** Apolipoprotein B and Non-HDL Cholesterol Better Reflect Residual Risk Than LDL Cholesterol in Statin-Treated Patients. *Journal of American College of Cardiology*, 2021, 77(11), 1439—1450.
10. **Kasko, M., et al. (2014):** High density lipoprotein profile in newly-diagnosed lower extremity artery disease in Slovak population without *diabetes mellitus*. *Neuroendocrinology Letters*, 35(6): 531—537.
11. **Kasko, M., Kasko, V., Oravec, S. (2018):** Would Janus' view on HDL be useful? *Bratislava Medical Journal*, 119(4): 245—248. doi: 10.4149/BLL_2018_046.
12. **Katsiki, N. (2013):** The Role of Fibrate Treatment in Dyslipidemia: An Overview. *Current Pharmaceutical Design*, 19(17): 3124—31. doi: 10.2174/1381612811319170020.
13. **Komyia, I. (2021):** Pemafibrate decreases small, dense LDL, but increases LDL-C depending on baseline triglycerides and LDL-C in type 2 diabetes patients with hypertriglyceridemia: An observation study. *Lipids in Health and Disease*, 20(1). doi: 10.1186/s12944-021-01434-8.
14. **Mach, F., Baigent, C., Catapano, A. L., et al., ESC Scientific Document Group (2020):** 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur. Heart J.*, 41(1): 111—188. doi: 10.1093/eurheartj/ehz 455.
15. **Morais, J., Neyer, G., Muniz, N. (2003):** Measurement and Distribution of HDL subclasses with the new Lipoprint HDL. Method. *Abstract of the 55th Annual Meeting of the AACC*, Philadelphia, Pennsylvania, USA, July 20—24, 2003.
16. **Okopien, B., et al. (2017):** Fibrates in the management of

- atherogenic dyslipidemi Expert Review. *Cardiovascular Therapy*, 15(12), 913—921. doi: 10.1080/14779072.2017.1408410.
17. **Okopien B., et al. (2018):** Benefits and risks of the treatment with fibrates—a comprehensive summary. *Expert Rev. Clinical Pharmacology*, 11(11): 1099—1112. doi: 10.1080/17512433.2018.1537780.
 18. **Oravec, S., et al. (2014):** Atherogenic versus non-atherogenic lipoprotein profiles in healthy individuals. Is there a need to change an approach to diagnosing dyslipidemia? *Current Medical Chemistry*, 21: 2892—2901. doi: 10.2174/0929867321666140303153048.
 19. **Oravec, S., et al. (2015):** The Assessment of the Atherogenic Lipoprotein profile in Cardiovascular Diseases by Lipoprint System Analysis. In *Lipoproteins—from Bench to Bedside*, edited by Gerhard Kostner and Indumathi Chennamesetty, InTech, 87-11121. doi: 10.5772/60989.
 20. **Oravec, S., et al. (2019):** Small dense LDL—an important part of the lipoprotein profile in individuals with impaired metabolism of lipoproteins. Comparison of two analytical procedures. *Neuroendocrinology Letters*, 40(4): 195—198.
 21. **Oravec, S., et al. (2020):** Malé denzné LDL u osôb s poruchou metabolizmu lipoproteínov. *Laboratórna Diagnostika*, 25(2) pp. 43—46.
 22. **Rosenblit, P. D. (2019):** Lowering Targeted Atherogenic Lipoprotein Cholesterol Goals for Patients at Extreme ASCVD Risk. *Current Diabetic Rep.*, 21: 19(12): 146. doi: 10.1007/s11892-019-1246-y.
 23. **Sampson, M., et al. (2021):** A New Equation Based on the Standard Lipid Panel for Calculating small Dense Low-Density Lipoprotein-Cholesterol and Its Use as a Risk-Enhancer Test. *Clinical Chemistry*, 67:(7), 987—997. doi: 10.1093/clinchem/048.
 24. **Tenenbaum, A., Fishman, E. Z. (2012):** Fibrates are an essential part of modern anti-dyslipidemic arsenal: spotlight on atherogenic dyslipidemia and residual risk reduction. *Cardiovasc. Diabetol.*, 2012: 11:125. doi: 10.1186/1475-2840-11-125.
 25. **Toth, P. P. (2016):** Triglyceride-rich lipoproteins as a causal factor for cardiovascular disease. *Vascular Health and Risk Management*, 12: 171—83. doi: 10.2147/VHRM.S104369.
 26. **Vallejo-Vaz, A. J. (2018):** Triglyceride-Rich Lipoprotein Cholesterol and Risk of Cardiovascular Events Among Patients Receiving Statin Therapy in the TNT Trial. *Circulation*, 2018, 21:138(8), 770—781. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.032318.
 27. **Watts, G. F. Chan, D. C. (2020):** Atherogenic Dyslipoproteinemia and Management of ASCVD: Will New Indices Untie the Gordon Knot? *J. American College of Cardiology*, 75(17), 2136—2139. doi: 10.1016/j.jacc.2020.03.032.



Laboratórna Diagnostika, XXVI, 2, 2021: 74–82

POROVNANIE POINT-OF-CARE ANALYZÁTORA S KONVENČNÝMI LABORATÓRNÝMI METÓDAMI PRE STANOVENIE LIPIDOV

COMPARISON OF A POINT-OF-CARE ANALYZER WITH CLINICAL DIAGNOSTIC LABORATORY METHODS FOR THE DETERMINATION OF LIPIDS

Schwarzová Marianna, Fatrcová-Šramková Katarína

Ústav výživy a genomiky, Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

marianna.schwarzova@uniag.sk
pôvodná práca

SÚHRN

Testovacie zariadenia point-of-care (POC) sa používajú na skrining dyslipidémie a na monitorovanie hladín lipidov u pacientov. Cieľom pilotnej štúdie bolo vyšetriť základné lipidové parametre POC analyzátorom Cholestech LDX a porovnať so štandardnými diagnostickými laboratórnymi metódami (CDLM). U 118 jedincov boli zmerané hladiny celkového cholesterolu (TC), triacylglycerolov (TG), HDL cholesterolu (HDL-C) a LDL cholesterolu (LDL-C). Zmerané koncentrácie sledovaných lipidov kazetovými testami POC zaradené do nízkeho, stredného a vysokého rozsahu boli v súlade s hodnotami získanými pomocou CLDM, s výnimkou stredného rozsahu, kde hladiny TC a LDL-C boli podhodnotené ($p < 0,01$). Všetky parametre základného lipidového panelu merané analyzátorom POC významne korelovali s CDLM ($p < 0,001$).

Analyzátor Cholestech LDX pre POC testovanie je nástroj s primeraným analytickým výkonom a veľmi dobrou koreláciou. Poskytol spoľahlivú alternatívu ku konvenčným laboratórnym metódam pre skrining rizikových faktorov chronických chorôb u náhodne vybraných jedincov bez klinickej manifestácie symptómov kardiovaskulárnych chorôb.

Kľúčové slová: lipidy; point-of-care testovanie; skrining; Cholestech LDX

Abstract

Point-of-care (POC) testing devices can be used to screen for dyslipidemia and to monitor lipid levels of patients. The aim of our study was assessment of basic lipid parameters used the Cholestech LDX analyzer and compared to clinical diagnostic laboratory methods (CDLM). In 118 individuals total cholesterol (TC), triglycerides (TG), HDL cholesterol (HDL-C) and LDL cholesterol (LDL-C) levels were measured. Data were evaluated for conformance with National Cholesterol Education Program (NCEP) guidelines. Results were grouped into low, middle and high ranges and were similar to those obtained by CLDM, except in the middle range where TC and LDL-C levels were underestimated by Cholestech LDX ($p < 0.01$). All analytes measured by POC analyzer correlated significantly with CDLM ($p < 0.001$).

The Cholestech LDX analyzer for POC testing is a tool with adequate analytical performance and very good correlation. It provided a reliable alternative to conventional laboratory methods for screening for chronic disease risk factors in randomly selected individuals

without clinically manifest symptoms of cardiovascular diseases.

Key words: Point-of-care testing; lipids; health screening; Cholestech LDX

ÚVOD

Testovanie rizikových faktorov kardiovaskulárnych chorôb (CVD) pomocou point-of-care (POC) zariadení sa v posledných rokoch výrazne rozšírilo (Cheng a kol., 2020). Na meranie hladín lipidov sa v určitých špecifických prípadoch/podmienkach/potrebách často používajú testovacie zariadenia označované ako POC – point-of-care (v mieste starostlivosti o pacienta). Účelom využívania testov typu point-of-care je prioritne rýchle analyzovanie odobratej vzorky biologickej tekutiny, pohotové poskytnutie výsledkov v porovnaní s citlivými diagnostickými metódami realizovanými v laboratóriách, ktoré sú nepochybne presnejšie, avšak časovo náročnejšie (Shemesh a kol., 2006). V súčasnosti je k dispozícii viacero POC analyzátorov na nepriame testovanie základných lipidov. Pre pacientov sú výhodné z dôvodu minimalizácie invazívnosti odberu biologického materiálu, postačuje malé množstvo vzorky, zvyčajne < 50 µl kapilárnej krvi z prsta, čo zvyšuje komfort pacienta. Benefitom je skutočnosť, že poskytujú výsledky rýchlo, takmer okamžite na mieste prvého kontaktu, ktoré je pre pacienta ľahko dostupné (O'Donnell a kol., 2011) a ošetrojúcemu lekárovi umožňuje promptne stanoviť diagnózu, zistiť výsledok monitorovania indikovanej liečby, zrýchliť rozhodovací proces (Panza a kol., 2005). Aj keď sú pohodlie pacientov, komfortná obsluha pre zdravotníkov, rýchlosť pri získavaní výsledkov nepochybne výhodné, dostupné analyzátory POC sa neodporúča využívať ako náhradu za priame citlivé diagnostické metódy pre stanovenie lipidov realizované na automatických analyzátoroch v laboratóriách (Dale a kol., 2008). Je dôležité, aby zariadenia POC používané na účely skríningu a monitorovania základných ukazovateľov lipidového metabolizmu poskytovali presné a spoľahlivé výsledky.

Cholestech LDX (Cholestech Co., Hayward, CA, USA) je malé, ľahké stolné zariadenie typu POC, ktoré využíva pre stanovenie vybraných parametrov lipidového profilu 6 typov jednorazových kaziet s možnosťou stanovenia viacerých parametrov z jednej vzorky: Lipid profile•GLU; Lipid

profile (TC, HDL-C, TG); TC•HDL-C•GLU; TC•HDL-C; TC•GLU; TC. Analyzátor stanoví na základe zvolenej kazety celkový cholesterol (TC), triacylglyceroly (TG), HDL cholesterol (HDL-C) a automaticky vypočítava LDL cholesterol (LDL-C) z malého množstva (približne 40 µl) krvi (kapilárnej alebo žilovej) v priebehu niekoľkých minút. Odobratá vzorka krvi sa aplikuje do kazety, inicializuje sa enzymatická reakcia, ktorá spôsobí zmenu farby. Zmena intenzity farby sa meria pomocou odrazovej fotometrie a koncentrácia mera- ných parametrov sa zobrazí na displeji.

Cieľom štúdie bolo vyšetriť point-of-care testovaním základné parametre lipidového metabolizmu u náhodne vybranej skupiny jedincov bez manifestácie kardiovaskulárnych chorôb a porovnať s priamymi štandardnými diagnostickými laboratórnymi metódami, súčasne posúdiť presnosť a spoľahlivosť POC analyzátoru Cholestech LDX.

MATERIÁL A METÓDY

Participanti

Do súboru bolo náhodným výberom zaradených 118 dospelých osôb – žien bez známeho kardiovaskulárneho rizika (hypertenzia, obezita – BMI > 35 kg.m⁻², fajčenie, nedostatočná telesná aktivita, nedostatočná konzumácia ovocia a zeleniny, nadmerná konzumácia alkoholu a iné), príznakov hypercholesterolémie, manifestácie kardiovaskulárnych chorôb. Priemerný vek skúmaného súboru žien bol 35,4 ± 9,5 rokov. Všetky probandky poskytli informovaný súhlas s účasťou v štúdiu.

Design štúdie

Každej účastníčke bola ráno po 12-hodinovom lačnení odobratá venózna krv do zbernej skúmavky bez antikoagulantov na analýzu sledovaných parametrov štandardnými laboratórnymi diagnostickými metódami. Druhá vzorka žilovej krvi bola odobratá do lítium-heparínovej zbernej skúmavky a použitá na meranie lipidov POC analyzátorom Cholestech LDX.

Point-of-care analýzy lipidov

Vzorky krvi boli testované analyzátorom Cholestech LDX (Cholestech Co., Hayward, CA, USA). Kazety Cholestech LDX pre lipidový profil (TC, TG, HDL-C, LDL-C) boli skladované pri 4 °C podľa pokynov výrobcu, pred použitím boli ponechané 10 minút pri izbovej teplote, následne sa

na kazetu aplikovala vzorka krvi a výsledky boli k dispozícii do 10 minút.

Systém Cholestech LDX® kombinuje enzýmovo iniciované chemické reakcie na stanovenie lipidov a reflexnú fotometriu. Celkový cholesterol sa meria enzýmovo pomocou cholesterolesterázy, cholesteroxidázy, peroxidázy a indikátora pomocou sodnej soli N-etyl-N-sulfohydroxypropyl-m-toluidínu (TOOS). Triacylglyceroly sa tiež merajú enzýmovo pomocou glycerolkinázy, glycerolfosfát oxidázy. HDL-C sa izoluje z lipoproteínov po ich vyzrážaní dextrán-sulfátom a octanom horečnatým. Filtrát obsahujúci HDL-C sa potom nasmeruje na HDL-C reakčnú podložku, kde sa cholesterol v tejto frakcii meria enzýmovo ako v prípade celkového cholesterolu. Analyzátor automaticky vypočíta hodnoty LDL-C (Friedewald a kol., 1972).

Analýza lipidov štandardnými diagnostickými laboratórnymi metódami

Základné parametre lipidového profilu TC, TG a HDL-C boli analyzované enzymatickými, kolorimetrickými metódami použitím komerčných súprav Randox (Randox Laboratories, Crumlin, UK) na klinickom automatickom analyzátoe Biolis 24i Premium (Tokyo Boeki Machinery, Tokio, Japonsko). Výpočet hodnôt LDL-C bol založený na Friedewaldovej rovnici (Friedewald a kol., 1972). Takto získané hodnoty boli označené ako CDLM (Clinical Diagnostic Laboratory Methods).

