

Uniwersytet Jagielloński

Collegium Medicum

Wydział Lekarski

Katarzyna Mamica

Porównywalność pośredniego i bezpośredniego oznaczania stężenia cholesterolu frakcji LDL w populacji pediatrycznej w zależności od wieku, matrycy próbki i jednostki chorobowej

Praca doktorska

Promotor: Prof. dr hab. Krystyna Sztefko

Pracę wykonano w Zakładzie Biochemii Klinicznej
Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego w Krakowie

Kierownik jednostki: Prof. dr hab. Krystyna Sztefko

*Składam serdeczne podziękowania mojej promotor
Pani prof. dr hab. Krystynie Sztefko za wsparcie, wyrozumiałość
i cenne wskazówki podczas powstawania tej pracy*

*Serdeczne podziękowania za pomoc podczas pisania pracy
doktorskiej, a także za ogromne wsparcie składam również
Paniom dr Jolancie Bugajskiej i dr Joannie Berskiej*

*Pragnę podziękować też wszystkim pracownikom Zakładu
Biochemii Klinicznej za życzliwość, która spotykała mnie na
każdym kroku pracy i okazaną pomoc*

*Chciałam również podziękować Tym wszystkim moim Bliskim,
którzy pomagali mi w ukończeniu mojej pracy doktorskiej, za
pomoc, dobre rady, otuchę i nieustanną motywację*

Spis treści

Wykaz skrótów.....	8
1. Wstęp.....	10
1.1 Miażdżycy u dzieci i młodzieży.....	10
1.2 Diagnostyka zaburzeń lipidowych u dzieci i młodzieży – zalecenia.....	11
1.3 Budowa chemiczna i biochemia lipoprotein.....	11
1.3.1. Budowa lipoproteiny o niskiej gęstości (LDL).....	15
1.4 Metody stosowane do oznaczania stężenia LDLC.....	16
1.4.1 Metoda ultrawiorowania (metoda referencyjna).....	17
1.4.2 Metody oznaczania LDLC I generacji.....	18
1.4.3 Metody oznaczania LDLC II generacji.....	18
1.4.4 Metody oznaczania LDLC III generacji.....	19
1.5 Sposoby oszacowywania stężenia LDLC.....	21
1.5.1 Wzór Friedewalda.....	22
1.5.2 Wzór Planelli.....	22
1.5.3 Wzór Cordova.....	23
1.6 Wpływ różnych czynników na oznaczania stężenia LDLC.....	23
2. Cel pracy.....	25
2.1 Cele szczegółowe.....	25
3. Materiał i Metody.....	26
3.1 Materiał kliniczny.....	26
3.2 Metodyka oznaczenia.....	26
3.2.1 Metoda oznaczania cholesterolu całkowitego.....	27

3.2.2 Metoda oznaczania triglicerydów.....	27
3.2.3 Metoda oznaczania cholesterolu frakcji HDL.....	28
3.2.4 Metoda oznaczania cholesterolu frakcji LDL.....	28
3.2.5 Metoda oznaczania apoproteiny B.....	29
3.3 Oszacowanie stężenia cholesterolu frakcji LDL.....	29
3.4 Ocena oszacowanego stężenia LDLC.....	30
3.5 Analiza statystyczna.....	32
4. Wyniki.....	33
4.1 Porównywalność oszacowanych stężeń cholesterolu frakcji LDL (LDLC _F , LDLC _C i LDLC _P) ze stężeniem LDLC _D	33
4.2 Porównywalność stężenia LDLC _F , LDLC _C i LDLC _P ze stężeniem LDLC _D dla wartości LDLC poniżej 2,0 mmol/l i powyżej 2 mmol/l.....	42
4.3 Porównywalność stężenia LDLC _F , LDLC _C , LDLC _P) ze stężeniem LDLC _D w zależności od stężenia triglicerydów, glukozy i HbA1c.....	44
4.4 Porównywalność stężenia LDLC (LDLC _F , LDLC _C , LDLC _P) ze stężeniem LDLC _D w zależności od stężenia związków azotowych nie białkowych i białka całkowitego.....	50
5. Dyskusja.....	57
6. Wnioski.....	70
7. Streszczenie.....	71
8. Summary.....	74
9. Bibliografia.....	77

Wykaz skrótów:

AACE - Association of Clinical Endocrinologists

AAP - American Academy of Pediatrics

AHA - American Heart Association

apoA-I - Apoproteina A-I

apoA-II - Apoproteina A-II

apoA-IV - Apoproteina A-IV

apoB-100 - Apoproteina B-100

apoB-48 - Apoproteina B-48

apoC-I - Apoproteina C-I

apoC-II - Apoproteina C-II

apoC-III - Apoproteina C-III

apoD - Apoproteina D

apoE - Apoproteina E

ATP III - Adult Treatment Panel III

BQ - β -quantification - metoda ultrawiwiania połączona z precypitacją

CDC - Centers for Disease Control and Prevention

CRMLN - Cholesterol Reference Method Laboratory Network

CVD - choroby układu sercowo-naczyniowego (ang. cardiovascular disease)

HbA1c - hemoglobina A1c

HDL - lipoproteina o wysokiej gęstości

HDLC - cholesterol frakcji lipoprotein o wysokiej gęstości

IDL - lipoproteina o pośredniej gęstości

LDL - lipoproteina o niskiej gęstości

LDLC - cholesterol frakcji lipoprotein o niskiej gęstości

LDLC_C - stężenie cholesterolu frakcji lipoprotein o niskiej gęstości obliczone za pomocą wzoru Cordova

LDLC_D - stężenie cholesterolu frakcji lipoprotein o niskiej gęstości oznaczone metodą enzymatyczną

LDLC_F - stężenie cholesterolu frakcji lipoprotein o niskiej gęstości obliczone za pomocą wzoru Friedewalda

LDLC_P - stężenie cholesterolu frakcji lipoprotein o niskiej gęstości obliczone za pomocą wzoru Planelli

Lp(a) - lipoproteina a

NCEP - National Cholesterol Education Program

PDAY - The Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth

RFB - międzynarodowy program kontroli jakości (ang. Reference Institute for Bioanalytics)

sdLDL - małe, gęste lipoproteiny LDL (ang. small density LDL)

TC - cholesterol całkowity

TG - triglicerydy

VLDL - lipoproteina o bardzo małej gęstości

1. Wstęp

1.1 Miażdżycyca u dzieci i młodzieży

Miażdżycyca (ang. atherosclerosis) jest wieloczynnikowym, złożonym procesem polegającym na gromadzeniu się w błonie wewnętrznej naczyń krwionośnych nadmiernych ilości cholesterolu (głównie w postaci lipoprotein o niskiej gęstości (LDL) i zmodyfikowanych lipoprotein LDL) oraz innych lipidów. Powoduje to zmniejszenie światła naczynia krwionośnego i obniżenie jego elastyczności [1,2]. Miażdżycyca zaliczana jest do przewlekłych chorób zapalno-fibroproliferacyjnych i dotyka głównie ściany dużych i średnich naczyń krwionośnych [1,3]. Do najważniejszych czynników ryzyka rozwoju miażdżycy zaliczane są: nieprawidłowa dieta, niska aktywność fizyczna, nadwaga, otyłość, stosowanie używek (papierosy, alkohol), podwyższone stężenie glukozy we krwi (cukrzyca I lub II typu), podwyższone stężenie cholesterolu czy obciążenia genetyczne [1,2,4]. Miażdżycyca może przyczyniać się do rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego (ang. CVD - cardiovascular disease) takich jak: niedokrwienna choroba serca, udar mózgu, nadciśnienie tętnicze i choroby tętnic obwodowych. Choroby układu sercowo-naczyniowego o podłożu miażdżycowym zaliczane są do chorób cywilizacyjnych i stanowią jedną z głównych przyczyn przedwczesnych zgonów na świecie [1]. Według danych statystycznych przedstawionych przez European Cardiovascular Disease z 2012 roku wykazano, że z powodu CVD rocznie umiera 4 mln ludzi w Europie, z czego 48% stanowią mieszkańcy krajów należących do Unii Europejskiej [5].