Analýza údajov (dát)

Výsledky CDLM boli zoradené vzostupne a rozdelené do troch úrovní, ktoré označovali klinicky nízky, stredný a vysoký rozsah. Výsledky Cholestech LDX pre každý subjekt boli priradené k výsledkom CDLM a k rovnakému rozsahu CDLM na porovnanie. Odporúčania NCEP panelu III pre liečbu dospelých boli použité ako hraničné hodnoty na definovanie metabolických abnormalít. Rozmedzia pre TC boli nasledovné: nízke $\leq 5,0$ mmol.l⁻¹; stredné 5,1–7,5 mmol.l⁻¹; vysoké $\geq 7,6$ mmol.l⁻¹. Pre TG boli rozmedzia: nízke $\leq 1,5$ mmol.l⁻¹; stredné 1,5–4,4 mmol.l⁻¹ a vysoké $\geq 4,5$ mmol.l⁻¹. Rozsahy HDL-C boli kategorizované nasledovne: menej ako 1,2 alebo viac ako 1,2 mmol.l⁻¹. Pre LDL-C boli stanovené rozsahy: nízky $\leq 3,0$ mmol.l⁻¹; stredný 3,1–5,0 mmol.l⁻¹ a vysoký $\geq 5,1$ mmol.l⁻¹. Štandardné diagnostické laboratórne metódy merali lipidy v celom rozsahu hodnôt. Prístroj Cholestech LDX registroval výsledky v nasledujúcich merateľných rozsahoch:

TC 2,59–12,93 mmol.l⁻¹; TG 0,51–7,34 mmol.l⁻¹ a HDL-C 0,39–2,59 mmol.l⁻¹. Hodnoty LDL-C bolo možné vypočítať len za podmienky, ak boli výsledky TC, TG a HDL-C v rámci merateľného rozsahu. V dôsledku toho boli tie výsledky, ktoré sa nachádzali nad alebo pod merateľnými rozsahmi, vylúčené zo štatistickej analýzy, ktorá bola vykonaná na kompletných súboroch výsledkov každého jednotlivca.

Pozitívna alebo negatívna odchýlka bola vyjadrená v mmol.l⁻¹ a v %, bola vypočítaná ako rozdiel medzi hodnotou Cholestech LDX a hodnotou CDLM. Aj keď neexistujú žiadne špecifické kritériá pre prijateľný výkon analyzátorov POC, American Heart Association odporúča, aby sa riadili pokynmi Národného vzdelávacieho programu o cholesterole (NCEP ATP III – National Cholesterol Education Program, Adult Treatment Panel III) (NCEP ATP III, 2001). Odporúčania NCEP na presnosť testovania lipidov, uvedené ako celková chyba, sú: $\leq 8,9$ % pre TC, $\leq 15,0$ % pre TG; $\leq 22,0$ % pre HDL-C; $\leq 12,0$ % pre LDL-C, ktoré sú v súlade s variačným koeficientom CV $\leq 3,0$ % pre TC; $\leq 5,0$ % pre TG; $\leq 6,0$ % pre HDL-C a $\leq 4,0$ % pre LDL-C (NCEP, 1995).

Hodnoty v dvoch klinických medzných bodoch NCEP boli pre všetky analyty vypočítané pomocou regresnej rovnice pre každú z metód ($Y = A + B * X$) a odchýlka v týchto bodoch bola vyjadrená ako %. Klinické medzné body NCEP reprezentujú hodnoty lipidových analytov, pri ktorých sa začína zvyšovať riziko kardiovaskulárnych chorôb, pri výpočte boli použité nasledovné: TC 5,18 a 6,22 mmol.l⁻¹; TG 1,69 a 2,26 mmol.l⁻¹; HDL-C 1,03 a 1,55 mmol.l⁻¹; LDL-C 3,36 a 4,13 mmol.l⁻¹ (NCEP ATP III, 2001).

Štatistická analýza

Výsledky sú vyjadrené ako priemer $\pm$ SEM, prípadne priemer $\pm$ SD. Porovnanie výsledkov v dolnom, strednom a hornom klinickom rozsahu jednotlivo, ako aj v celej skupine, bolo realizované za použitia párového t-testu. Hodnota $p < 0,05$ bola považovaná za signifikantnú. Hodnoty Cholestech LDX boli porovnané s hodnotami CDLM pomocou lineárnej regresnej analýzy a výpočtov korelačných koeficientov. Hodnoty Cholestech LDX nachádzajúce sa v jednotlivých rozsahoch, boli označené ako „INSide“ (t.j. v rozsahu), hodnoty mimo rozsahu ako „OUTside“ (t.j. mimo rozsahu). Analýza distribúcie údajov bola vykonaná testom dobrej zhody χ^2 -kvadrát. Rovnako bol súbor testovaný aj z hľadiska normálnosti distribúcie dát Kolmogorovým-Smirnovým testom použitím softvéru STATISTICA Cz 10 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

VÝSLEDKY

Hodnoty TC, TG, HDL-C a LDL-C mali normálnu distribúciu. Priemerné hodnoty $\pm$ SEM pre jednotlivé rozsahy a celý súbor sú uvedené v Tab. 1. V porovnaní s CDLM boli koncentrácie TC merané analyzátorom Cholestech LDX znížené v dolnom a strednom rozsahu, vo vysokom rozsahu neboli namerané žiadne hodnoty. Hodnoty celkového cholesterolu Cholestech LDX boli v dolnom rozsahu znížené o 0,11 mmol.l⁻¹ ($p < 0,05$), v strednom rozsahu bol pokles o 0,25 mmol.l⁻¹ ($p < 0,01$).

Hladiny TG merané POC analyzátorom v nízkom a strednom rozsahu sa významne nelíšili od hladín CDLM, vo vysokom rozsahu neboli zaregistrované žiadne hodnoty. Analyzátor Cholestech LDX nameral podobné hladiny ako CDLM v dolnom rozsahu, zatiaľ čo v strednom rozsahu boli hladiny TG Cholestech LDX o 0,07 mmol.l⁻¹ vyššie v porovnaní s CDLM.

V nízkom rozsahu bola koncentrácia HDL-C meraná Cholestechom LDX vyššia o 0,12 mmol.l⁻¹ ($p < 0,001$). Cholestech LDX zaznamenal vo vysokom rozsahu o 0,23 mmol.l⁻¹ vyššie hodnoty ako CDLM ($p < 0,001$).

Hladiny LDL-C zistené pomocou Cholestech LDX boli vyššie ako hodnoty CDLM v dolnom rozsahu, naopak v strednom rozsahu boli hladiny LDL-C nižšie ako v prípade CDLM, vo vysokom rozsahu neboli zaregistrované hodnoty pri žiadnej metóde. Hodnota LDL-C Cholestech LDX bola v dolnom pásme zvýšená o 0,30 mmol.l⁻¹ ($p < 0,001$). Hodnoty stredného rozsahu boli o 0,42 mmol.l⁻¹ nižšie pre Cholestech LDX ($p < 0,01$).

Porovnanie hodnôt v celom súbore poukázalo na to, že koncentrácie TC merané Cholestechom LDX boli významne nižšie ako koncentrácie CDLM o 0,16 mmol.l⁻¹ ($p < 0,001$). Hladina TG pri Cholestechu LDX bola prakticky rovnaká ako pri CDLM. V hladinách HDL-C sme pomocou Cholestechu LDX zistili nadhodnotenie o 0,20 mmol.l⁻¹ ($p < 0,001$). Nevýznamné rozdiely sme zaregistrovali pri hodnotách

Tab. 1. Porovnanie koncentrácie lipidov meraných analyzátorom POC (point-of-care) a CDLM (Clinical Diagnostic Laboratory Methods)

	Klinický rozsah hodnôt			Celý súbor
	nízke	stredné	vysoké	
Celkový cholesterol [mmol.l ⁻¹]	$\leq 5,0$ (n = 77)	5,1–7,5 (n = 41)	$\geq 7,5$ (n = 0)	2,85–7,40 (n = 118)
Cholestech LDX	4,14 $\pm$ 0,08	5,36 $\pm$ 0,14	–	4,56 $\pm$ 0,09
CDLM	4,25 $\pm$ 0,06	5,62 $\pm$ 0,09	–	4,72 $\pm$ 0,08
	p < 0,05	p < 0,01	–	p < 0,001
Triacylglyceroly [mmol.l ⁻¹]	$\leq 1,5$ (n = 95)	1,6–4,4 (n = 12)	$\geq 4,5$ (n = 0)	0,45–3,25 (n = 107)
Cholestech LDX	0,92 $\pm$ 0,03	1,87 $\pm$ 0,15	–	1,03 $\pm$ 0,04
CDLM	0,91 $\pm$ 0,02	1,80 $\pm$ 0,05	–	1,01 $\pm$ 0,03
	p $\geq$ 0,05	p $\geq$ 0,05	–	p $\geq$ 0,05
HDL cholesterol [mmol.l ⁻¹]	$\leq 1,2$ (n = 37)	–	$> 1,2$ (n = 81)	0,71–2,58 (n = 118)
Cholestech LDX	1,18 $\pm$ 0,03	–	1,81 $\pm$ 0,04	1,62 $\pm$ 0,04
CDLM	1,06 $\pm$ 0,02	–	1,58 $\pm$ 0,03	1,42 $\pm$ 0,03
	p < 0,001	–	p < 0,001	p < 0,001
LDL cholesterol [mmol.l ⁻¹]	$\leq 3,0$ (n = 77)	3,1–5,0 (n = 29)	$\geq 5,1$ (n = 0)	0,73–4,41 (n = 106)
Cholestech LDX	2,32 $\pm$ 0,08	3,11 $\pm$ 0,11	–	2,53 $\pm$ 0,07
CDLM	2,02 $\pm$ 0,07	3,53 $\pm$ 0,06	–	2,43 $\pm$ 0,08
	p < 0,001	p < 0,01	–	p $\geq$ 0,05

Hodnoty vyjadrené ako priemer $\pm$ SEM

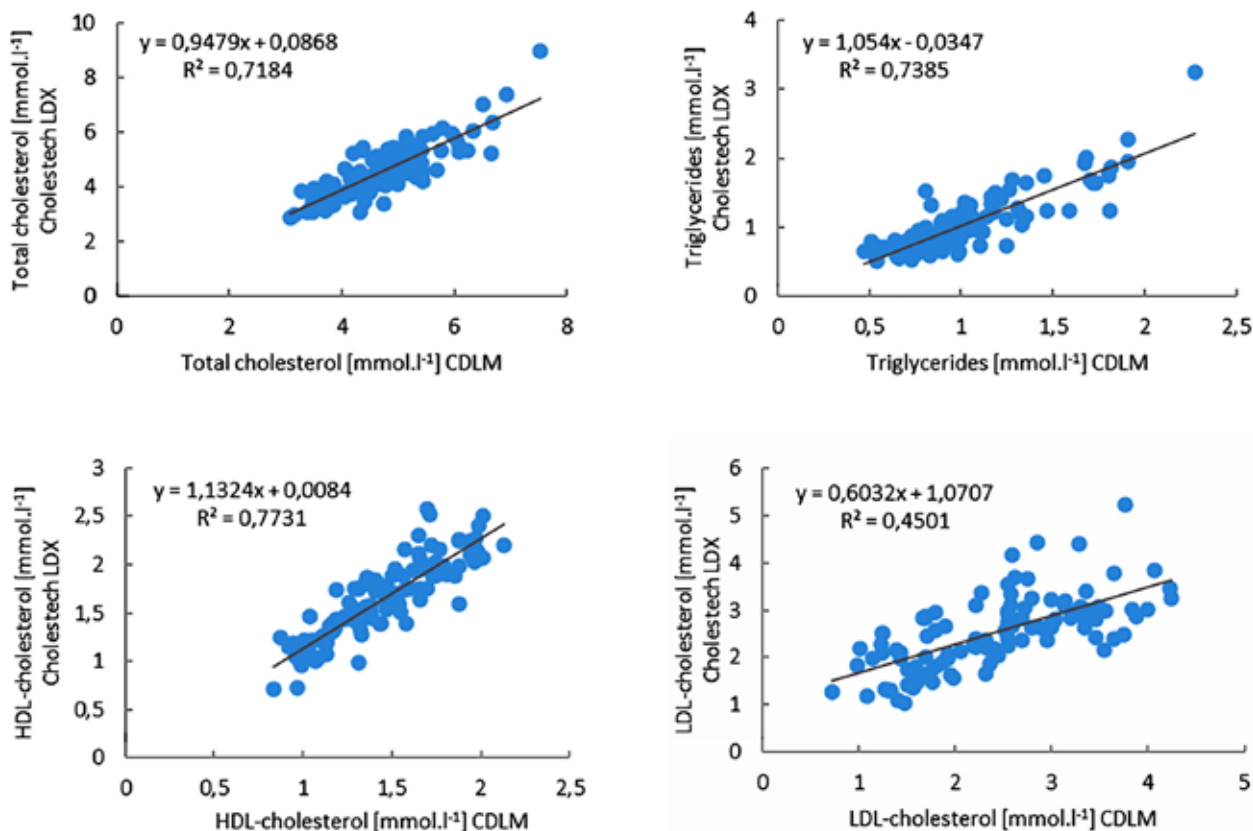
Tab. 2. Distribúcia hodnôt lipidových analytov v rámci klinického rozsahu (n = 118) (v rozsahu – hodnoty z Cholestechu LDX sú v rovnakej kategórii ako hodnoty z CLDM; mimo rozsah – hodnoty z Cholestechu LDX sú nadhodnotené/podhodnotené v porovnaní s hodnotami z CLDM)

	Klinický rozsah hodnôt			Chí-kvadrát
	nízke	stredné	vysoké	
Celkový cholesterol [mmol.l ⁻¹]	≤ 5,0 (n = 77)	5,1–7,5 (n = 41)	≥ 7,6 (n = 0)	
hodnoty v rozsahu	68 (88,3 %)	27 (65,9 %)	–	8,599
hodnoty mimo rozsahu	9 (11,7 %)	14 (34,1 %)	–	p < 0,01
Triacylglyceroly [mmol.l ⁻¹]	≤ 1,5 (n = 95)	1,6–4,4 (n = 12)	≥ 4,5 (n = 0)	
hodnoty v rozsahu	90 (94,7 %)	10 (83,3 %)	–	2,266
hodnoty mimo rozsahu	5 (5,3 %)	2 (16,7 %)	–	p ≥ 0,05
HDL cholesterol [mmol.l ⁻¹]	≤ 1,2 (n = 37)	–	> 1,2 (n = 81)	
hodnoty v rozsahu	21 (56,8 %)	–	80 (98,8 %)	36,348
hodnoty mimo rozsahu	16 (43,2 %)	–	1 (1,2 %)	p < 0,001
LDL cholesterol [mmol.l ⁻¹]	≤ 3,0 (n = 77)	3,1–5,0 (n = 29)	≥ 5,1 (n = 0)	
hodnoty v rozsahu	65 (84,4 %)	9 (31,0 %)	–	28,484
hodnoty mimo rozsahu	12 (15,6 %)	20 (69,0 %)	–	p < 0,001

Výsledky sú vyjadrené v poradí: počet (n), percento [%]

Tab. 3. Presnosť POC analyzátoru Cholestech LDX v porovnaní s CLDM

Parameter	Korelačný		Priemerná odchýlka		Odchýlka NCEP	
	koeficient (r)		[mmol.l ⁻¹]	[%]	cut-off points [%]	
Celkový cholesterol	0,8476	p < 0,001	–0,16	–3,24	–3,53	–3,81
Triacylglyceroly	0,8594	p < 0,001	0,02	2,39	3,35	3,86
HDL cholesterol	0,8790	p < 0,001	0,20	13,75	14,06	13,78
LDL cholesterol	0,6709	p < 0,001	0,11	10,93	–7,81	–13,75



Obr. 1. Lineárna regresia pre lipidy merané POC analyzátorom Cholestech LDX v porovnaní s CDLM

LDL-C, hodnoty z Cholestechu LDX boli o $0,11 \text{ mmol.l}^{-1}$ vyššie ($p \geq 0,05$).