Miażdżycyca może rozpocząć się już w dzieciństwie [6,7] i ma ona najczęściej charakter bezobjawowy [8]. Szybkość z jaką się rozwija proces miażdżycowy zależy w dużym stopniu od nasilenia zaburzeń lipidowych [9]. Z przeprowadzonych przez The Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) [10] i Bagalusa Heart Study [11] badań anatomopatologicznych wynika, że pierwsze zmiany w śródbłonku naczyniowym w postaci obecności nacieczeń tłuszczowych (ang. fatty streak), które mogą inicjować rozwój miażdżycy w przyszłości, pojawiają się u dzieci już przed okresem pokwitania. Należy jednak podkreślić, że powstające w tętnicach w okresie dzieciństwa pasma tłuszczowo-lipidowe są zmianami odwracalnymi, które po zastosowaniu odpowiednich działań prewencyjnych, m.in. poprzez wyrównanie profilu lipidowego, mogą ulec regresji [12]. Głównymi parametrami biochemicznymi

służącymi do oceny ryzyka rozwoju miażdżycy jest podwyższone stężenie cholesterolu frakcji lipoprotein o niskiej gęstości (LDLC) oraz obniżone stężenia cholesterolu frakcji lipoprotein o wysokiej gęstości (HDLC) [13].

1.2 Diagnostyka zaburzeń lipidowych u dzieci i młodzieży – zalecenia

Wytyczne Association of Clinical Endocrinologists (AACE), American Academy of Pediatrics (AAP) oraz American Heart Association (AHA) zalecają wykonanie oznaczenia stężenia składowych podstawowego profilu lipidowego, w którego skład wchodzi oznaczenie stężenia cholesterolu całkowitego (TC), triglicerydów (TG), HDLC i LDLC, po raz pierwszy u dzieci powyżej 2 roku życia. Oznaczenie podstawowego profilu lipidowego powinno być wykonane zwłaszcza gdy współwystępują czynniki ryzyka sercowo-naczyniowego takie jak: nadwaga, otyłość, insulinooporność, cukrzyca, nadciśnienie tętnicze, palenie papierosów oraz w przypadku występowania w rodzinie chorób sercowo-naczyniowych/lub dyslipidemii [14,15]. Według zaleceń National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Blood Cholesterol Levels in Children and Adolescence [15] oraz NCEP Adult Treatment Panel III (ATP III) [16] stężenie cholesterolu frakcji LDL jest głównym parametrem klasyfikującym pacjentów pod względem ryzyka rozwoju chorób sercowo-naczyniowych. Pomiar stężenia LDLC zalecany jest także w monitorowaniu terapii hipolipemizującej. Według NCEP terapię hipolipemizującą należy rozpocząć, gdy stężenie LDLC przekracza wartość 2,84 mmol/l u dzieci [15] i 3,36 mmol/l u osób dorosłych [17].

1.3 Budowa chemiczna i biochemia lipoprotein

Lipoproteiny stanowią heterogenną grupę związków złożoną z kompleksów białkowo-lipidowych o budowie sferycznej, różniących się między sobą składem chemicznym, właściwościami fizykochemicznymi, wielkością, funkcjami fizjologicznymi oraz wskaźnikiem aterogenności [18,19]. Lipoproteiny zbudowane są z hydrofobowego rdzenia zawierającego estry cholesterolu i triglicerydy oraz hydrofilowej warstwy zewnętrznej w skład której wchodzi: fosfolipidy zwrócone częścią hydrofilową na zewnątrz lipoproteiny, wolny cholesterol oraz białka, głównie

apoprotein [20,18]. Apoproteiny odgrywają istotną rolę w metabolizmie lipoprotein (aktywatory lub inhibitory enzymów oraz ligandy dla receptorów komórkowych), pełnią funkcję strukturalną oraz odpowiadają za utrzymanie stabilności lipoproteiny [20,21]. Zawartość białek i lipidów w lipoproteinach wpływa na ich gęstość oraz wielkość. Im większa zawartość białka w lipoproteinie tym mniejsza średnica i wyższa gęstość danej lipoproteiny. Najwyższą zawartość białek mają lipoproteiny HDL a najniższą chylomikrony [22]. Pomiędzy składnikami budującymi lipoproteiny występują oddziaływania van der Waalsa oraz słabe wiązania wodorowe. Umożliwia to łatwą wymianę składników pomiędzy poszczególnymi frakcjami lipoprotein [20].

Zastosowanie metody ultrawirowania umożliwia podział lipoprotein na pięć głównych klas różniących się gęstością: chylomikrony, lipoproteiny o bardzo małej gęstości (VLDL), lipoproteiny o pośredniej gęstości (IDL), lipoproteiny o niskiej gęstości (LDL) oraz lipoproteiny o wysokiej gęstości (HDL). Szczegółową charakterystykę lipoprotein przedstawiono w tabeli I.

Tabela I. Charakterystyka głównych klas lipoprotein na podstawie literatury [2,18,19,20,23,24].

	Chylomikrony	VLDL	IDL	LDL	HDL
Miejsce syntezy	jelito	wątroba, jelito	osocze/ łożysko naczyniowe	osocze/ łożysko naczyniowe	wątroba, jelito
Miejsce degradacji	osocze/łożysko naczyniowe	osocze/ łożysko naczyniowe	wątroba, osocze/ łożysko naczyniowe	wątroba i tkanki obwodowe	nerki, wątroba
Okres półtrwania w osoczu	5-10 min	2-4 godziny	-	3-4 dni	3-6 dni
Średnica [nm]	90-1000	30-90	25-30	20-25	5-25
Gęstość [g/ml]	<0,93	0,93-1,006	1,006-1,019	1,019-1,063	1,063-1,210
Ruchliwość elektroforetyczna	zostaje w miejscu nałożenia	pre-beta1	pre-beta2	beta	alfa
Apoproteiny	apoC-I, II, III, apoA-I, II, IV, apo E, apoB-48	apoB-100, apoC-I, II, III apoE	apoE, apoB-100	apoB-100, apoC-I,II, III apoE	apoA-I, II apoC-I, II, III apoD, apoE
Stała flotacji [Sf]	400	400-20	20-10	11	-
Skład [%]					
Białka	1-2	8-12	18-20	20-25	45-55
Lipidy całkowite	98-99	90-93	89	79	43-68
Triglicerydy	80-90	50-70	20-25	5-10	3-5
Cholesterol wolny	1-3	7-10	7-10	5-8	3-5
Estry cholesterolu	2-5	4-13	10-12	40-45	15-20
Fosfolipidy	3-7	15-20	15-20	20-22	20-30
Wolne kwasy tłuszczowe	-	1	1	1	≤6

(apoC-I - apoproteina C-I; apoC-II - apoproteina C-II; apoC-III - apoproteina C-III; apoA-I - apoproteina A-I; apoA-II - apoproteina A-II; apoA-IV - apoproteina A-IV; apoE - apoproteina E; apoB-48 - apoproteina B-48; apoB-100 - apoproteina B-100; apoD - apoproteina D).