Niektoré hodnoty TC, TG, HDL-C a LDL-C namerané Cholestechom LDX sa líšili od výsledkov CDLM v rámci určených rozsahov. Väčšinu rozdielov sme zistili pri krajných hodnotách nízkeho rozsahu.

Frekvenčnou analýzou sme vyhodnotili presnosť hodnôt lipidov z Cholestechu LDX, teda distribúciu koncentrácií v medzných rozsahoch a ich súlad s hodnotami poskytnutými štandardnými laboratórnymi diagnostickými metódami. Uvádzame počet subjektov, ktorí majú hodnoty v rámci alebo mimo daného rozsahu pre test POC oproti štandardnému laboratórnemu testu (Tab. 2). Analyzátor Cholestech LDX poskytoval častejšie hodnoty TG v správnej kategórii. Mimo stredného rozsahu boli hodnoty TC z Cholestechu LDX u 14 žien ($p < 0,01$) a hodnoty LDL-C u 20 žien ($p < 0,001$). Pomocou Cholestechu LDX sme získali presné hodnoty HDL-C vo vysokom rozsahu v prípade 98,8 % skúmaného súboru žien. Väčšiu nepresnosť sme

zaznamenali v strednom rozsahu pre TC a LDL-C, avšak v prípade menšieho počtu hodnôt.

Priemerná odchýlka (mmol.l^{-1} , %) pre analyzátor Cholestech LDX verzus CDLM a odchýlka (%) v dvoch klinických medzných bodoch NCEP sú pre všetky analyty uvedené v Tab. 3. V porovnaní s CDLM Cholestech LDX vykazoval malé odchýlky, priemerné odchýlky pre všetky parametre boli $\leq 0,2 \text{ mmol.l}^{-1}$. Odchýlka hodnôt nameraných analyzátorom Cholestech LDX v porovnaní so štandardnými diagnostickými laboratórnymi metódami pre TG, HDL-C a LDL-C predstavovala pozitívnu a pre TC negatívnu hodnotu. Záporná hodnota naznačuje, že analyzátor POC v priemere podhodnocoval laboratórne hodnoty daného parametra, zatiaľ čo kladné hodnoty naznačujú nadhodnotenie. Cholestech LDX v analyzovanom súbore zdravých jedincov nadhodnocoval TG, HDL-C a LDL-C, ale podhodnocoval celkový cholesterol. Priemerná odchýlka (%) bola najnižšia pre TG a najvyššia pre HDL-C. Analyzátor Cholestech LDX vyhovoval smerniciam NCEP pre všetky analyty v prvom

klinickom hraničnom bode NCEP. Rovnako v druhom klinickom hraničnom bode NCEP vyhovoval Cholestech LDX smerniciam NCEP takmer pre všetky analyty – okrem LDL-C, kde bola smernica ($\leq 12\%$) mierne prekročená.

Grafy lineárnej regresie sú pre hodnotené lipidy TC, TG, HDL-C a LDL-C zobrazené na Obr. 1 a korelačné koeficienty (r) sú uvedené v Tab. 3. Všetky analyty merané pomocou Cholestechu LDX významne korelovali s CDLM ($p < 0,001$). Najtesnejšia korelácia bola zistená pre hodnoty HDL-C ($r = 0,8790$). Medzi hodnotami TG, TC z Cholestechu LDX a CDLM bola dobrá zhoda, zatiaľ čo korelačný koeficient LDL-C poukazoval na slabú koreláciu ($r = 0,6709$).

DISKUSIA

Kardiovaskulárne choroby (CVD) sú hlavným globálnym problémom verejného zdravia. Odhaduje sa, že v roku 2019 zomrelo na CVD 17,9 milióna ľudí, čo predstavuje 32 % všetkých celosvetových úmrtí. Z týchto úmrtí bolo 85 % spôsobených srdcovým infarktom a mozgovou príhodou (WHO, 2021). V slovenskej populácii je morbidita a mortalita na choroby neinfekčného pôvodu vysoká, pričom dominantné sú choroby obehovej sústavy (Albert et al., 2017). Dôraz na správnu identifikáciu, monitoring a manažment osôb s vysokým kardiovaskulárnym rizikom vzniku náhlych koronárnych a cerebrálnych príhod je zásadný. Štúdia poukazuje na to, že analyzátor Cholestech LDX môže byť vhodným diagnostickým nástrojom na skrining biochemických markerov pre metabolické abnormality za určitých špecifických podmienok.

Hladiny lipidov, merané analyzátorom Cholestech LDX, ktoré zodpovedajú nízkemu a strednému rozsahu, boli v súlade s výsledkami CDLM. Medzi výsledkami získanými analyzátorom Cholestech LDX a laboratóriom bola veľmi dobrá zhoda. U niektorých pacientov sa výsledky z Cholestechu LDX líšili od výsledkov CDLM v posudzovaných rozsahoch, väčšinou v prípade extrémnych hodnôt nízkeho a stredného rozsahu. V niektorých prípadoch mohlo dôjsť k predanalytickým chybám spôsobených ľudským faktorom, ako sú napr. vzduchové bubliny v skúmavke na odber vzoriek, nedostatočné množstvo krvi vložené do kazety, nedostatočný adaptačný čas. Akákoľvek odchýlka v analyzovaných lipidoch nemusí byť výsledkom zmeny hladiny parametra, ale skôr variácie v zariadení (Glasziou et al., 2008). Uvedené chyby možno eliminovať, vhodné je kva-

litné vyškolenie pracovníkov (Mewna et al., 2009).

Priemerné hodnoty lipidových parametrov v niektorých rozsahoch sa štatisticky líšili, avšak rozdiely boli malé a klinicky nevýznamné. Pri nízkom rozsahu boli výsledky TC a LDL-C nachádzajúce sa v krajných bodoch detegované s väčšou odchýlkou, väčší rozdiel bol v prípade hodnôt LDL-C. Tieto nezrovnalosti mohli byť spôsobené výskytom určitého počtu vzoriek s nízkymi hladinami lipidov v monitorovanom súbore, ako aj skutočnosť, že rozsahy merateľné analyzátorom Cholestech LDX sú obmedzené. V prípade TG niektoré vzorky dosahovali hodnoty okolo $0,51 \text{ mmol.l}^{-1}$, čo bol dolný merateľný limit pre TG. Okrem toho hladiny TG pri 11 vzorkách nespádali do rozsahu merania prístrojom POC a boli z hodnotenia vylúčené. Pacienti s hodnotami mimo uvedených rozsahov bývajú zvyčajne odporúčaní na potvrdzujúce merania v klinickom diagnostickom laboratóriu. Pokiaľ ide o HDL-C, treba myslieť na to, že pri každom znížení HDL-C o 1,0 %, dochádza k zvýšeniu koronárneho rizika o 2,0 až 3,0 % (Bartter, Ryer, 1996). Nadhodnotenie HDL-C v priemere o 13,75 % (a väčšia nezhoda pri nízkych hladinách HDL-C) môže vyvolať určité obavy u ošetrovúcich lekárov, ktorí na základe analyzovaných hodnôt hodnotia zdravie pacientov.

Pri analýze lipidov sa štandardizácia metód, spoľahlivosť a presnosť meraní považujú za mimoriadne dôležité (Zhanga et al., 2015). Analyzátor Cholestech LDX poskytol reprodukovateľné výsledky a lineárna regresia poukázala na to, že existuje dobrá korelácia medzi metódami Cholestech LDX a CDLM. Aj keď neexistujú špecifické kritériá pre prijateľný výkon analyzátorov POC, AHA (American Heart Association) odporúča riadiť sa pokynmi NCEP (NCEP ATP III, 2001). Použité diagnostické limity vychádzali z odporúčaní NCEP ATP III, z hodnotenia severoamerickej populácie s vyššími hladinami celkového cholesterolu, porovnateľnej so slovenskou populáciou. S výnimkou LDL-C analyzátor vyhovoval v súčasnej dobe prijatým cieľom merania zaujatosti. Okrem toho boli pokyny NCEP do značnej miery splnené pre všetky sledované parametre lipidového panelu v dvoch klinických hraničných bodoch, s výnimkou LDL-C, kde boli usmernenia prekročené v druhom medznom bode. Absencia hodnôt vo vysokom rozsahu pre TC, TG a LDL-C a malá početnosť v nízkom rozsahu pre HDL-C vyžaduje pre definovanie vysokého rizika diagnostické vyšetrenie analyzátorom s rozsahom vyšších koncentrácií.

Hodnotenie zhody a vhodnosti použitia analyzátoru POC na základe našich zistení je v súlade s doteraz publikovanými štúdiami (Cheng a kol., 2020; Whitehead a kol., 2014a; Whitehead a kol., 2014b; O'Donovan a kol., 2011; Dale a kol., 2008; Carey a kol., 2006; Shemesh a kol., 2006; Shephard, Tallis, 2002).

Špecifiká a limitácie štúdie

K obmedzeniam štúdie patrí nízka početnosť a nedostatočná robustnosť skúmaného súboru probandov bez známych rizikových faktorov, ako aj výber výlučne žien. Príčinou zistených rozdielov pri niektorých vzorkách môžu byť predanalytické chyby pri manipulácii so vzorkou.

ZÁVER

Point-of-care analyzátor Cholestech LDX preukázal dobrú zhodu s konvenčnými laboratórnymi metódami na stanovenie základných lipidov používaných na identifikáciu kardiovaskulárneho rizika v skupine zdravých žien. Naše zistenia a hodnotenie celkovej zhody a vhodnosti použitia analyzátoru POC podporuje jeho používanie v klinickej praxi, pri populačnom skríningu, monitoringu účinnosti dietetickej liečby, režimovej a farmakologickej liečby v prostredí primárnej zdravotnej starostlivosti, je však nevhodné a nesprávne nahrádzať priame štandardné diagnostické laboratórne metódy nepriamymi point-of-care. Potrebne sú porovnávacie, prierezové, prospektívne, populačné štúdie, keďže výsledky získané z porovnávajúcich analyzátorov majú potenciál ovplyvniť rozhodovanie o liečbe.

Podakovanie

Táto práca bola podporená vedeckými grantmi VEGA 1/0144/19 MŠ SR a ITMS: 313011V344 spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

LITERATÚRA

1. Alberty, R., Studenčan, M., Kováč, F. (2017): Prevalence of conventional cardiovascular risk factors in patients with acute coronary syndromes in Slovakia. *Central European Journal of Public Health*, 25(1), pp. 77—84. doi: 10.21101/cejph.a4351.
2. Barter, P. J., Rye, K. A. (1996): High density lipoproteins and coronary heart disease. *Atherosclerosis*, 121(1), pp. 1—12. doi: 10.1016/0021-9150(95)05675-0.
3. Carey, M., et al. (2006): Validation of a point of care lipid analyser using a hospital-based reference laboratory. *Irish Journal of Medical Science*, 175(4), pp. 30—35.
4. Dale, R. A., Jensen, L. H., Krantz, M. J. (2008): Comparison of two point-of-care lipid analyzers for use in global cardiovascular risk assessments. *Annals of Pharmacotherapy*, 42(5), pp. 633—639. doi:10.1345/aph.1K688.
5. Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high cholesterol in adults (2001): Executive summary of the third report of the National Expert Panel on detection, evaluation, and treatment of high cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*, 285, pp. 2486—2497.
6. Friedewald, W. T., Levy, R. I., Frederickson, D. S. (1972): Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*, 18, pp. 499—502.
7. Glasziou, P. P., et al. (2008): Monitoring cholesterol levels: Measurement error or true change? *Annals of Internal Medicine*, 148(9), pp. 656—661. doi: 10.7326/0003-4819-148-9-200805060-00005
8. Cheng, S. Y., et al. (2020): Performance evaluation of a new mobile POC lipids analyzer. *Journal of Medical and Biological Engineering*, 40(1), pp. 143—148. doi: 10.1007/s40846-019-00495-6.
9. Menown, I. B. A., et al. (2009): Dyslipidemia therapy update: the importance of full lipid profile assessment. *Advances in Therapy*, 26(7), pp. 711—718. doi: 10.1007/s12325-009-0052-3.
10. NCEP (1995): National Cholesterol Education Program. Recommendations on lipoprotein measurement from the working group on lipoprotein measurement. *U.S. National Institutes of Health*; 1995.
11. O'Donovan, D. Ó., et al. (2011): Precision of a point of care testing device for lipid profiling. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(10), pp. 1230—1234. doi: 10.1002/ejlt.201100185.
12. Panz, V. R., et al. (2005): Performance of the CardioChek™ PA and Cholestech LDX® point-of-care analysers compared to clinical diagnostic laboratory methods for the measurement of lipids: cardiovascular topic. *Cardiovascular Journal of South Africa*, 16(2), pp. 112—116.
13. Shemesh, T., et al. (2006): Agreement between laboratory results and on-site pathology testing using Bayer DCA2000+ and Cholestech LDX point-of-care methods in remote Aus-

- tralian Aboriginal communities. *Clinical Chimica Acta*, 367, pp. 69—76. doi: 10.1016/j.cca.2005.11.014.
14. **Shephard, M., Tallis, G. (2002):** Assessment of the point-of-care Cholestech lipid analyser for lipid screening in Aboriginal communities. *Australian Journal of Medical Science*, 23(1), pp. 4—10.
15. **Whitehead, S. J., Ford, C., Gama, R. (2014a):** The impact of different point-of-care testing lipid analysers on cardiovascular disease risk assessment. *Journal of Clinical Pathology*, 67(6), pp. 535—569. doi: 10.1136/jclinpath-2013-202123.
16. **Whitehead, S. J., Ford, C., Gama, R. (2014b):** A combined laboratory and field evaluation of the Cholestech LDX and CardioChek PA point-of-care testing lipid and glucose analysers. *Annals of clinical biochemistry*, 51(1), pp. 54—67. doi: 10.1177/0004563213482890.
17. **WHO (2021):** Cardiovascular diseases (CVDs). Dostupné na: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)) (cit: 11. jún 2021)
18. **Zhang, P. D., et al. (2015):** Blood lipid profiles and factors associated with dyslipidemia assessed by a point-of-care testing device in an outpatient setting: A large-scale cross-sectional study in Southern China. *Clinical biochemistry*, 48(9), pp. 586—589. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2015.03.008.



Laboratórna Diagnostika, XXVI, 2, 2021: 83–90

OPTIMALIZÁCIA METODÍK SDS-PAGE A ŽELATÍNOVEJ ZYMOGRAFIE NA RÝCHLU PROTEOMICKÚ ANALÝZU PACIENTOV

OPTIMALIZATION OF SDS-PAGE AND GELATIN ZYMOGRAPHY METHODS FOR RAPID PROTEOMIC ANALYSIS OF PATIENTS

Večurkovská Ivana, Stupák Marek, Švecová Monika

Dubayová Katarína, Mašlanková Jana

Ústav lekárskej a klinickej biochémie, UPJŠ LF, Košice

e-mail: jana.maslankova@upjs.sk

pôvodná práca

SÚHRN

Cieľom predkladanej práce bolo vyvinúť účinný protokol polyakrylamidovej gélovej elektroforézy na báze dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE), ako aj želatínovej zymografie, na detekciu proteínov. Na štúdium elektroforetického profilovania proteínov bolo použitých 100 vzoriek od pacientov s kolorektálnym karcinómom (CRC) v rôznych štádiách. Bol navrhnutý presný protokol na optimalizáciu podmienok, ako je pH používaných roztokov, koncentrácie jednotlivých zložiek gélov, množstvo vzorky nanášané do gélu, časové rozmedzie farbenia, odfarbovania a iné. Optimalizáciou týchto faktorov boli metódou zymografie detegované matrixové metaloproteinázy v svojej latentnej aj aktívnej forme.

Kľúčové slová: SDS-PAGE; zymografia; optimalizácia

ABSTRACT

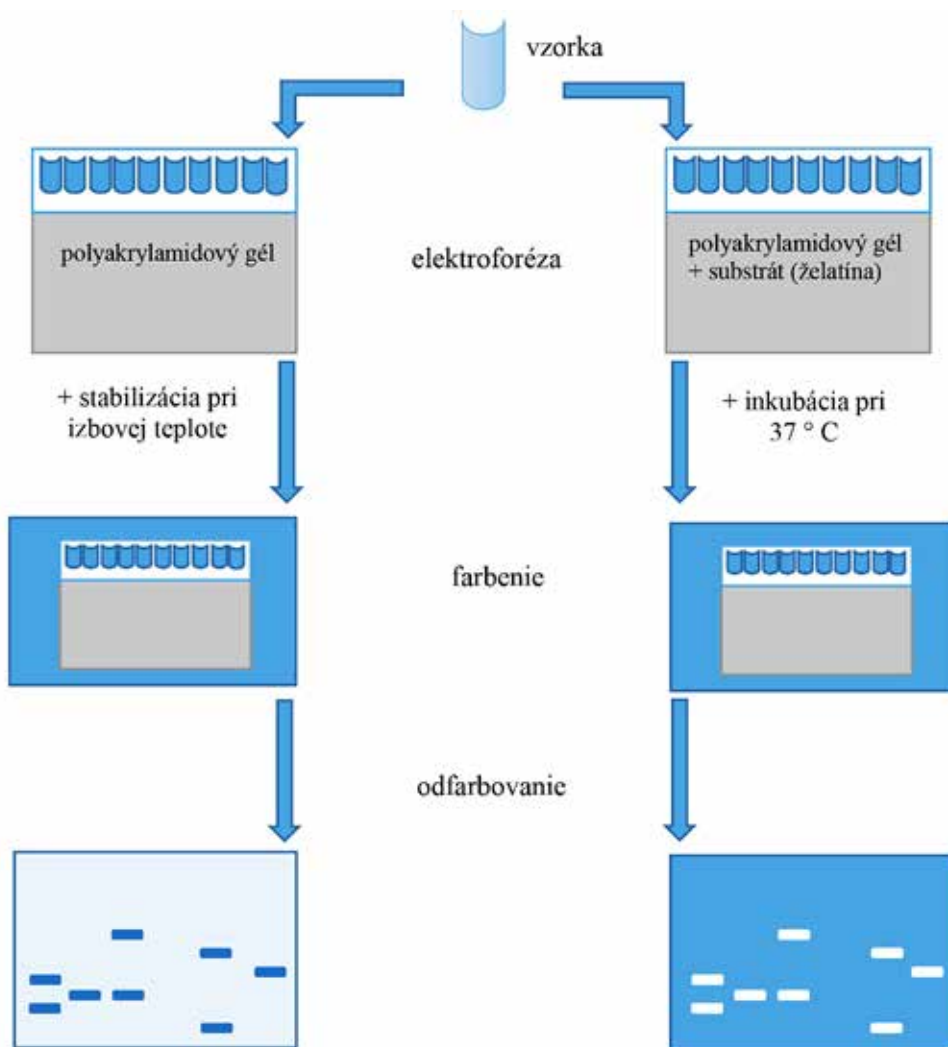
The present work aimed to develop an efficient protocol for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), as well as gelatin zymography, for the detection of proteins. To study the electrophoretic profiling of proteins, 100 samples from pa-

tients with colorectal carcinoma (CRC) at different stages were used. An accurate protocol has been proposed to optimize conditions such as the correct pH level of the solutions used, the concentration of the individual components of the gels, the amount of sample applied to the gel, the time range of staining, decolorization, etc. By optimizing these factors, matrix metalloproteinases in both latent and active forms were detected by zymography.

Key words: SDS-PAGE; zymography; optimization

ÚVOD

Existuje mnoho metód na štúdium a kvantifikáciu enzýmov v biologických tekutinách. Štandardnou laboratórnou separačnou technikou je elektroforéza, ktorou sú nabité proteínové molekuly transportované cez rozpúšťadlo prostredníctvom elektrického poľa. Bežné používané nosné matrice v elektroforéze sú polyakrylamid a agaróza. Tieto matrice slúžia ako porézne médiá a správajú sa ako molekulové sito. Agaróza má veľkú veľkosť pórov a je vhodná na separáciu nukleových kyselín a veľkých proteínových komplexov. Polyakrylamid má menšiu veľkosť pórov a je ideálny na oddelenie väčšiny bielkovín a menších nukleových kyselín (G a s, 2005).



Obr. 1. Ilustračný obrázok priebehu SDS-PAGE a želatínovej zymografie

Pri SDS-PAGE sa vzorky proteínov rôzneho pôvodu (tkanivo, bunkové lyzáty, plazma/sérum, perfuzáty, iné tekutiny) separujú v polyakrylamidových géloch dodecylsulfátu sodného (SDS) podľa molekulovej hmotnosti. Výsledkom techniky sú modré pásy prezentované jednotlivými proteínmi na odfarbenom géle (Obr. 1). Separáciu pomocou SDS-PAGE však obmedzuje hlavne fakt, že niektoré proteázy nerenaturujú, preto ich po pôsobení SDS nemožno detekovať. Úpravou podmienok a zakomponovaním substrátu (želatína, kazeín, elastín, atď.) do polyakrylamidového gélu bola vytvorená modifikovaná SDS-PAGE, tzv. substrátová zymografia. Po štiepení substrátu sú pri zymografii aktivity proteáz graficky zobrazené ako priehľadné pásy na tmavomodrom pozadí (Obr. 1). Aktivita enzýmov je teda detegovaná neprítomnosťou substrátu v géli, ktorú je možné vizualizovať transilumináciou. Aktivita určitej proteázy je úmerná intenzite a hrúbke zodpovedajúceho

pásu na zymograme, ktorý je možné po skenovaní gélov vyhodnotiť elektronicky pomocou počítačového softvéru (B e n c z i k a kol., 2017).

Hlavnou premennou, ktorú je potrebné kontrolovať počas vývoja zymogramov, je dĺžka inkubácie. Predlžujúci sa inkubačný čas vo všeobecnosti zvyšuje citlivosť detekcie proteáz, no zvyšuje sa aj pravdepodobnosť difundácie proteázových pásov, čím sa znižuje rozlíšenie. Okrem toho sa v tomto prípade zóny lýzy produkované tesne migrujúcimi proteínmi spoja, čím sa eliminuje možnosť detekcie všetkých proteolyticky aktívnych enzýmov vo vzorke. Účel SDS-PAGE a zymografie je teda v podstate odlišný – zatiaľ čo SDS-PAGE sa vo veľkej miere používa na separáciu proteínov rôznej veľkosti podľa ich molekulovej hmotnosti, zymografia sa využíva predovšetkým na stanovenie jednotlivých foriem enzýmu (H u, B e e t o n, 2010).

Základné princípy metodík

Princíp SDS-PAGE

SDS PAGE, teda polyakrylamidová gélová elektroforéza v prostredí dodecylsírnanu sodného (SDS – sodium dodecyl sulphate) sa používa pri rýchlom a jednoduchom určení relatívnych molekulových hmotností proteínov. Technika je založená na migrácii nabitých molekúl v gélovej matici pôsobením elektrického poľa. SDS sa viaže na peptidové väzby a zásadité skupiny proteínov, v dôsledku čoho všetky proteíny získajú približne rovnako veľký záporný náboj a pri elektroforéze sa potom delia len podľa veľkosti svojich molekúl. SDS sa dá použiť aj na separáciu podjednotiek alebo jednotlivých reťazcov z komplexnej molekuly proteínov (napr. ľahkých a ťažkých reťazcov imunoglobulínov), pretože zabraňuje ich opätovnej asociácii. Rovnaký cieľ sa dá dosiahnuť aj pomocou močoviny, deoxycholátu a Tritonu X-100 (K h u r s h i d a kol., 2021).

Na tento druh elektroforézy sa používajú dva hlavné typy prístrojov:

- minigelový prístroj, ktorý sa bežne používa na identifikáciu a charakterizáciu proteínov;
- veľkoformátový gélový prístroj, ktorý sa používa na prípravné práce.

SDS-PAGE sa môže uskutočňovať za redukujúcich, ale aj neredukujúcich podmienok. Za redukujúcich podmienok zahŕňa SDS-PAGE linearizáciu proteínov disociáciou vnútroreťazcových disulfidových väzieb, ktorá sa dosiahne krátkym zahriatím vzorky proteínu vo vriacom vodnom kúpeli v prítomnosti redukčného činidla (2-merkaptotanol, ditiotritol). Proteíny sú tiež obalené negatívnym nábojom v prítomnosti aniónového detergentu SDS. Následne sa proteíny rozdelia na jednotlivé pásy, keď migrujú v elektrickom poli „preosievacím“ pôsobením polyakrylamidovej gélovej matrice (O s b o r n e, B r o o k s, 2006).

Postup začína prípravou gélov. SDS-PAGE sa nanáša do aparatury v dvoch vrstvách, hornom stohovacom „stacking“ géli a spodnom, separačnom „running“ géli. Stohovací gél je v podstate voľná sieťovina obsahujúca nízke percento (zvyčajne 3–5 % [w/v]) akrylamidu, cez ktorý proteíny všetkých veľkostí ľahko migrujú v elektrickom poli. Účelom stohovacieho gélu je umožniť všetkým proteínom vo vzorke „stohovať“ sa do koncentrovanej vrstvy pred vstupom do separačného gélu. Rôzne percentá akrylamidu začleneného do separačného gélu sú vhodné na rozlíšenie proteínov s rôznymi rozsahmi molekulových hmotností. Gély pripravené s nižším percentom

akrylamidu (napríklad 5–7,5 % [w/v]), majú väčšiu veľkosť pórov, cez ktoré proteíny prechádzajú, a optimálne rozdelia veľkomolekulárne proteíny. Gély s vyšším percentom akrylamidu (napríklad 12,5–15 % [w/v]) majú menšiu veľkosť pórov a optimálne rozdeľujú proteíny s nižšou molekulovou hmotnosťou. Obyčajne je súbežne s testovanými vzorkami separovaná aj zmes proteínovej štandardy, ladder. Okrem potvrdenia úspešnej separácie proteínov, meranie migračných vzdialeností série proteínov známych molekulových hmotností v akrylamidovej gélovej matici uľahčuje stanovenie molekulovej hmotnosti proteínov vo vzorke. Štandardné zmesi proteínov s rôznymi molekulovými hmotnosťami sú komerčne široko dostupné a dajú sa zakúpiť ako natívne proteíny, označené biotínovými alebo enzýmovými značkami, či rádioaktívne označené (B r o o k s, H a r r i s, 2006).