Główną funkcją lipoprotein jest transport lipidów. Każda z klas lipoprotein odpowiada za określony kierunek transportu. Wchłonięte z pokarmem tłuszcze, głównie triglicerydy, transportowane są za pomocą chylomikronów z jelit do wątroby [18]. Chylomikrony syntezowane są w enterocytach (w proksymalnym odcinku jelita cienkiego) i pojawiają się w krwiobiegu po spożyciu posiłku zawierającego tłuszcze [20,25]. Główną funkcją chylomikronów jest transport egzogennych triglicerydów do wątroby [20]. Następnie pod wpływem lipazy lipoproteinowej chylomikrony przekształcane są w remnanty chylomikronów i wyłapywane są przez specyficzne dla

nich receptory. Możliwe jest to dzięki obecności w remnantach apoproteiny E, będącej ligandem dla receptorów remnantów zlokalizowanych w wątrobie [21]. W hepatocytach z endogennych triglicerydów, cholesterolu, estrów cholesterolu oraz apoprotein syntezowane są lipoproteiny VLDL. Nasilony wzrost syntezy VLDL obserwowany jest po posiłku [24]. Średnica lipoprotein VLDL jest znacznie mniejsza od średnicy chylomikronów, co ułatwia ich swobodną dyfuzję do światła drobnych naczyń krwionośnych [24,25]. W krwiobiegu lipoproteiny VLDL pod wpływem lipazy lipoproteinowej przekształcają się do lipoprotein o pośredniej gęstości. Następnie z lipoprotein IDL w obecności lipazy lipoproteinowej i lipazy wątrobowej powstają lipoproteiny LDL, które umożliwiają dalszy transport lipidów (głównie cholesterolu i fosfolipidów) oraz witamin rozpuszczalnych w tłuszczach do tkanek pozawątrobowych [18,24]. U zdrowego człowieka 90% powstałych lipoprotein LDL pochodzi z degradacji lipoprotein VLDL [24]. W przypadku zbyt dużego stężenia węglowodanów w wątrobie, hepatocyty są zdolne do produkcji lipoprotein LDL [24].

Około 75% krążących we krwi lipoprotein LDL wychwytywanych jest przez wątrobę a 25% przez komórki tkanek pozawątrobowych [20,24]. Wyróżnia się dwie drogi za pomocą których lipoproteiny LDL przedostają się do wnętrza komórek, drogą receptorową o wysokim powinowactwie i drogą niereceptorową o niskim powinowactwie (proces endocytozy) [20]. Do komórek wątroby za pomocą drogi receptorowej wnika około 75% lipoprotein LDL a na drodze endocytozy przedostaje się 25% lipoproteiny LDL [20]. Droga receptorowa wykorzystuje receptory B/E, dla których głównym ligandem są apoproteiny B-100 [21]. Natomiast komórki tkanek obwodowych drogą receptorową wychwytyują 66% lipoprotein LDL a 34% przy udziale endocytozy [20]. Lipoproteiny LDL po wnikięciu do komórek ulegają degradacji w lizosomach pod wpływem odpowiednich enzymów a uwolnione z nich związki są używane do funkcjonowania komórki (m.in. syntezy błon komórkowych) oraz syntezy hormonów sterydowych w nadnerczach i gonadach [21,24]. Za zwrotny transport cholesterolu z tkanek obwodowych do wątroby odpowiadają lipoproteiny HDL. Następnie cholesterol wraz z żółcią wydalany jest z organizmu. Zapobiega to nadmiernemu gromadzeniu się cholesterolu w komórkach tkanek obwodowych [2,21,23].

U osób spożywających pokarmy o wysokiej zawartości cholesterolu lub u pacjentów z rodzinną hipercholesterolemią może pojawić się podklasa lipoprotein

HDL o zwiększonej zawartości apoproteiny E, kosztem zmniejszenia zawartości apoproteiny A-I. Podklasa ta wykazuje wysokie powinowactwo do receptorów B/E [20].

1.3.1. Budowa lipoproteiny o niskiej gęstości (LDL)

Do 1950 roku uważano, że klasa lipoprotein LDL jest jednorodna. W następnych latach udowodniono jednak heterogenność tej klasy lipoprotein [26]. Lipoproteiny LDL różnią się między sobą składem chemicznym (różnice w zawartości procentowej białek i lipidów), właściwościami fizykochemicznymi, rozmiarem i gęstością (od 1,019 g/ml do 1,063 g/ml) [20].

Różnice w gęstości lipoprotein LDL umożliwiły wyodrębnienie czterech podklas LDL. Podklasa LDL-I o najniższej gęstości (1,025 g/ml - 1,035 g/ml), LDL-II (1,034-1,040 g/ml), LDL-III (1,040-1,050 g/ml) oraz podklasę LDL-IV o najwyższej gęstości (1,050g/ml -1,060 g/ml) [20,27,28]. U osób zdrowych w krążeniu dominuje podklasa LDL-II [20], złożona głównie z dużych, lekkich lipoprotein LDL, zawierających procentowo więcej cholesterolu niż białka, o średnicy powyżej 25,5 nm [29]. Natomiast u pacjentów z zaburzeniami metabolizmu lipidów, m.in. insulinoopornością, hiperlipoproteinemią czy hipertriglicydemią, dominują podfrakcje LDL-III i LDL-IV, złożone głównie z lipoprotein LDL, zawierających procentowo więcej białka niż cholesterolu, o średnicy mniejszej niż 25 nm [25,30]. W podfrakcjach LDL-III i LDL-IV przeważają głównie małe, gęste lipoproteiny LDL (sdLDL – small density LDL) o wyższym wskaźniku aterogenności niż lipoproteiny LDL obecne w podklasie LDL-II. Lipoproteiny sdLDL wykazują słabsze powinowactwo do receptorów B/E, co powoduje ich dłuższe przebywanie w łożysku naczyniowym, a tym samym większą podatnością na modyfikację [2,30].

Utrzymujące się przez dłuższy czas podwyższone stężenie lipoprotein LDL w łożysku naczyniowym sprzyja ich modyfikacji [25]. Lipoproteiny LDL ze względu na dużą zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych łatwiej ulegają procesom modyfikacji oksydacyjnej i sprzęgania z końcowymi produktami peroksydacji lipidów [20]. Utlenieniu może ulec zarówno część lipidowa jak i część białkowa lipoproteiny LDL. Modyfikacja apoproteiny B utrudnia rozpoznanie lipoproteiny LDL przez receptory B/E [20,25]. Utlenione lipoproteiny LDL usuwane są głównie przez receptory

„scavenger”, tzw. receptory zmiatające, zlokalizowane na makrofagach oraz przez receptory LRP (lipoprotein related protein) zlokalizowane w wątrobie. Wzrost ilości lipoprotein LDL wewnątrz makrofaga przyspiesza jego przekształcenie w komórkę piankową [20].

Innym rodzajem modyfikacji lipoprotein LDL jest nieenzymatyczna glikacja. Proces ten polega na nietrwałym przyłączeniu cząsteczek glukozy do grupy ϵ -aminowej lizyny apoproteiny B [20]. W przypadku długotrwałego utrzymywania się podwyższonego stężenia glukozy we krwi powstają trwałe połączenia pomiędzy glukozą a grupą ϵ -aminową lizyny, tzw. końcowe produkty glikacji (Gli-LDL) [20]. Proces nieenzymatycznej glikacji również uniemożliwia rozpoznanie lipoprotein LDL przez receptory B/E. Dodatkowo glikowane LDL łatwiej ulegają procesowi oksydacji. Nieenzymatyczna glikacja lipoprotein LDL najczęściej zachodzi u pacjentów z cukrzycą oraz insulinoopornością [25,20]. Kolejnym rodzajem modyfikacji lipoprotein LDL jest złożona modyfikacja glikooksydacyjna prowadząca do powstania glioksy LDL, które charakteryzują się wysokim stopniem arterogenności [25]. Dodatkowo z uwagi na rolę jaką cholesterol frakcji LDL pełni w rozwoju miażdżycy, istotne jest dokładne oznaczenie jego stężenia w surowicy krwi. Ze względu na heterogenność frakcji LDL i współwystępowanie z innymi frakcjami lipidowymi, jest trudne.

1.4 Metody stosowane do oznaczania stężenia LDLC

Metody stosowane do oznaczania stężenia cholesterolu całkowitego w surowicy krwi są proste i wiarygodne. W przeciwieństwie do tego, metody stosowane do oznaczania stężenia cholesterolu frakcji LDL od początku ich wprowadzenia stwarzają problemy analityczne. Obecnie dostępne metody III generacji do oznaczania stężenia LDLC, pomimo wielu udoskonaleń w porównaniu do metod I i II generacji, nadal mają wiele ograniczeń.

1.4.1 Metoda ultrawierowania (metoda referencyjna)

Metodą referencyjną do oznaczania stężenia cholesterolu frakcji LDL w surowicy, zalecaną przez Centers for Disease Control and Prevention (CDC), jest metoda ultrawierowania połączona z precypitacją (BQ – beta quantification) [31]. W metodzie tej wykorzystywana jest sekwencyjna flotacja umożliwiająca różnicowanie lipoprotein pod względem ich gęstości [25]. W pierwszym etapie próbka surowicy poddawana jest ultrawierowaniu (18 godzin, 105 000g) [32] w celu oddzielenia lipoprotein o gęstości poniżej 1,006 g/ml (chylomikrony i lipoproteiny VLDL) od lipoprotein o gęstości powyżej 1,006 g/ml czyli lipoprotein: LDL, IDL, HDL i lipoproteiny a (Lp(a)) [31,33]. W drugim etapie po zakończonym procesie ultrawierowania odrzucana jest warstwa flotująca zawierająca chylomikrony i cząsteczki VLDL, a warstwa sedymentowana rozpuszczana jest w roztworze chlorku sodu (0,15 mmol/l) [34]. W tak przygotowanej mieszaninie oznaczane jest stężenie cholesterolu przy użyciu metody Abell-Kendell [35]. Wartość stężenia oznaczonego cholesterolu jest równa stężeniu cholesterolu zawartego w lipoproteinach o gęstości powyżej 1,006 g/ml ($TC_{d>1,006}$) [33]. W trzecim etapie następuje proces strącenia lipoprotein zawierających apoproteinę B czyli lipoprotein: LDL, IDL i Lp(a) za pomocą roztworu heparyny zawierającego jony magnezu. Metodą Abell-Kendell w supernatancie oznaczane jest stężenie cholesterolu we frakcji HDL (HDLC). Stężenie cholesterolu frakcji LDL obliczane jest za pomocą równania: $LDLC = TC_{d>1,006} - HDLC$ [33]. Wartość wyliczonego stężenia cholesterolu frakcji LDL zawiera zatem stężenie cholesterolu zawartego nie tylko we frakcji LDL ale także w lipoproteinie IDL i Lp(a). U zdrowych osób stężenie cholesterolu zawartego we frakcji IDL i Lp(a) jest niskie i mieści się w zakresie od 0,05 do 0,1 mmol/l i nie wpływa na interpretację wyniku LDLC. U osób z chorobą niedokrwienną serca stężenie IDLC i Lp(a) jest podwyższone, co może mieć wpływ na interpretację wyników stężenia LDLC [19].

Metoda BQ nie jest stosowana rutynowo w laboratoriach ze względu na wysokie koszty, dużą objętości surowicy wymaganą do oznaczenia oraz długi czas wykonania oznaczenia [32]. W niektórych przypadkach, gdy obliczenie stężenia LDLC za pomocą wzorów obarczone jest zbyt dużym błędem lub gdy nie ma możliwości bezpośredniego oznaczenia stężenia LDLC metoda BQ jest stosowana [36].

1.4.2 Metody oznaczania LDLC I generacji

Metody I generacji opierały się na zastosowaniu odpowiednich odczynników umożliwiających strącanie lipoprotein LDL podczas wirowania. Stężenie cholesterolu frakcji LDL w surowicy było wyliczane z różnicy pomiędzy stężeniem cholesterolu całkowitego a stężeniem cholesterolu frakcji nie-LDL (oznaczenie wykonane w nadsączu) [32]. Najczęściej stosowanymi odczynnikami umożliwiającymi strącanie lipoprotein LDL były roztwór heparyny o pH 5,12 [37,38], siarczan poliwinylu [37], niespecyficzne amfipatyczne polimery lub siarczan dekstranu [37]. Wartości stężeń LDLC oznaczone metodami strąceniowymi dobrze korelowały z wartościami stężeń LDLC oznaczonych metodą referencyjną ale tylko dla surowic, w których stężenie TG było prawidłowe [39,40]. Natomiast wyniki stężenia LDLC uzyskiwane metodami I generacji w surowicach o stężeniu TG powyżej 4,58 mmol/l oraz w surowicach, w których stężenie wolnych kwasów tłuszczowych było powyżej 2,0 mmol/l różniły się istotnie od wartości uzyskiwanych metodą referencyjną [38,41]. Wykazano również, że w metodach I generacji wraz z lipoproteiną LDL wytrącały się remnanty VLDL (obecne u pacjentów z hiperlipidemią typu III) oraz Lp(a) [38,39]. Metody I generacji służące do oznaczenia stężenia cholesterolu frakcji LDL nie miały odpowiedniej czułości i swoistości analitycznej, a precyzja oznaczeń była niska [38,37].

1.4.3 Metody oznaczania LDLC II generacji

W metodach II generacji stężenie cholesterolu frakcji LDL było oznaczane z wykorzystaniem przeciwciał poliklonalnych o wysokim powinowactwie do ludzkich apoprotein, głównie apoproteiny A-I (apo A-I) i apoproteiny E (apoE). Przeciwciała przeciw apoA-I i apoE opłaszczane na polistyrenowo-lateksowych kuleczkach [42,43] wiązały lipoproteiny zawierające apoA-I i apoE czyli chylomikrony, VLDL, IDL i HDL. Po odwirowaniu próbki, w osadzie znajdowały się kompleksy lipoprotein związanych z przeciwciałami a supernatant zawierał lipoproteiny LDL i niewielkie ilości Lp(a) [42]. Stężenie cholesterolu frakcji LDL było oznaczane enzymatycznie. Wartości stężeń LDLC oznaczone metodami II generacji dobrze korelowały z wartościami stężeń LDLC oznaczonymi metodą referencyjną [42,44].

Metodami II generacji możliwe było oznaczanie stężenia LDLC w próbkach krwi pobranych nie na czczo [44,45,46], próbkach pochodzących od pacjentów z mieszaną hiperlipidemią a także od pacjentów z izolowaną hypoalfalipoproteinemią [42]. Jednak nadal metoda ta nie mogła być wykorzystywana w przypadku próbek pobranych od pacjentów z hipertriglicydemią oraz pacjentów z hipercholesterolemią [42]. Metody II generacji były metodami pracochłonnymi i drogimi ze względu na wysokie koszty przeciwciał, wymagały dużych objętości surowicy i odpowiedniego sprzętu. Metody te charakteryzowały się niezbyt wysoką swoistością [31].

1.4.4 Metody oznaczania LDLC III generacji

Metody III generacji są pierwszymi bezpośrednimi (homogennymi) metodami do enzymatycznego oznaczania stężenia cholesterolu frakcji LDL [32]. W 1998 roku Sugiuchi i wsp. [47] opisali nowatorską metodę do oznaczania stężenia LDLC opatentowaną przez firmę Kynowa Medox. Obecnie znanych jest 7 metod do bezpośredniego oznaczania cholesterolu frakcji LDL, w metodach tych stosowane są różne zestawy odczynników [48,49,32]. Każdy z produkowanych zestawów odczynników zawiera dwa odczynniki. Pierwszy odczynnik odpowiada za blokowanie lub rozpuszczanie cząsteczek nie-LDL. Natomiast drugi odczynnik umożliwia oznaczanie stężenia cholesterolu zawartego w cząsteczkach LDL. Skład chemiczny odczynników różni się pomiędzy firmami np. odczynnik I wyprodukowany przez firmę Kynowa Medex składa się z buforu o pH 6,75 zawierającego siarczan α -cyklodekstryny, $MgCl_2$ i barwnik [32]. Głównym zadaniem odczynnika jest blokowanie cholesterolu zawartego w chylomikronach oraz w cząsteczkach VLDL. Odczynnik I firmy Daiichi Pure Chemical Company składa się z buforu o pH 6,3 zawierającego kwas askorbinowy, oksydazę cholesterolową, 4-aminoantypirynę, peroksydazę, esterazę cholesterolową i odpowiedni detergent [32]. Odczynnik I firmy Wako Chemicals zawiera bufor o pH 6,8, w skład którego wchodzi (N-(2-hydroksy-3-sulfpropylo)-3,5-dimetoksyanilina), sól sodowa, oksydaza cholesterolowa, esteraza cholesterolowa, katalaza i surfaktanty amfoteryczne [32]. Główną funkcją surfaktantów amfoterycznych jest selektywne blokowanie cząsteczek LDL. Odczynnik II zawsze zawiera enzymy umożliwiające oznaczenie stężenia cholesterolu: oksydazę cholesterolową, esterazę cholesterolową i peroksydazę [32]. Odczynnik II firmy Kynowa Medex składa się