Princíp želatínovej zymografie

Želatínová zymografia je jednoduchá, ale účinná metóda na detekciu proteolytických enzýmov schopných degradovať želatínu (hydrolizovaný kolagén). Je obzvlášť užitočná pri stanovení dvoch kľúčových členov rodiny matrixových metaloproteináz, MMP-2 (želatináza A) a MMP-9 (želatináza B), vzhľadom na ich výraznú aktivitu pri degradácii želatíny (M a š l a n k o v á a kol., 2019). Táto metóda môže poskytnúť spoľahlivé určenie relatívneho množstva enzýmu a jeho stavu aktivácie (latentné v porovnaní s aktívnymi formami enzýmov) v kultivovaných bunkách, tkanivách a biologických tekutinách. Metódu je tiež možné použiť na skúmanie faktorov, ktoré regulujú expresiu želatináz a modulujú aktiváciu zymogénov v experimentálnych systémoch. Zymografia poskytuje informácie o expresii a aktivite želatináz v ľudských rakovinových tkanivách a načrtáva, ako tieto procesy súvisia s progresiou rakoviny. Pri vhodne nastavených podmienkach je želatínová zymografia vynikajúcim nástrojom na štúdium želatináz v biologických systémoch (T o t h, F r i d m a n, 2001).

Technika zymografie je založená na separácii proteínov elektroforézou na polyakrylamidovom géli s využitím sodium dodecylsulfátu (SDS-PAGE). Špeciálny polyakrylamidový gél sa vytvára indukciou akrylamidovej polymerizácie v prítomnosti špecifického substrátu pre požadovaný MMP enzým. Počas elektroforézy sú MMP aktívované pomocou SDS. Po elektroforetickej separácii a kroku „renaturácie“, teda premytí v Triton X-100 sa gél inkubuje pri 37 °C v tlmivom roztoku obsahujúcom Ca^{2+} a Zn^{2+} optima-

lizovanom na meranie aktivity MMP vzhľadom k špecifickému substrátu (Ren a kol., 2017).

MATERIÁL A METÓDY

Príprava roztokov

Na začiatku je potrebné pripraviť všetky používané roztoky (Tab. 1), pričom je dôležité zohľadniť čas ich prípravy (napríklad renaturačný tlmivý roztok a inkubačný roztok sa pripravujú vždy čerstvé, zatiaľ čo 10 % APS vydrží v mraze aj niekoľko rokov) a skladovanie (napríklad farbici a odfarbovací roztok sa udržiavajú len pri izbovej teplote, elektroforetický tlmivý roztok je vhodné chladiť).

Príprava vzoriek

Pre každú analýzu je dôležité správne a precízne postupovať v predanalytickej fáze, ktorá zahŕňa správny odber materiálu, jeho spracovanie a skladovanie (Tab. 2).

Pred spustením elektroforézy je potrebné stanoviť celkovú koncentráciu proteínov (napríklad Bradfordovou metódou), aby sa na gél aplikovala vždy rovnaká koncentrácia proteínu. Pri SDS-PAGE sa jednotlivé pásy javia najzreteľnejšie, ak je na jamku aplikovaných 0,029–0,061 µg proteínov/5 µl vzorky a pri želatínovej zymografii 0,084 µg/15 µl vzorky. Všetky merané vzorky sú teda riedené tak, aby koncentrácia vzoriek aplikovaných do gélov bola ekvivalentná.

Pri SDS-PAGE prebiehajúcej za redukujúcich podmienok sa do loading tlmivého roztoku musí pridať 2-merkaptoetanol, vzorky pred aplikáciou na gél zahriať (100 °C/5min), chladiť (6 °C/5min) a centrifugovať (14 000 rpm/5 min/4 °C).

Príprava gélov

Príslušné gély vhodne zvolených koncentrácií a objemov sú pripravované do falkónov použitím chemikálií uvedených v Tab. 3 a Tab. 4.

- Running gél je pipetovaný medzi krycie sklá, približne 1–1,5 cm pod hranicu skla (je potrebné si uvedomiť, že APS je donorom voľných kyslíkových radikálov, tzn. iniciátor polymerizačnej reakcie a TEMED je jej katalyzátor. Preto sa APS a TEMED pridávajú ako posledné. Po pridaní TEMEDu sa v momente spúšťa polymerizácia-tuhnutie gélu a treba s ním pracovať rýchlo).
- Na vrch gélu sa nalieva izopropanol (chráni gél pred at-

mosférickým O₂ a teda vytvorením bublín, vyrovnáva povrch gélu, suší prechod medzi gélmi, a tak napomáha priľnutiu stacking gélu).

- Úplná polymerizácia running gélu pri izbovej teplote trvá približne 30 minút (ak sa vo falkóne, v ktorom bol gél pripravovaný, nechá hodená špička z pipety, doba tuhnutia je ľahko odpozorovateľná).
- Po stuhnutí running gélu je pomocou filtračných papierov odsatý použitý izopropanol. Následne sa medzi sklá aplikuje stacking gél a vkladá sa hrebeň na tvorbu jamiek, do ktorých sa bude aplikovať vzorka. Stacking gél polymerizuje približne rovnako dlho ako running gél.

Elektroforéza

- Po ukončení polymerizačnej reakcie sú gély preložené z odliavacieho stojana do elektroforetickej cely.
- Elektroforetická cela je vložená do vane, do ktorej je následne naliaty ELFO tlmivý roztok 1× (zásobný roztok ELFO tlmivého roztoku 5× je tesne pred spustením elektroforézy riedený: 200 ml ELFO tlmivého roztoku 5× + 800 ml ddH₂O), pričom musí byť zaliata celá elektroforetická cela s gélmi (dbá sa na minimalizáciu tvorby bublín a elektroforetická vaňa sa počas celého procesu chladí).
- Až z takto zaliatych gélov sú hrebene vyťahované von (minimalizuje sa riziko poškodenia gélov).
- Do jednej z jamôk každého gélu sú pipetované 4 µl proteínového laddera Opti-Protein XL Marker (marker molekulovej hmotnosti v rozmedzí 10–245 kDa).
- Do zvyšných jamôk sú pipetované vzorky (pri želatínovej zymografii 15 µl a pri SDS PAGE 5 µl riedenej vzorky; viď Príprava vzorky). Elektoroferéza je nastavená na 150 V (30 mA) a trvá približne 1,5 hodiny (zastavuje sa po tom, čo pohybujúce sa vzorky prejdú spodnou hranicou gélu).

Premývanie, inkubácia, farbenie a odfarbovanie

Želatínová zymografia:

- Po prebehnutí elektroforézy sú gély premývané v 100 ml renaturačného tlmivého roztoku (2,5 % Triton X-100) 2 × 30 minút na laboratórnej trepačke.
- Po dvoch dlhších premývaniach nasledujú dve krátke v 100 mM Tris-base (2x5 min).
- Gély sú následne inkubované v inkubačnom roztoku 24 hodín pri 37 °C v termocykléri položenom na trepačke.

Tab. 1. Príprava roztokov pre SDS-PAGE a želatínovú zymografiu

Roztok	Látka	Množstvo
1% roztok želatíny (pre želatínovú zymografiu)	želatína	10 mg
	ddH ₂ O	10 ml
10 % SDS	SDS	10 g
	ddH ₂ O	100 ml
10 % APS	APS	100 mg
	ddH ₂ O	1 ml
elektroforetický (ELFO) tlmivý roztok (5×; pH = 8,3–8,7)	Tris-base	15 g
	glycín	72 g
	SDS	5 g
Renaturačný tlmivý roztok (2,5% Triton X-100)	Triton X-100	5 ml
	ddH ₂ O	195 ml
Loading (sample) tlmivý roztok (4×) (pre želatínovú zymografiu)	1 M Tris-base	2 ml
	glycerol	4 ml
	20 % SDS	4 ml
	brómfenolová modrá 0,4 %	pár kvapiek
Loading (sample) tlmivý roztok (3×) (pre SDS-PAGE)	1 M Tris-base	2,4 ml
	Glycerol	3 ml
	20 % SDS	3 ml
	brómfenolová modrá 0,4 %	pár kvapiek
	5% 2-merkaptoetanol (ak má prebiehať za redukčných podmienok)	1,6 ml
Farbiaci roztok	Coomassie brilliant blue G-250	2 g
	izopropanol	120 ml
	kyselina octová	40 ml
	ddH ₂ O	240 ml
Odfarbovací roztok	kyselina octová	100 ml
	metanol	50 ml
	ddH ₂ O	850 ml
Inkubačný roztok (pre želatínovú zymografiu)	100 mM Tris-base (pH = 7,4)	99,1 ml
	1 mM ZnCl ₂	500 µl
	2,5 M CaCl ₂	400 µl
Stabilizačný roztok (pre SDS-PAGE)	Kyselina chloristá	14 ml
	metanol	80 ml
	ddH ₂ O	306 ml

Tab. 2. Príprava vzoriek pred analýzou

Biologický materiál	Odber do	Spracovanie	Skladovanie
Sérum	Skúmavky bez činidla (so separačným gélom)	Centrifugácia (3 500 rpm.3 min ⁻¹); Alikvótne podiely supernatantu	-80 °C
Plazma	Skúmavky s K2EDTA	Centrifugácia (3 500 rpm.3 min ⁻¹ /4 °C); Alikvótne podiely supernatantu	-80 °C
Tkanivo	Nádoba s fyziologickým roztokom	Homogenizácia v PBS Centrifugácia (10 000 rpm.10 min ⁻¹ /4 °C) Alikvótne podiely supernatantu	-80 °C

Tab. 3. Príprava gélov pre želatínovú zymografiu

Running gél (separačný, spodný)	10% (2 minigély)	Stacking gél (vstupný, horný)	5% (2 minigély)
Roztok želatíny	8,1 ml	ddH ₂ O	3,4 ml
1,5 M Tris- base (pH = 8,8)	5 ml	1 M Tris- base (pH = 6,8)	0,63 ml
10% SDS	200 µl	10% SDS	50 µl
30% akrylamid/bis	6,6 ml	30% akrylamid/bis	0,83 ml
10% APS	100 µl	10% APS	50 µl
TEMED	10 µl	TEMED	5 µl

Tab. 4. Príprava gélov pre SDS-PAGE

Running gél (separačný, spodný)	10% (2 minigély)	Stacking gél (vstupný, horný)	5% (2 minigély)
ddH₂O	2,2 ml	ddH₂O	3,6 ml
1,5 M Tris- base (pH = 8,8)	2,6 ml	1 M Tris-base (pH = 6,8)	500 µl
10% SDS	400 µl	10% SDS	200 µl
30% akrylamid/bis	3,4 ml	30% akrylamid/bis	700 µl
10% APS	20 µl	10% APS	50 µl
TEMED	10 µl	TEMED	5 µl

- Po inkubácii sú gély farbené 0,5% Coomassie brilliant blue G-250 približne 1 hodinu.
- Zafarbené gély sú odfarbované tak dlho, kým sa farbi-vo ďalej neuvoľňuje do odfarbovacieho roztoku a pásy na géloch sú v dobrom kontraste s pozadím.

SDS-PAGE:

- Premývanie gélov prebieha iba v destilovanej vode, a to 3x5 minút.
- Nasleduje stabilizácia proteínov v géloch v stabilizač-nom roztoku, ktorá trvá 30-60 minút.
- Farbenie a odfarbovanie prebieha rovnako ako pri že-latínovej zymografii.

VÝSLEDKY

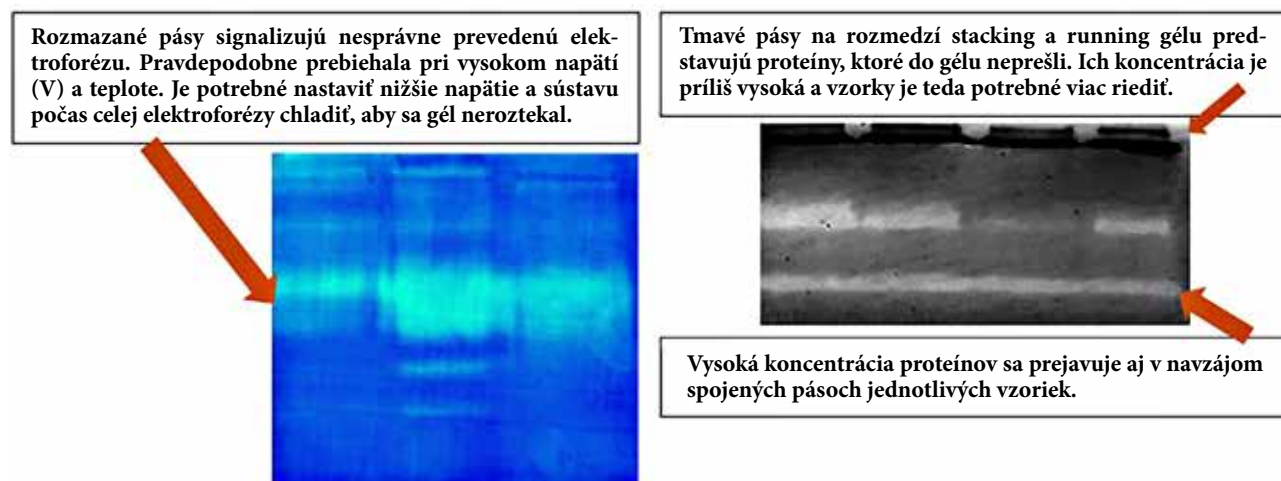
Výsledky želatínovej zymografie

Najčastejšie sa vyskytujúce chyby (Obr. 2) pri želatínovej zymografii sú nesprávne nariadené vzorky a nevhodné podmienky počas elektroforézy. Pozor si treba dať už pri príprave používaných roztokov, pričom jeden z najdôležitejších faktorov je správne upravené pH.