z buforu o pH 6,75 zawierającego oksydazę cholesterolową, esterazę cholesterolową, peroksydazę, barwnik i polioksyetyleno-polioksypropylenowy (POE-POP) [32]. Zadaniem POE-POP jest blokowanie cholesterolu zawartego w cząsteczkach HDL. Odczynnik II firmy Daiichi Pure Chemical Company składa się z buforu o pH 6,3 zawierającego disodową sól N,N-bis-(4-sulfobutylo)-m-toluidyni specyficzny detergent, którego głównym zadaniem jest uwalnianie cholesterolu z cząsteczek LDL [32]. Natomiast odczynnik II z firmy Wako Chemicals składa się z buforu o pH 7,0 zawierającego 4-aminoantypirynę, peroksydazę, azydek sodu i specyficzny odczynnik umożliwiający usunięcie surfaktantów amfoterycznych z cząsteczek LDL [32].

Do oznaczenia stężenia LDLC wykorzystywane są analizatory biochemiczne różnych producentów, odczyty wykonywane są przy różnych długościach fali od 546 nm do 700nm oraz stosowane są różne objętości odczynników I i II [32]. Metody homogenne cechują się znacznie wyższą powtarzalnością i dokładnością oznaczenia w porównaniu do metod I i II generacji [19]. Odzysk cholesterolu frakcji LDLC dla metod III generacji wynosi od 87% do 105%. Wartości stężeń LDLC uzyskane metodami III generacji wykazują silną korelację z wartościami stężeń LDLC uzyskanymi metodą referencyjną w próbkach pochodzących od osób zdrowych [50,51,52,53]. Metody bezpośrednie są w pełni zautomatyzowane, nie wymagają wstępnego przygotowania, ani dużych objętości próbek, a oznaczenie wykonywane jest w krótkim czasie [19]. Metodami III generacji możliwe jest wykonywanie oznaczenia stężenia LDLC w próbkach pobranych nie na czczo, co jest istotne dla populacji pediatrycznej, u pacjentów z cukrzycą typu I oraz w próbkach pochodzących od pacjentów z hiperlipidemią [51,50].

Głównym celem standaryzacji metod analitycznych wykorzystywanych w laboratoriach medycznych jest zapewnienie porównywalności wyników danego parametru oznaczanego różnymi metodami analitycznymi w różnych laboratoriach [54,55]. Najistotniejszym elementem standaryzacji metod analitycznych jest posiadanie jednoznacznie zdefiniowanego standardu, który charakteryzuje się wysokim stopniem czystości, identyczną budową chemiczną i właściwościami chemicznymi z substancją, która ma być oznaczana w próbce pacjenta [54,55]. Dodatkowo ważnym elementem procesu standaryzacji jest posiadanie metody definitywnej, za pomocą której zostanie wyznaczona wartość stężenia danej substancji w pierwszorzędowym materiale referencyjnym [54].

Proces standaryzacji najłatwiej przeprowadzić dla substancji homogennych np. glukozy. Natomiast w przypadku substancji heterogennych np. lipoprotein LDL, które dodatkowo w stanach patofizjologicznych mogą ulegać procesom oksydacji lub glikacji uzyskanie odpowiednich standardów jest trudne do osiągnięcia. W laboratoriach medycznych do oznaczenia stężenia cholesterolu zawartego we frakcji LDL wykorzystywane są gotowe zestawy odczynników lub odczynniki wymagające tylko prostego przygotowania. Producenci odczynników, standardów oraz materiałów kontrolnych, zgodnie z zaleceniami światowych organizacji zajmujących się standaryzacją procedur analitycznych, są odpowiedzialni za ich jakość [55]. National Cholesterol Education Program Working Group on Lipoprotein Measurement w 1995 roku przedstawiła rekomendacje dotyczące pomiaru stężenia cholesterolu we frakcji LDL, w której zalecają aby każda wprowadzana do użytku komercyjnego metoda do bezpośredniego oznaczania stężenia LDLC była porównywana z metodą referencyjną zatwierdzoną przez Centers for Disease Control and Prevention [56]. W tym celu w 1997 roku CDC powołało sieć laboratoriów, którym nadano nazwę Cholesterol Reference Method Laboratory Network (CRMLN) [56]. Głównym celem CRMLN było stworzenie protokołu umożliwiającego ocenę wprowadzanych metod do bezpośredniego oznaczania stężenia LDLC, poprzez porównanie uzyskanych wartości stężeń LDLC z wartościami uzyskanymi metodą referencyjną [56]. Jednym z istotnych elementów w protokole postępowania jest wykonywanie oznaczania stężenia LDLC w nie zamrożonej próbce, w celu zmniejszenia wpływu efektu matrycowego. Skutkuje to uzyskaniem dokładniejszego wyniku i poprawą porównywalności wyników stężeń LDLC uzyskanych różnymi metodami bezpośrednimi. Ze względu na dużą różnorodność zestawów odczynników do oznaczania stężenia LDLC jak i analizatorów biochemicznych przeprowadzenie procesu standaryzacji jest ważne [31]. National Cholesterol Education Program Working Group on Lipoprotein Measurement (NCEP) zaleca aby całkowity dopuszczalny błąd dla oznaczenia stężenia LDLC nie przekraczał 12% [31].

1.5 Sposoby oszacowywania stężenia LDLC

Ze względu na problemy metodyczne stężenie LDLC szacowano w oparciu o empiryczne wzory. I nawet obecnie, pomimo dostępności metod III generacji oznaczania LDLC w laboratoriach stężenie tej frakcji jest znacznie częściej

oszacowywane ze wzorów niż oznaczane metodą enzymatyczną. Najczęściej stosowanym wzorem jest wzór Friedewalda opublikowany w 1972 roku [57]. Nadal jednak trwają prace nad opracowaniem wzoru [58,59,60,61,62] umożliwiającego wyliczenie stężenia LDLC, który mógłby być stosowany niezależnie od stanu klinicznego pacjenta. Najnowszy wzór został zaproponowany w 2013 roku przez Cordova i wsp. [63].

1.5.1 Wzór Friedewalda

Wzór Friedewalda umożliwia wyliczenie stężenia LDLC w oparciu o stężenie cholesterolu całkowitego, cholesterolu frakcji HDL i stężenia triglicerydów: $LDLC[mmol/l] = TC[mmol/l] - HDLC[mmol/l] - TG[mmol/l]/2,2$ [57], gdzie $TG/2,2$ odzwierciedla stężenie cholesterolu frakcji VLDL. Lipoproteiny VLDL zawierają około 90% triglicerydów krążących w organizmie [57,64]. Wzór Friedewalda może być stosowany wyłącznie dla próbek pobranych na czczo (wymagana przerwa od ostatniego posiłku to 8 do 12 godzin przed pobraniem krwi), w których stężenie TG wynosi poniżej 4,56 mmol/l (<400 mg/dl) [64].

U osób z normotriglicydemią stężenie LDLC obliczone ze wzoru Friedewalda dobrze koreluje ze stężeniem LDLC oznaczonym metodą referencyjną [65]. Wzór Friedewalda nie powinien być stosowany do wyliczania LDLC u pacjentów ze zdiagnozowaną hiperlipidemią typu III [64], dysbetalipoproteinemią (akumulacja remnantów lipoprotein) [32] czy chorobami nerek [66,67], cukrzycą [68], chorobami wątroby [69] jak również u pacjentów stosujących zastępczą terapię hormonalną [70]. Pomimo wielu wad wzór Friedewalda jest najczęściej wykorzystywany przez laboratoria do oszacowania stężenia LDLC.

1.5.2 Wzór Planelli

Ryzyko rozwoju choroby niedokrwiennej serca wzrasta wraz ze wzrostem stężenia apoproteiny B (apoB) [64]. Planelli i wsp. [58] opracowali wzór umożliwiający wyliczenie stężenia LDLC, który uwzględnia nie tylko stężenie TC i TG ale także stężenie apoB: $LDLC[mmol/l] = 0,41 * TC[mmol/l] - 0,32 * TG[mmol/l] + 1,70 * apoB[g/l] - 0,27$. Główną zaletą wzoru Planelli jest możliwość jego zastosowania u pacjentów

z hipertriglicydemią [58,67,71] oraz z chorobami nerek [66]. Wartości stężeń cholesterolu frakcji LDL wyliczone ze wzoru Planelli dobrze korelują z wartościami stężeń LDLC oznaczonymi metodą referencyjną [19].

1.5.3 Wzór Cordova

Wzór Cordova umożliwia wyliczenie stężenia LDLC w oparciu tylko o stężenie TC i HDLC: $LDLC_{[mmol/l]} = 3/4 * (TC_{[mmol/l]} - HDLC_{[mmol/l]})$. Może być stosowany u pacjentów z hiperlipidemią, cukrzycą czy innymi zaburzeniami metabolicznymi, a próbki nie muszą być pobrane na czczo [63].

1.6 Wpływ różnych czynników na oznaczanie stężenia LDLC

Materiałem biologicznym wykorzystywanym do oznaczania parametrów biochemicznych jest surowica krwi, która jest wodnym roztworem zawierającym ogromną liczbę heterogennych substancji organicznych i nieorganicznych. Ponieważ każde oznaczenie ilościowe opiera się na porównaniu efektu reakcji chemicznej w próbce pacjenta i próbce wzorcowej, istotne jest aby matryca próbki wzorcowej była porównywalna z matrycą próbki pacjenta (komutabilność próbek) [54]. W przypadku oznaczania stężenia LDLC w surowicy krwi nie jest możliwe uzyskanie porównywalności matrycy próbki wzorcowej i próbki pacjentów, gdyż trudne jest przygotowanie próbki wzorcowej odzwierciedlającej heterogenność frakcji lipidowych w każdej jednostce chorobowej. Większość metod stosowanych do oznaczania stężenia LDLC jest podatna na efekty matrycowe [72]. Dodatkowo u pacjentów pediatrycznych, geriatrycznych oraz pacjentów z chorobami przewlekłymi, stwierdza się duże różnice w składzie matrycy próbek surowic w porównaniu do surowic pochodzących od osób zdrowych.

Choroby przewlekłe mogą prowadzić do bezpośredniego lub pośredniego upośledzenia funkcjonowania głównych narządów m. in. nerek, wątroby czy trzustki [25]. Przyczynia się to nie tylko do wzrostu stężenia substancji występujących we krwi w warunkach fizjologicznych, takich jak mocznik, kreatynina, kwas moczowy czy hemoglobina glikowana, ale także do pojawienia się substancji, które nie są obecne w łożysku naczyniowym w warunkach fizjologicznych, np. nietypowych lipoprotein

[25]. Matryca próbek pochodzących od pacjentów z chorobami przewlekłymi znacznie różni się od matrycy próbek osób zdrowych. Substancje, które powodują zmianę tej matrycy mogą wpływać na oznaczenia biochemiczne oraz utrudniać interpretację uzyskanych wyników. Przykładem próbek o znacznie zmienionej matrycy są próbki pochodzące od pacjentów z przewlekłą chorobą nerek. U tych pacjentów dochodzi zazwyczaj do nieodwracalnego uszkodzenia nefronów, co skutkuje upośledzeniem zdolności filtracyjnej kłębuszków nerkowych. Powoduje to nadmierną akumulację składników mocznicowych i dalsze uszkodzenie nerek oraz innych narządów [73]. Przykładem składników mocznicowych są: kreatynina, mocznik, kwas moczowy, β -2 mikroglobulina, cystatyna C oraz homocysteina [74]. Składniki mocznicowe wykazują różne właściwości biologiczne i nie zawsze dializa umożliwia ich całkowite usunięcie z organizmu. U pacjentów z przewlekłą chorobą nerek dochodzi również do zwiększonego wydalania albuminy z moczem. Obniżenie jej stężenia w krwiobiegu skutkuje zaburzonym transportem substancji związanych z albuminą. Obserwuje się również wzmożony proces oksydacji białek, co może wpływać na ich zdolności wiążące. U pacjentów z przewlekłą chorobą nerek często dochodzi do wystąpienia kwasicy metabolicznej, co może zaburzać przebieg reakcji biochemicznych.

Kolejnym przykładem próbek o zmienionej matrycy są próbki pochodzące od pacjentów z cukrzycą. Utrzymujące się przez dłuższy czas wysokie stężenie glukozy przyczynia się do nasilenia procesów glikacji, które zachodzą wewnątrz oraz poza komórką. Proces glikacji dotyczy białek takich jak: hemoglobina, albumina, lipoproteiny czy białka układu krzepnięcia. Może powodować zmianę konformacji białek i zmieniać ich własności wiążące lub powodować nieswoiste wiązania, które nie występują przy prawidłowej strukturze białka. Dodatkowo procesowi glikacji ulegają lipidy oraz kwas deoksyrybonukleinowy (DNA) [75,76,77].

Wiarygodne oznaczenie stężenia cholesterolu frakcji LDL jest istotne u każdego pacjenta, niezależnie od wieku czy stanu klinicznego. Jednakże problemy metodyczne związane z oznaczaniem, m.in. wynikające ze różnicy pomiędzy matrycami próbek, w dalszym ciągu skłaniają do poszukiwania możliwości dokładniejszego oszacowania LDLC, np. przy pomocy wzorów empirycznych. Bezpośrednie oznaczenie stężenia analitu jest uważane za optymalne postępowanie analityczne, jednak gdy pojawia się zbyt dużo interferencji lub ograniczeń metodycznych zawsze poszukuje się alternatywnych dróg oceny stężenia analitu.

2. Cel pracy

Celem pracy było sprawdzenie porównywalności wartości stężeń cholesterolu frakcji LDL oszacowanych przy użyciu wzoru Friedewalda, wzoru Cordova i wzoru Planelli z wartościami stężeń LDLC oznaczonymi metodą bezpośrednią.

2.1 Cele szczegółowe

1. Przeprowadzenie porównania stężeń LDLC oszacowanych przy użyciu wzorów i oznaczonych metodą bezpośrednią w zależności od wieku:
 - a) dzieci poniżej 1 roku życia,
 - b) dzieci powyżej 1 roku życia.
2. Przeprowadzenie porównania stężeń LDLC oszacowanych przy użyciu wzorów i oznaczonych metodą bezpośrednią w zależności od jednostki chorobowej zdiagnozowanej u dziecka:
 - a) cukrzyca typu I,
 - b) otyłość,
 - c) przewlekła choroba nerek,
 - d) choroby nowotworowe.
3. Przeprowadzenie porównania stężeń LDLC oszacowanych przy użyciu wzorów i oznaczonych metodą bezpośrednią w zależności od stężenia:
 - a) cholesterolu frakcji LDLC w próbkach,
 - b) triglicerydów, glukozy i hemoglobiny A1c w próbkach,
 - c) kreatyniny, mocznika, kwasu moczowego i białka całkowitego w próbkach.