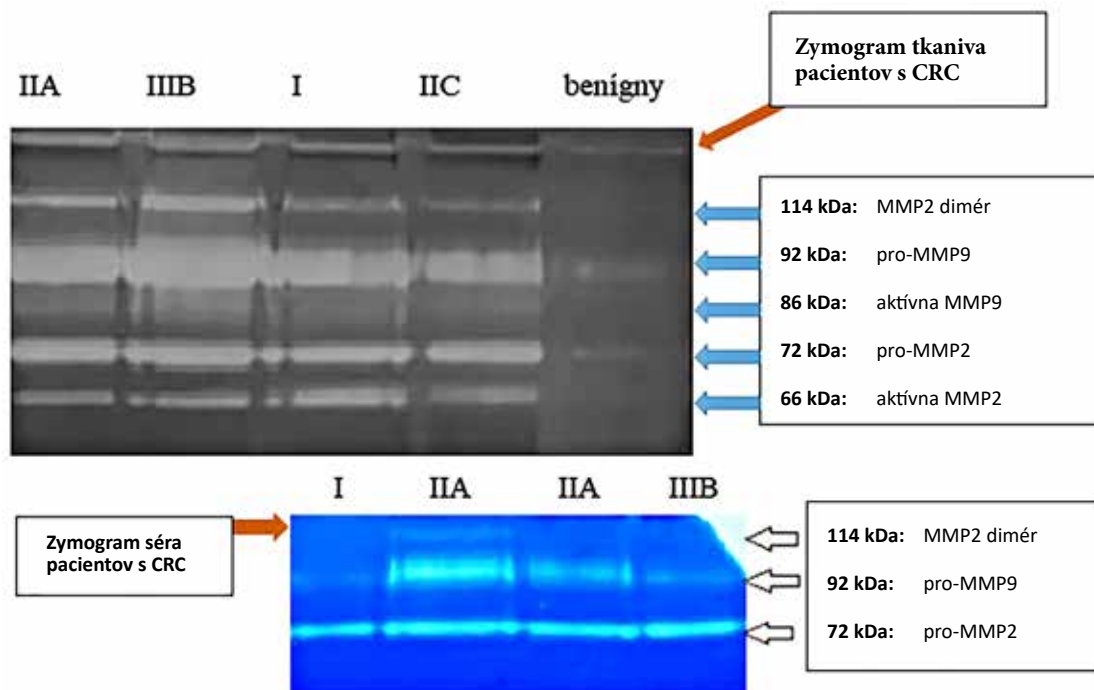
Pri vhodne zvolených podmienkach elektroforézy je možné vidieť (Obr. 3), že v sérach pacientov s CRC sa nena-chádzajú žiadne aktívne formy enzýmov MMP-2 a MMP-9, zatiaľ čo v tkanivách pacientov áno. To môže byť zaujímavým diagnostickým prvkom pri ďalšom využití želatínovej zymografie v štúdiu CRC.

Výsledky SDS-PAGE

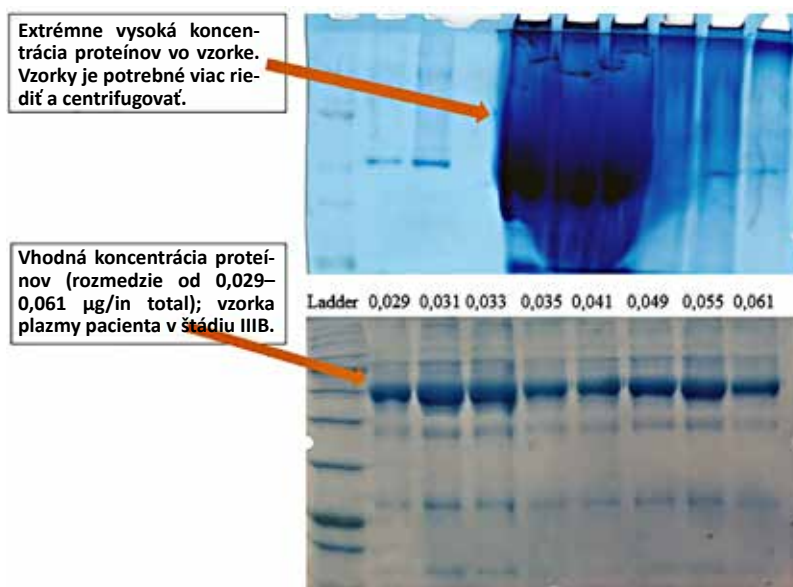
Pri vhodne nastavených podmienkach môže SDS-PA-



Obr. 2. Nesprávne rozdelené proteíny pri želatínovej zymografii (elektroforéza pri 200 V, nechladená) a nesprávne nariadené vzorky (vzorky séra 30×)



Obr. 3. Správne zobrazené pásy pri želatínovej zymografii (elektroforéza: 150 V, chladená), správne nariadené vzorky (vzorky tkaniva 30×, vzorky séra 50×)



Obr. 4. Porovnanie riedenia vzoriek plazmy pri SDS-PAGE (na hornom géli boli vzorky riedené na koncentráciu proteínov 2 µg/in total; na spodnom géli sa porovnáva oveľa nižšie rozmedzie koncentrácie, pričom vzorky boli opätovne centrifugované po pridaní loading tlmiaceho roztoku)

GE poskytnúť informácie o proteínoch a ich relatívnych koncentráciách vo vzorke, čím sa dotvára celkový pohľad na pacienta a úlohy jednotlivých proteínov počas CRC.

ZÁVER

Techniky SDS-PAGE a zymografia môžu byť mimoriadne užitočné pri identifikácii a charakterizácii proteáz. Ak je známych niekoľko dôležitých vlastností stanovovanej proteázy, ako je rozsah pH, v ktorom je aktívna, alebo, či sa môže renaturovať po vystavení SDS, protokol sa môže špecificky a ľahko prispôsobiť tak, aby boli podmienky detekcie optimalizované a enzým mohol byť pomocou týchto dvoch techník bližšie charakterizovaný.

Podakovanie

Článok bol realizovaný s podporou grantového projektu VEGA 1/0333/20.

LITERATÚRA

1. Brooks, S. A., Harris, A. (2006): *Breast Cancer Research Protocols*. Springer Science & Business Media, Oxford, p. 532. ISBN 978-1-59259-969-1.
2. Gas, B. (2005): Electrophoresis. *Encyclopedia of Analytical Science* (Second Edition), Elsevier, p. 363—370. ISBN 978-0-12-369397-6.
3. Hu, X., Beeton, C. (2010): Detection of Functional Matrix Metalloproteinases by Zymography. *Journal of visualized experiments*, (45), p. 2445. doi: 10.3791/2445.
4. Khurshid, Z., et al. (2021): Biochemical analysis of oral fluids for disease detection. *Advances in Clinical Chemistry*, 100, p. 205—253. doi: 10.1016/bs.acc.2020.04.005.
5. Mašlanková, J., et al. (2019): Úloha matrixových metaloproteináz v procese iniciácie a rozvoja aterosklerózy. *Ateroskleróza*, 23, p. 1375-1379.
6. Osborne, C., Brooks, S. A. (2006): SDS-PAGE and Western blotting to detect proteins and glycoproteins of interest in breast cancer research. *Methods in Molecular Medicine*, 120, p. 217—29. doi: 10.1385/1-59259-969-9:217.
7. Ren, Z., Chen, J., Khalil, R. A. (2017): 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.
8. Toth, M., Fridman, R. (2001): Assessment of Gelatinases MMP-2 and MMP-9 by Gelatin Zymography. *Methods in Molecular Medicine*, 57, p. 163—74. doi: 10.1385/1-59259-136-1:163.



Laboratórna Diagnostika, XXVI, 2, 2021: 91–94

SLEDOVANIE EXPRESIE ERBB2 AMPLIKÓNU VZHĽADOM NA ÚSPEŠNOSŤ IVF PROCESU

MONITORING THE EXPRESSION OF ERBB2 AMPLICON CONCERNING THE SUCCESS OF THE IVF PROCESS

Lamancová Petra¹, Urdzik Peter², Toporcerová Silvia²

Kuncová Barbora², Urban Peter¹, Rabajdová Miroslava¹

¹Ústav lekárskej a klinickej biochémie, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, Lekárska fakulta, Košice, Slovakia

²Gynekologicko-pôrodná klinika, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, Lekárska fakulta, Košice, Slovakia

e-mail: petra.lamancova@upjs.sk

pôvodná práca

SÚHRN

Neplodnosť je globálny zdravotný problém ovplyvňujúci ľudí v reprodukčnom veku. Na základe dostupných údajov neplodnosťou trpí 186 miliónov jednotlivcov na celom svete, v dôsledku čoho dochádza aj k nárastu cyklov umelého oplodnenia, *in vitro* fertilizácií (IVF). Cieľom predkladanej štúdie bola detekcia proteínov ErbB2 amplikónu v sére žien zaradených do IVF programu. Získané výsledky koncentrácie proteínov ErbB2 amplikónu naznačujú, že dereguláciou expresie ErbB2 amplikónu, môže dochádzať aj ku zmenám na úrovni angiogenézy u neplodných pacientiek. Výsledky predkladanej pilotnej štúdie prispievajú k prehĺbeniu poznatkov o zmenách v koncentráciách proteínov ErbB2 amplikónu a ich význame pri štúdiu neplodnosti v IVF procese.

Kľúčové slová: ErbB2 amplikón; neplodnosť; angiogenéza

ABSTRACT

Infertility is a global health problem affecting people of reproductive age. Based on available data, 186 million individuals worldwide suffer from infertility, resulting

in an increase *in vitro* fertilization (IVF). The aim of the present study was to detect ErbB2 amplicon proteins in the serum of women in the IVF process. The results obtained with ErbB2 amplicon levels suggest that deregulation of ErbB2 amplicon expression can lead to changes in the level of angiogenesis in infertile patients. The results of the present pilot study contribute to the deepening of knowledge about changes in ErbB2 amplicon protein concentrations and their importance in the study of infertility in the IVF process.

Key words: ErbB2 amplicon; infertility; angiogenesis

ÚVOD

Neplodnosť sa v súčasnosti stáva čoraz väčším problémom a podľa Svetovej zdravotníckej organizácie patrí medzi populačné ochorenia. K najčastejším príčinám sterility u žien patria poruchy ovulácie (25 %), endometrióza (15 %), adhézie panvy (12 %), tubálna blokáda (11 %), iné abnormality vajčkovodov/maternice (11 %), hyperprolaktinémia (7 %) (Walker, Tobler, 2021). Keďže sterilita v dnešnej spoločnosti postihuje čoraz viac párov, zvyšuje sa aj počet IVF. Na úspešnú implantáciu embrya sú potrebné dostatočne vaskulárne vyživované endometrium

a niektoré angiogénne faktory. Vaskulatúra sa u dospelého človeka vyvíja vaskulogenézou alebo angiogenézou. U žien vplyva angiogenéza na folikulogenézu, ovuláciu a funkciu corpus luteum, ale ovplyvňuje aj niektoré patologické procesy v organizme (Saito a kol., 2007). Medzi najvýznamnejšie faktory zapojené do angiogenézy patrí rodina vaskulárnych endotelových faktorov (VEGF, PLGF), angiopoetíny (Ang1,2), endoglin a signálne dráhy zahŕňajúce ErbB2. ErbB2 amplikón, tvorí skupina génov, ktoré sú exprimované pri chronickom zápale, v prekancerózných stavoch a nadexprimované v bunkách tumorov reprodukčného traktu (Deblouis, 2013). Predpokladá sa, že jeden z týchto génov pôsobí ako spúšťač a vedie k deregulácii ostatných génov v amplikóne a následnej translačnej aktivite proteínov. Gény v amplikóne môžu byť deregulované aj na základe vzájomnej interakcie pri tvorbe tzv. génových slučiek. Doposiaľ publikované štúdie popisujú CCCTC-väzbový faktor (CTCF proteín) a cohezin ako možné transkripčné izolátory. Deregulácia amplikónu vedie k deregulácii angiogenézy nielen na molekulovej, ale aj na proteínovej úrovni. CTCF proteín a cohezin ako funkčné chromatinové hranice medzi promótorami a zosilňovačmi, môžu tvoriť tzv. kotvy (anchor), pre chromatinové slučky vzájomne interagujúcich génov. Kohezin hrá tiež významnú úlohu v kohézii sesterských chromatíd a v držbe chromatinových slučiek vzájomne interagujúcich génov v mamálnych bunkách (Gullerova, 2012, Bhahraja, 2016). Analýza transkripčných faktorov a prítomnosť transkripčne, geneticky aktívneho euchromatínu, ako aj analýza proteínov kódovaných génmi ErbB2 amplikónu, hrá hlavnú úlohu v kontrole expresie pri vzniku inflamačných procesov, prekanceróz a tumorov. Pochopenie a analýza expresie génov v ErbB2 amplikóne napr. Mien1, IKZF3, Grb7, ER α , ER β , môže v budúcnosti poskytnúť nové informácie o funkčnosti, úlohe týchto génov pri tvorbe a vzniku zápalových procesov a karcinómov reprodukčného systému a nielen izoforiem génu ErbB2. ErbB2 sa rovnako považuje za pozitívny modulátor expresie vaskulárneho endotelového rastového faktora (VEGF) (Agrawal, 2015). Signálna dráha VEGF predstavuje kľúčový regulátor pri iniciácii angiogenézy za fyziologických aj patologických podmienok. VEGF je exprimovaný v stromálnych bunkách, lumenálnom epiteli a jeho nerovnováha vedie k zlyhaniu implantácie embrya a potratu, kvôli nedostatočnému cievnomu zásobovaniu. Nadmerná expresia ErbB2 zvyšuje koncentráciu VEGF prostredníctvom

najmenej troch rôznych transkripčných faktorov - STAT3, špecifického proteínu 1 (Sp1) a hypoxiou indukovateľných faktorov (HIF) (Salmassi a kol., 2021).

Deregulácia amplikónu vedie k deregulácii angiogenézy nielen na molekulovej, ale aj na proteínovej úrovni, čo môže viesť k ovplyvneniu fyziologických procesov aj z hľadiska fertility. V súčasnosti je možné detegovať expresiu mikroRNA (miRNA), ktoré majú priamy súvis s génmi ErbB2 amplikónu. Je známe, že miRNA majú významnú úlohu v posttranskripčnej regulácii čo má potenciál pri diagnostike onkologických ochorení a na detekciu iných patologických procesov v organizme (Špaková a kol., 2020). Hlavným dôvodom analýzy koncentrácie proteínov ErbB2 amplikónu pri neplodnosti je súvis týchto proteínov s angiogenézou, ktorá je kľúčovým procesom v rámci implantačného okna a decidualizácie endometria (Salmassi a kol., 2021).

Cieľom tohto článku preto bolo stanovenie rozdielov v koncentrácii vybraných proteínov (ErbB2, Mien1, IKZF3, Grb7, ER α , ER β) v závislosti od nasledujúcej úspešnosti IVF zo séra pacientok za účelom vzniku komplexného algoritmu na predikciu úspešnosti IVF.