3. Materiał i Metody

3.1 Materiał kliniczny

Dla potrzeb niniejszej pracy zebrano próbki surowic pozostałe po wykonaniu rutynowych badań u dzieci leczonych w Uniwersyteckim Szpitalu Dziecięcym w Krakowie. Gromadzono surowice o znanym stężeniu mocznika, kreatyniny, białka całkowitego, glukozy i/lub kwasu moczowego. Dodatkowo zebrano surowice dzieci hospitalizowanych, u których znano stężenie hemoglobiny glikowanej (HbA_{1c}). Surowice, w których stężenie triglicerydów było powyżej 4,56 mmol/l nie były brane pod uwagę.

W sumie zebrano 549 surowic dzieci w wieku od pierwszego dnia życia do 18 lat. W oparciu o historię choroby uzyskano jednoznaczną informację o jednostkach chorobowych 213 dzieci, z czego 92 dzieci było z cukrzycą typu I, 46 z otyłością, 31 z przewlekłą chorobą nerek, a 44 dzieci leczonych było z powodu chorób nowotworowych. Spośród dzieci z chorobami nowotworowymi 23 dzieci miało ostrą białaczkę limfoblastyczną, 10 dzieci nowotwory ośrodkowego układu nerwowego, 6 nowotwory tkanek miękkich a 5 miało inne nowotwory. Choroby zdefiniowano zgodnie z Międzynarodową Statystyczną Klasyfikacją Chorób i Problemów Zdrowotnych, ICD-10. We wszystkich surowicach wykonano oznaczenie stężenia cholesterolu całkowitego (TC), triglicerydów (TG), cholesterolu frakcji HDL (HDLC), cholesterolu frakcji LDL (LDLC) i apoproteiny B (apoB). Wszystkie oznaczenia przeprowadzono w Zakładzie Biochemii Klinicznej Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego w Krakowie w okresie od maja 2012 do września 2015 roku. Na wykonanie pracy otrzymano zgodę Komisji Bioetycznej nr KBET/125/B/2012.

3.2 Metodyka oznaczeń

Oznaczenie stężenia TC, TG i HDLC wykonano metodą enzymatyczną przy wykorzystaniu suchej chemii na analizatorze Vitros 5.1 FS (Ortho-Clinical Diagnostics, United Kindom). W metodzie suchej chemii odczynniki umieszczone są na stałym podłożu a surowica nakładana jest na warstwę rozpraszającą slajdu skąd, dzięki wykorzystaniu sił kapilarnych przechodzi do warstwy odczynnikowej. W tej warstwie zachodzi reakcja pomiędzy analitem a odpowiednimi odczynnikami dając barwny

produkt reakcji. Oznaczenie stężenia cholesterolu frakcji LDL wykonano metodą enzymatyczną a apoproteiny B metodą immunochemiczną na analizatorze Vitros 5.1 FS (Ortho-Clinical Diagnostics, United Kindom). Pomiar końcowego produktu reakcji w każdym przypadku dokonywany był reflektometrycznie przy stałej temperaturze 37°C i odpowiedniej długości fali zależnej od mierzonego analitu [78]. Laboratorium, w którym przeprowadzone zostały oznaczenia uczestniczy w międzynarodowym programie kontroli jakości RFB (Reference Institute for Bioanalytics).

3.2.1 Metodyka oznaczania cholesterolu całkowitego

Oznaczenie stężenia cholesterolu całkowitego poprzedzone było uwolnieniem cholesterolu i estrów cholesterolu z lipoprotein przy udziale Triton X-100 (TX 100; 0,81 mg) obecnego w warstwie rozpraszającej. Następnie w warstwie odczynnikowej w obecności hydroksylazy (*Pseudomonas* E.C.3.1.1.13; 2,0 U) estry cholesterolu ulegały hydrolizie do cholesterolu a powstały wolny cholesterol pod wpływem oksydazy cholesterolu (*Nocardia* lub *Cellulomonas* E.C.1.1.3.6; 0,4 U) tworzył cholestenon i nadtlenek wodoru (H₂O₂). Ostatnim etapem reakcji było utlenienie bezbarwnego prekursora barwnika (2-(3,5-dimetoksy-4-hydroksyfenylo)-4,5-bis-(4-dimetyloaminofenylo)-imidazol; 0,17 mg) w obecności peroksydazy chrzanowej (E.C.1.11.1.7; 5,3 U) do barwnego produktu. Intensywność zabarwienia mierzona była przy długości fali 540 nm [79].

3.2.2 Metodyka oznaczania triglicerydów

Oznaczenie stężenia triglicerydów poprzedzone było uwolnieniem triglicerydów z lipoprotein przy udziale Triton X-100 (TX 100; 0,81 mg) obecnego w warstwie rozpraszającej. Następnie w warstwie odczynnikowej w obecności lipazy (*Candida rugosa* E.C.3.1.1.3; 0,15 U) triglicerydy ulegały hydrolizie do glicerolu i kwasów tłuszczowych a powstały glicerol w obecności kinazy glicerolowej (*Cellulomonas* sp. E.C.2.7.1.30; 0,35U) i ATP (trójfosforan adenozyiny; 0,14 mg) ulegał reakcji fosforylacji do L- α -glicerofosforanu. W kolejnym etapie reakcji L- α -glicerofosforan podlegał utlenieniu do fosforanu dihydroksyacetonu i nadtlenku wodoru (H₂O₂) pod wpływem oksydazy L- α -glicerofosforanu (*Pediococcus* sp.

E.C.1.1.3.-; 0,19 U). Ostatnim etapem reakcji było utlenienie bezbarwnego prekursora barwnika (2-(3,5-dimetoksy-4-hydroksyfenylo)-4,5-bis-(4-dimetyloaminofenylo)-imidazol; 0,04 mg) w obecności peroksydazy chrzanowej (E.C.1.11.1.7; 0,52 U) do barwnego produktu. Intensywność zabarwienia mierzona była przy długości fali 540 nm [80].

3.2.3 Metoda oznaczania cholesterolu frakcji HDL

Oznaczanie stężenia cholesterolu frakcji HDL poprzedzone było precypitacją lipoprotein nie-HDL przy udziale kwasu wolframianofosforanowego (PTA; 0,3 mg) i chlorku magnezu (0,2 mg) obecnych w warstwie rozpraszającej. W warstwie odczynnikowej z lipoprotein HDL uwalniany był cholesterol i estry cholesterolu pod wpływem Emulgen B-66 (0,2 mg). Estrы cholesterolu ulegały hydrolizie do cholesterolu w obecności hydrolazy (*Candida rugosa* E.C.3.1.1.3; 1,2 U). Powstały cholesterol pod wpływem oksydazy (*Cellulomonas* E.C.1.1.3.6; 0,8 U) był utleniany do cholestenonu i nadtlenku wodoru (H₂O₂). Ostatnim etapem reakcji było utlenienie bezbarwnego prekursora barwnika (2-(3,5-dimetoksy-4-hydroksyfenylo)-4,5-bis-(4-dimetyloaminofenylo)-imidazol; 0,22 mg) w obecności peroksydazy chrzanowej (E.C.1.11.1.7; 2,2 U) do barwnego produktu. Intensywność zabarwienia mierzona była przy długości fali 670 nm [81].

3.2.4 Metoda oznaczania cholesterolu frakcji LDL

Oznaczanie stężenia cholesterolu frakcji LDL zostało wykonane za pomocą dwuetapowej reakcji enzymatycznej. W pierwszym etapie pod wpływem esterazy cholesterolu (*Pseudomonas* sp. EC 3.1.1.13; 600 U/L) z lipoprotein VLDL, chylomikronów, HDL uwalniany był cholesterol. Z wolnego cholesterolu w obecności oksydazy cholesterolu (*Drobnoustrojowa* EC 1.1.3.6500 U/L) powstawał cholestenon oraz nadtlenek wodoru. Nadtlenek wodoru był eliminowany przez katalazę (*Corynebacterium glutamicum* E.C.1.11.1.6; 1 200 000 U/L). W drugim etapie po dezaktywacji katalazy azydkiem sodu (0,05%) z lipoprotein LDL za pomocą surfaktantu (związek polioksoetylenowy; 0,3%) uwolnione były estrы cholesterolu i wolny cholesterol. Następnie z estrów cholesterolu i cholesterolu w obecności esterazy cholesterolowej i oksydazy cholesterolu, powstawał cholestenon i nadtlenku wodoru.