MATERIÁL A METÓDY

Do štúdie boli zaradené ženy, ktoré boli zahrnuté do procesu IVF. V experimentálnej skupine 37 pacientiek IVF proces zlyhal (potvrdená negativita séra hCG 10. deň po prenose blastocysty, 11. deň po prenose zhutnenej moruly). Úspech IVF bol hodnotený v druhej experimentálnej skupine, u 38 pacientiek, u ktorých bola koncentrácia hCG zaznamenaná viac ako 30 IU/l deň 10. po prenose blastocysty, deň 11. po prenose zhutnenej moruly. V sére pacientiek bola v deň prenosu embrya detekovaná expresia 6 proteínov. Pacientky boli informované lekárom o použití ich krvi na experimentálne – diagnostické účely a následne pacientky podpísali informovaný súhlas. Klinické sledovanie bolo schválené Etickou komisiou UNLP v Košiciach.

Na kvantitatívne enzymaticko-imunologické stanovenie proteínov bola použitá ELISA metóda na základe využitia komerčne dostupných diagnostických kitov, a to ErbB2 (Abcam, Cambridge, UK), Estrogen receptor alpha (ER α) (MyBioSource, San Diego, USA), Estrogen receptor beta (ER β) (MyBioSource, San Diego, USA), Human Growth Factor Receptor Bound Protein 7 (GRB7) (MyBioSource,

San Diego, USA), Human Zinc Finger Protein Aiolos (IKZF3) (MyBioSource, San Diego, USA), Migration And Invasion Enhancer 1 (MIEN1) (MyBioSource, San Diego, USA). Detekcia bola uskutočnená na prístroji Synergy H4 (Biotek, Winooski, USA). Pri vyhodnocovaní výsledkov bola vytvorená štandardná krivka závislosti absorbancie od koncentrácie štandardov. Koncentrácie proteínov, boli štatisticky vyhodnotené programom IMB SPSS Statistics 26. Hodnoty v súboroch mali normálne rozdelenie. Na štatistické vyhodnotenie bol použitý parametrický dvojvýberový Studentov t -test, ktorým boli porovnávané štatistické rozdiely medzi pacientkami s úspešným a neúspešným IVF. Údaje sú prezentované ako priemerná hodnota $\pm$ SD. Na analyzovanie korelácií medzi premennými sme použili Pearsonovu koreláciu a hodnoty sú prezentované ako korelačný koeficient r a štatistická významnosť p .

VÝSLEDKY A DISKUSIA

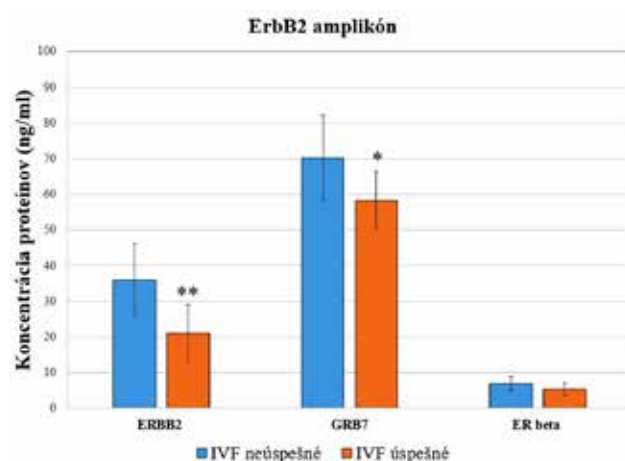
U pacientiek s negatívnym výsledkom IVF procesu boli detegované signifikantne vyššie koncentrácie proteínov ErbB2 o 25 % ($p < 0,01$) a GRB7 o 17 % ($p < 0,05$) oproti pacientkam s pozitívnym IVF (Obr. 1).

Pri porovnaní koncentrácie ostatných sledovaných proteínov boli v skupine s úspešným IVF detegované signifikantne nižšie koncentrácie Mien1 o 29 % ($p < 0,01$) a ER α o 15 % ($p < 0,05$) v porovnaní so skupinou s neúspešným IVF (Obr. 2).

Silná pozitívna Pearsonova korelácia bola v skupine s neúspešnou IVF zistená iba medzi koncentraciami proteínov ErbB2 a GRB7 (0,761, $p = 0,004$). V skupine s úspešnou IVF bola preukázaná slabá pozitívna korelácia medzi koncentraciami IKZF3 a ER α (0,400, $p = 0,023$) ako aj medzi ER α a ER β (0,603, $p = 0,001$).

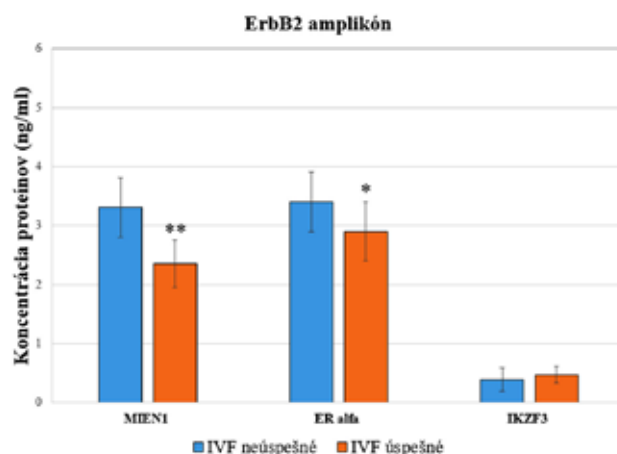
Estrogén je kľúčovým regulátorom rastu a diferenciácie v mnohých tkanivách, vrátane reprodukčného systému, mliečnej žľazy, centrálnej nervovej sústavy ale podieľa sa aj na mnohých patologických procesoch, ako je karcinóm prsníka a endometria (Z h a o a kol., 2008; R u m i a kol., 2017). Estrogénové hormóny ovplyvňujú dozrievanie oocytov, považujú sa za dôležité faktory určujúce kvalitu oocyty. Kvalitný oocyt je nevyhnutný pre úspešný IVF proces (A y v a z a kol., 2009). Plodnosť ženy výrazným spôsobom ovplyvňuje endometrióza, je príčinou neplodnosti u 50 % žien s neplodnosťou a je známe, že dochádza k zhoršovaniu kvality oocytov u týchto pacientiek (C a d e n a s, B o l t, 2012). Štúdie dokazujú zvýšené koncentrácie ER β pri endometrióze, čo je v súlade s našimi zisteniami (B u l u n a kol., 2012). Tiež sa predpokladá, že nadmerná expresia ErbB2 spôsobuje endometriálnu rezistenciu na progesterón pri neplodnosti súvisiacej s endometriózou (P a t e l a kol., 2017).

Z nami nameraných dát zmien koncentrácií jednotlivých vybraných proteínov vyplýva, že pacientky s úspešným IVF mali v sére signifikantne znížené koncentrácie ErbB2, Mien1, Grb7, ER α v porovnaní s pacientkami s neúspešným IVF. Identifikácia týchto biomarkerov preto



Obr. 1. Priemerné hodnoty koncentrácie proteínov ErbB2 amplikónu

Výsledky sú uvádzané ako priemer $\pm$ SD.
Štatistická významnosť: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$



Obr. 2. Priemerné hodnoty koncentrácie proteínov ErbB2 amplikónu

Výsledky sú uvádzané ako priemer $\pm$ SD.
Štatistická významnosť: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

môže viesť k včasnej detekcii zvýšeného rizika neúspešného IVF. Vzhľadom na obmedzenia tejto štúdie stojí za zmienku, že experimentálne skupiny boli malé a získané výsledky sú preto súčasťou prvej štúdie, kde je vzhľadom na veľmi veľký počet faktorov ťažké navrhnúť terapeutickú modalitu, ktorá by znižovala hodnoty koncentrácií vybraných génov

ZÁVER

Dosiahnuté výsledky ukázali významnú rozdielnú translačnú aktivitu proteínov kódovaných génmi ErbB2 amplikónu, a to: IKZ3, estrogénových receptorov, avšak aj GRB7 proteínu u pacientiek s rôznym výsledkom *in vitro* fertilizačného procesu. Výsledky tejto pilotnej štúdie by mohli prispieť k prehĺbeniu poznatkov o translačnej regulácii proteínov ErbB2 amplikónu a o ich úlohe pri regulácii neplodnosti v IVF procese.

Podakovanie

Práca vznikla na základe grantovej podpory: VEGA 1/0873/18, VEGA 1/0620/19. Tieto projekty sú realizované v spolupráci s Gynekologicko-pôrodnickou klinikou UPJŠ LF a UNLP v Košiciach a Centrom pre asistovanú reprodukciu Gyncare v Košiciach.

LITERATÚRA

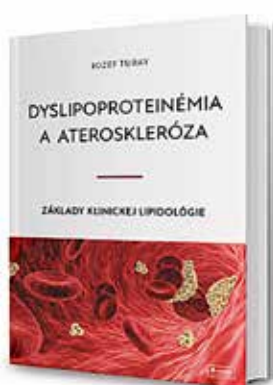
1. Agrawal, S. (2015): The basic molecular biology of angiogenesis and its implication in anticancer therapeutics. *Archives of International Surgery*, 5(3), pp. 121—130. doi: 10.4103/2278-9596.167472.
2. Ayvaz, O. U., et al. (2009): Evaluation of *in vitro* fertilization parameters and estrogen receptor alpha gene polymorphisms for women with unexplained infertility. *Journal of Assisted Reproduction Genetics*, 26(9-10), pp. 503—510. doi: 10.1007/s10815-009-9354-2.
3. Bulun, S., et al. (2012): Role of Estrogen Receptor- β in Endometriosis. *Seminars in Reproductive Medicine*, 30(01), pp. 39—45. doi: 10.1055/s-0031-1299596.
4. Cadenas, C., Bolt, H. M. (2012): Estrogen receptors in human disease. *Archives of toxicology*, 86(10), pp. 1489—1490. doi: 10.1007/s00204-012-0928-x.
5. Deblois, G., St-Pierre, J., Giguère, V. (2013): The PGC-1/ERR signaling axis in cancer. *Oncogene*, 32(30), pp. 3483—3490. doi: 10.1038/onc.2012.529.
6. Patel, B. G., et al. (2017): Progesterone resistance in endometriosis: origins, consequences and interventions. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 96(6), pp.623—632. doi: 10.1111/aogs.13156.
7. Rumi, M. A. K., et al. (2017): Defining the Role of Estrogen Receptor β in the Regulation of Female Fertility. *Endocrinology*, 158(7), pp. 2330—2343. doi: 10.1210/en.2016-1916.
8. Saito, M., et al. (2007): Angiogenic factors in normal endometrium and endometrial adenocarcinoma. *Pathology International*, 57(3), pp. 140—147. doi: 10.1111/j.1440-1827.2006.02071.x.
9. Salmasi, S., Sharifi, M., Rashidi, B. (2021): Ovarian stimulation and exogenous progesterone affect the endometrial miR-16-5p, VEGF protein expression, and angiogenesis. *Microvascular Research*, 133:104074. doi: 10.1016/j.mvr.2020.104074.
10. Varberg, K.M., et al. (2018): Kinetic Analysis of Vasculogenesis Quantifies Dynamics of Vasculogenesis and Angiogenesis *In Vitro*. *Journal of Visualized Experiment*, (131):57044. doi: 10.3791/57044.
11. Zhao, C., Dahlman-Wright, K., Gustafsson, J. A. (2008): Estrogen receptor beta: an overview and update. *Nuclear Receptor Signaling Atlas*, 6(1). doi: 10.1621/nrs.06003.
12. Walker, M., Tobler, K. (2021): Female Infertility. [online] Ncbi.nlm.nih.gov. Dostupné na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556033/> (Accessed: 1 January 2021).
13. Spakova, I., et al. (2020): MicroRNA molecules as predictive biomarkers of adaptive responses to strength training and physical inactivity in haemodialysis patients. *Scientific Reports*, 10(15597). doi: 10.1038/s41598-020-72542-1.



Laboratórna Diagnostika, XXVI, 2, 2021: 95–96

ANOTÁCIE ODBORNEJ LITERATÚRY

Turay, Jozef (2021): Dyslipoproteinémia a ateroskleróza – Základy klinickej lipidológie. A-medi management s. r. o. Bratislava, 112 s. ISBN 978-80-89797- 68-4

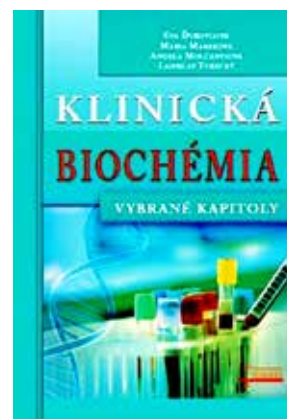


Publikácia je určená širokému spektru lekárov – predovšetkým kardiológom, diabetológom, klinickým biochemikom aj všeobecným lekárom. Autor tejto pomerne útlej publikácie je klinický biochemik a lipidológ s dlhoročnými klinickými skúsenosťami v oblasti diagnostiky aj manažmentu pacientov s poruchami metabolizmu lipoproteínov. V úvodných kapitolách je stručne a zrozumiteľne popísaná úloha dyslipidémií v etiopatogenéze aterosklerózy a jej komplikácií. Okrem vysvetlenia základných pojmov, základnej štruktúry lipoproteínov, ich metabolizmu a analytiky jednotlivých lipoproteínov sa samostatné kapitoly venujú všetkým dôležitým bielkovinám (receptory, transportéry, enzýmy) zapojeným do metabolizmu lipoproteínov, ako aj bunkám a ich produktom (cytokíny, chemokíny a pod.) zúčastňujúcich sa na procese aterogenézy. Ďalšie kapitoly sú venované úlohe jednotlivých lipoproteínov v procese aterogenézy, ich vzťahu ku kardiovaskulárnemu riziku a prehľadu liečby pacientov so zvýšeným rizikom pre aterosklerotické kardiovaskulárne komplikácie. V poslednej časti publikácia popisuje klasifikáciu lipoproteínových porúch a podáva charakteristiku častých

aj zriedkavých primárnych a sekundárnych dyslipoproteinémií. V závere autor načrtáva nové patofyziologické, diagnostické a terapeutické perspektívy v tejto oblasti. Jednotlivé kapitoly odkazujú na literárne referencie z ostatných desiatich rokov. Čitateľný, zrozumiteľný text a kondenzovaný obsah tejto publikácie robia z nej užitočného pomocníka pre klinických lekárov mnohých špecializácií.

MUDr. Eva Ďurovcová, PhD.

Ďurovcová, Eva; Mareková, Mária; Molčányová, Angela; Turecký Ladislav (2020): Klinická biochémia, vybrané kapitoly. Osveta Martin, 301 s. ISBN 978-80-8063-489-6



Dlho očakávaná učebnica určená pre študentov medicíny a pre postgraduálne štúdium. Kniha obsahuje 13 kapitol. Prvá je venovaná základným pojmom (indikácia a interpretácia laboratórných testov) a obsahuje rozbor aj takých dôležitých novinek, ako sú čoraz rozšírenejšie POCT testy a systém „choosing widely“. Druhá a tretia kapitola sa zaoberá poruchami metabolizmu vody, elektrolytov a acidobázickej rovnováhy. Po nich nasledujú biochemické vyšetrenia pri chorobách obličiek a pečene a tri mimoriadne dôležité kapitoly o poruchách metabo-

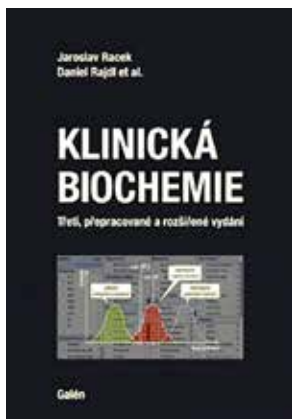
lizmu sacharidov (diabetes a hypoglykémie), lipidov a kardiálnych markeroch. Deviata kapitola je opäť venovaná všeobecnej problematike – vápniku, fosforu a magnéziu. Z oblasti endokrinológie je zaradená kapitola o poruchách funkcie štítnej žľazy. Odborná časť knihy sa končí rozborom špecifických problémov (zápal, sepsa, onkologické ochorenia a poruchy metabolizmu hému). Na záver je zaradený zoznam odporúčanej a použitej literatúry a register.

Štruktúra jednotlivých kapitol je z didaktického hľadiska vynikajúca. Všetky sa začínajú fyziologickým minimom a končia kazuistikami, kontrolnými otázkami a zhrnutím. Tabuľky a grafy sú pekné a prehľadné. Zaujímavé je zaradenie „informácií“ do jednotlivých kapitol. Sú to také časti, ktoré pre bežného študenta nie sú až také dôležité, ale pre postgraduál už sú potrebné.

Záverom je možné konštatovať, že študenti, lekári a pracovníci biochemických laboratórií dostávajú do rúk nesmierne dôležitú a dobre napísanú pomôcku.

prof. MUDr. Oliver Rácz, CSc.

Racek, Jaroslav; Rajdl, Daniel a spol. (2021): Klinická biochemie. Třetí, přepracované a rozšířené vydání. Galén Praha, 454 s. ISBN 978-80-7942-545-0



Tretie vydanie známej monografie plzeňských autorov vychádza 15 rokov po druhom (prvé vydanie vyšlo v roku 1999). Rozsahom sa podobá na predošlé vydanie, ale obsahuje menej kapitol (26 oproti 35 – niektoré kapitoly staršieho vydania boli spojené, ako napríklad pečeň a hyperbilirubinémia, obličky a urolitiáza). Aj počet autorov je menší (v novom vydaní len 5, všetci z LF UK v Plzni). Nová je kapitola „Požadování a interpretace laboratorních tes-

tů” a špeciálne kapitoly sa začínajú acidobázou, elektrolytmi a bielkovinami plazmy. Nasledujú kapitoly venované laboratorným vyšetreniam chorôb obličiek, pečene, porúch výživy a tráviaceho traktu. Po kapitolách venovaných ateroskleróze, kardiológii, endokrinológii a diabetu a i. nasledujú špecifické oblasti (toxikológia, vyšetrenia v gravidite, u detí, v starobe a pri onkologických ochoreniach). Nová je kapitola o zrážaní krvi a monografia sa končí prehľadom nových trendov v klinickej biochémi a laboratórnej medicíne. Typografická úroveň knihy je vysoká – tabuľky a grafy sú pekné a prehľadné. Dôležitou novinkou sú kazuistiky, ktoré sú pre porozumenie chorobných pochodov aspoň také dôležité, ako základné kapitoly monografie. Je to aj v súlade s cieľom autorov uvedeného v úvode: „Ťažiskom je klinická interpretácia laboratorných výsledkov. Metódy sú podrobnejšie uvedené len tam, kde je to potrebné pre pochopenie interpretácie nálezu”.

Recenzent píše tieto riadky 28. októbra 2021, 103 rokov po vzniku spoločného štátu. Je dobré, že priateľstvo medzi našimi národmi sa dodnes realizuje aj na odbornej úrovni – slovenskí biochemici sa už tešia na podrobné čítanie jednotlivých kapitol tejto peknej knihy a na kreatívne užívanie takto získaných poznatkov vo svojej činnosti.

prof. MUDr. Oliver Rácz, CSc.



Laboratórna Diagnostika, XXVI, 2, 2021: 97–98

VÝBER Z NOVINIEK – POZNÁMKY A RECENZIE ODBORNÉHO REDAKTORA

prof. MUDr. Oliver Rácz, CSc.

Existuje glykemická pamäť (legacy effect)?

17–20 rokov po ukončení slávnej štúdie DCCT (The Diabetes Control and Complications Trial, 1983–1993), ktorá je stále citovaná ako definitívny dôkaz možnosti prevencie cievnych komplikácií diabetu dobrou glykemickou kompenzáciou boli jeho účastníci opäť vyšetrení v rámci štúdie EDIC (Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications, 2009). Zistilo sa, že tí, ktorí boli pôvodne liečení intenzifikovaným inzulínovým režimom, mali nižší výskyt mikrovaskulárnych komplikácií oproti tým, ktorí boli počas štúdie na konvenčnej liečbe, a to napriek tomu, že úroveň glykemickej kompenzácie sa medzi nimi za uplynulé obdobie už vyrovnala*. Tento nález bol potvrdený aj pri ďalšom sledovaní, keď už uplynulo 30 rokov od DCCT. Podobné závery malo aj následné sledovanie diabetikov 2. typu v rámci UKPDS (The UK Prospective Diabetes Study, 1977–1997) štúdie. Tieto štúdie sa však venovali pacientom s novozisteným diabetom a je otázne, či sa podobný efekt dá dosiahnuť aj u tých, ktorí majú diabetes už niekoľko rokov. Podľa analýz autorov metabolická pamäť u chorých v týchto štúdiách bola menej výrazná, alebo žiadna. Výsledky takzvaných „real world“ štúdií opäť poukazovali na existenciu metabolickej pamäte a taký bol aj záver jedinej dostupnej metaanalýzy. V ďalšej časti článku autori hľadajú odpoveď na možnú patogenézu metabolickej

pamäte. Jedna hypotéza tvrdí, že za efekt sú zodpovedné epigenetické mechanizmy, ktoré pri dobrej kompenzácií na začiatku choroby môžu trvať dlhé roky. Druhá sa týka oxidačného stresu, ktorá by mohla byť dlhodobo nižšia u dobre kompenzovaných diabetikov, ako u tých s výraznou hyperglykémiou na začiatku choroby**.

*

Folz, R., Laiteerapong, N.: The legacy effect in diabetes: are there long-term benefits? *Diabetologia*, 2021, 64. 2131–2137.

Nový regulátor inzulínovej signalizačnej kaskády

V posledných rokoch sme boli presvedčení, že naše vedomosti o činnosti beta buniek Langerhansových ostrovčekov a metabolizme glukózy sú známe a tvoria logický celok. Poznáme štruktúru a funkciu regulátorov metabolismu sacharidov (inzulín, glukagón a mnohé iné), štruktúru a funkciu inzulínového receptora a postreceptorovú kaskádu v rôznych tkanivách. Nedávno však bol publikovaný objav ďalšieho dôležitého hráča na tomto poli. Ide o inceptor, inhibitor inzulínového receptora a receptora pre inzulínu podobného rastového faktora (IGF1). Bielikovina je kódovaná génom „lir“ (skratka insulin inhibitor receptor), ktorý sa nachádza na 3. chromozóme myši a podobný gén je aj u ľudí. Vyradenie génu lir u myši má za následok hyperinzulinémiu a hypoglykémiu a vedie k úhynu zvierat pár hodín po narodení. Podobné výsledky boli dosiahnuté *in vitro* – vyradením génu lir v izolovaných ostrovčekoch došlo k proliferácii beta buniek. V práci autorov z Mnichova a iných nemeckých výskumných centier sú podrobne opísané rôzne manipulácie s génom lir a výsledky pokusov jednoznačne svedčia o významnej fyziologickej funkcii in-

* Nič nové pod slnkom. V našej monografii o glykovanom hemoglobíne (1989) na strane 74 citujeme prácu z roku 1969, ktorá tvrdí, že o rozvoji komplikácií rozhoduje kompenzácia v prvých 5 rokoch choroby.

** Obidve hypotézy boli publikované v renomovaných vedeckých časopisoch. Napriek tomu referenta pri ich čítaní napadla uštipačná otázka jeho tútora, prof. F.B. Strauba: Pán kolega, to ste aj merali, alebo si to len myslíte.

ceptoru v zmysle autokrinnej regulácie činnosti beta buniek ostrovčekov. V krátkej budúcnosti je možné očakávať výsledky výskumu humánneho génu a jeho produktu ako aj objasnenie ich významu pri prúchách činnosti beta buniek ostrovčekov a signalizačnej kaskády inzulínu. Bude zaujímavé aj hľadanie a objasnenie účinkov inceptora na inzulínové a IFG receptory v iných tkanivách.

*

Ansarullah, Jain C. et al. (2021): Inceptor counteracts insulin signalling in β -cells to control glycaemia. *Nature*, 590, 321—326. doi: 10.1038/s41586-021-03225-8

Kulkarni, R. N. (2021): New-found brake calibrates insulin action in β -cells. *Nature*, 590, 221—223. doi: 10.1038/d41586-021-00141-9.*

Veľký krok neurovedy

Nestáva sa často, že celé číslo multidisciplinárneho časopisu *Nature* (impakt faktor 15) je venované jednej téme. Októbrové prvé číslo zväzku 598 (!) je výnimkou – obsahuje 17 článkov a niekoľko komentárov súvisiacich s výsledkami BRAIN iniciatívy (Brain Research through Advancing Innovative Neurotechnologies), ktorá bola odštartovaná prezidentom Obamom v roku 2013 a podporená miliardami amerických dolárov a viac ako 700 miliónmi eur v rámci európskeho projektu HBP (Human Brain Project). Iniciatíva a jej štedré financovanie je plne opodstatnené, pretože ako to pripomenul profesor Szilveszter E. Vizi, významný výskumník a bývalý prezident Maďarskej Akadémie Vied, „všetko, čo o svete vieme, vieme pomocou mozgu. Na druhej strane z pohľadu biológie a fyziológie o mozgu vieme veľmi málo“. Tento zázračný orgán u človeka má 86 miliárd neurónov a oveľa väčší počet spojení medzi nimi. K tomu je potrebné prirátat približne taký istý počet podporných buniek, bez ktorých by nervový systém nemohol správne fungovať. Na jednotlivých projektoch v rámci BRAIN iniciatívy a HBP spolupracuje viac ako 100 výskumných centier na celom svete, ktoré využívajú všet-

ky dostupné metódy genetiky, molekulovej a bunkovej biológie bioinformatiky a umelej inteligencie.

Jedna z prác (1) obsahuje opis, ako bunky embrya sa menia na vysoko špecializované neuróny ľudskej kôry mozgovej, ďalšie dve (2, 3) referujú o atlase 25 podskupín buniek mozgovej kôry u človeka, myši a svišťa a o epigenetike a transkriptóme buniek kôry (4), piata (5) popisuje detailnú mapu cesty axónov jednotlivých motoneurónov smerom na perifériu a ďalšia opisuje detailnú štruktúru spojení medzi kôrou, bazálnymi gangliami a talamom (6). To, že aká je štruktúra kôry mozgovej, kam vedú axóny (pyramídová dráha), sa na úrovni nervového systému vedelo už predtým. Podobne to bolo s extrapyramídovým systémom, ale uvedené práce to rozpisujú do najmenších detailov. Ďalšie práce skúšajú vysvetliť molekulové a bunkové pozadie takých zložitých funkcií nervového systému, ako sú kognitívne funkcie alebo emócie. Zatiaľ nie sú známe možné aplikácie týchto výsledkov pre klinickú neurológiu a psychiatriu, ale je reálny predpoklad, že k tomu dôjde v najbližších rokoch.

*

Bhaduri, A. et al. (2021): An atlas of cortical arealization identifies dynamic molecular signatures. *Nature*, 598, 200—201. doi: 10.1038/s41586-021-03910-8.

Bakken, T. E. et al. (2021): Comparative cellular analysis of motor cortex in human, marmoset and mouse. *Nature*, 598, 111—119. doi: 10.1038/s41586-021-03465-8.

BRAIN Initiative Cell Census Network (BICCN): (2021) 'A multimodal cell census and atlas of the mammalian primary motor cortex. *Nature*, 598, 86—102. doi: 10.1038/s41586-021-03950-0.

Yao, Z. et al. (2021): A transcriptomic and epigenomic cell atlas of the mouse primary motor cortex. *Nature*, 598, 103—110. doi: 10.1038/s41586-021-03500-8.

Muñoz-Castañeda, R. et al. (2021): Cellular anatomy of the mouse primary motor cortex. *Nature*, 598, 159—166. doi: 10.1038/s41586-021-03970-w.

Foster, N. N. et al. (2021): The mouse cortico-basal ganglia-thalamic network. *Nature*, 598, 188—194. doi: 10.1038/s41586-021-03993-3.

*

Viac prehľadného materiálu o celkovej americkej, európskej a japonskej iniciatíve výskumu mozgu je možné nájsť v časopise *Nature*, 2021, zväzok 598, s. 22—25, <https://doi.org/10.1038/s41586-021-02661-w>.

* Ten druhý článok je v sekcii „News and Views“ a je to aj pre neodborníkov zrozumiteľný komentár k veľmi komplikovanému článku. Podstata je nasledovná: Podľa doterajších predstáv hyperglykémia indukuje tvorbu a vylučovanie inzulínu z beta buniek (a brzdi vylučovanie glukagónu). Objav inceptora to zmení v tom zmysle, že je to zložitejšie – beta bunky kontrolujú vlastnú činnosť autokrinným spôsobom, aby to s vylučovaním inzulínu neprehnali. Podobne ako dobrý šofér sám kontroluje rýchlosť auta (auto-krinne?) podľa stavu vozovky a iných okolností.