Nadtlenek wodoru reagował z TOOS (N-etylo-N-[2-hydroksy-3-sulfopropylowa]-3-metyloaniliny; 2,0 mM) i 4-aminoantypiryną (4,0 mM) tworząc barwnik chinonowy. Intensywność zabarwienia mierzona była przy długości fali 540 nm [82].

3.2.5 Metoda oznaczania apoproteiny B

Oznaczenie stężenia apoproteiny B zostało wykonane za pomocą dwuetapowej reakcji immunochemicznej. W pierwszym etapie reakcji rozcieńczano surowicę roztworami soli oraz mieszano z odczynnikiem zawierającym surfaktant i polimer. W drugim etapie reakcji dodawany był odczynnik zawierający przeciwciała monoklonalne przeciw cząstkom apoproteiny B (kozia surowica odpornościowa przeciw ludzkiej apoproteinie B) i powstawały kompleksy antygen-przeciwciało (apoB—anty-apoB). Wielkość zmętnienia roztworu była proporcjonalna do ilości powstałych kompleksów antygen-przeciwciało i do stężenia apoB w analizowanej próbce. Pomiar wykonywany był przy długości fali 340 nm [83].

Oznaczenia stężenia mocznika, kreatyniny, białka całkowitego, glukozy, kwasu moczowego oraz stężenie HbA1c wykonywane było rutynowo na analizatorze Vitros 5.1 FS (Firma Ortho-Clinical Diagnostics, United Kindom) z zastosowaniem odczynników i kalibratorów firmy Johnson & Johnson Clinical Diagnostics Rochester, USA.

3.3 Oszacowanie stężenia cholesterolu frakcji LDL

Do oszacowania stężenia cholesterolu frakcji LDL (LDLC) wykorzystano wzory: Friedewalda (LDLC_F) [57], Cordova (LDLC_C) [63] i Planelli (LDLC_P) [58].

Wzór Friedewalda:

$$\text{LDLC}_F[\text{mmol/l}] = \text{TC} [\text{mmol/l}] - \text{TG} [\text{mmol/l}]/2,2 - \text{HDL} [\text{mmol/l}]$$

Wzór Cordova:

$$\text{LDLC}_C[\text{mmol/l}] = \frac{3}{4} * (\text{TC} [\text{mmol/l}] - \text{HDL} [\text{mmol/l}])$$

Wzór Planelli:

$$\text{LDLC}_P[\text{mmol/l}] = 0,41 * \text{TC}[\text{mmol/l}] - 0,32 * \text{TG}[\text{mmol/l}] + 1,7 * \text{apoB}[\text{g/l}] - 0,27$$

3.4. Ocena oszacowanego stężenia LDLC

Wyniki stężenia LDLC obliczonych za pomocą wzoru Friedewalda ($LDLC_F$), wzoru Cordova ($LDLC_C$) i wzoru Planelli ($LDLC_P$) porównano z wartościami stężeń LDLC oznaczonych metodą enzymatyczną ($LDLC_D$) w zależności od wieku dzieci od którego pochodziła surowica (< 1 roku życia i ≥ 1 roku życia) oraz w zależności od jednostki chorobowej dziecka od którego pochodziła surowica (cukrzyca typu I, otyłość, przewlekła choroba nerek i choroby nowotworowe).

Analizę porównawczą przeprowadzono także dla wszystkich surowic w zależności od stężenia $LDLC_D$ (< 2.0 mmol/l i ≥ 2.0 mmol/l), stężenia triglicerydów (< 0.9 mmol/l, $\geq 0.9 - < 3.0$ mmol/l i ≥ 3.0 mmol/l), glukozy (< 5.6 mmol/l i ≥ 5.6 mmol/l) i HbA1c (< 6.0 % i ≥ 6.0 %), kreatyniny (< 74.0 μ mol/l i ≥ 74.0 μ mol/l), mocznika (< 6.0 mmol/l i ≥ 6.0 mmol/l), kwasu moczowego (< 300.0 μ mol/l i ≥ 300.0 μ mol/l), białka całkowitego (< 60.0 g/l i ≥ 60.0 g/l). Wybór powyższych przedziałów stężeń wynikał z danych piśmiennictwa: mocznik [84], kwas moczowy [84], glukoza [85], białko całkowite [86], HbA1c [84] lub z założeń a priori: triglicerydy, kreatynina i cholesterol frakcji LDL.

W tabeli II przedstawiono charakterystykę zebranych próbek w zależności od wieku pacjenta, zdiagnozowanej jednostki chorobowej i analizowanych parametrów biochemicznych z uwzględnieniem średnich wartości stężeń: cholesterolu całkowitego, triglicerydów, apoproteiny B oraz cholesterolu frakcji HDL i LDL.

Tabela II. Średnie±(SD) wartości i zakres stężenia cholesterolu całkowitego (TC), triglicerydów (TG), cholesterolu frakcji HDL (HDLc), cholesterolu frakcji LDL (LDL_D) i apoproteiny B (apoB) w zależności od wieku dziecka, jednostki chorobowej i składu matrycy.

	Wiek		Diagnoza			
	< 1 r.ż.	≥ 1 r.ż.	cukrzyca typu I	otyłość	przewlekła choroba nerek	choroby nowotworowe
N	175	419	92	46	31	44
Średnia±SD						
Zakres						
TC [mmol/l]	3,70±1,19 1,29-7,95	4,09±1,03 1,60-7,29	4,07±1,11 1,65-6,91	4,43±0,79 2,80-6,45	4,12±1,01 2,44-6,69	3,75±0,80 1,60-5,48
TG [mmol/l]	1,67±0,85 0,53-4,23	1,56±0,72 0,29-4,25	1,07±0,64 0,29-3,51	1,69±0,73 0,74-3,78	1,58±0,61 0,61-2,89	1,47±0,76 0,54-4,25
HDLc [mmol/l]	1,04±0,48 0,22-3,16	1,22±0,39 0,22-2,66	1,37±0,44 0,52-2,66	1,12±0,22 0,61-1,53	1,15±0,33 0,50-1,90	1,20±0,42 0,22-2,11
LDL_D [mmol/l]	2,05±0,92 0,78-4,96	2,49±0,88 0,78-5,44	2,23±0,74 0,81-4,51	2,99±0,75 1,71-4,87	1,94±0,55 0,99-2,93	2,52±0,76 0,78-4,12
apoB [g/l]	82,3±28,61 36,5-187,3	84,9±25,77 35,0-182,0	79,55±27,00 35,0-164,12	88,3±20,81 48,0-134,9	82,6±18,25 44,4-118,7	81,5±20,75 39,9-123,0
	Wszystkie surowice	LDL_D [mmol/l]		Triglicerydy [mmol/l]		
	-	< 2,0	≥ 2,0	< 0,9	0,9-3,0	≥3,0
N	594	227	367	157	405	32
Średnia±SD						
Zakres						
TC [mmol/l]	3,97±1,09 1,29-7,95	3,10±0,81 1,29-5,50	4,51±0,87 2,76-7,95	3,62±0,98 1,65-6,91	4,04±1,09 1,29-7,95	4,79±1,15 2,51-7,46
TG [mmol/l]	1,45±0,78 0,29-4,25	1,29±0,72 0,29-3,98	1,55±0,79 0,39-4,25	0,68±0,13 0,29-0,89	1,58±0,53 0,90-2,96	3,55±0,33 3,02-4,25
HDLc [mmol/l]	1,16±0,43 0,22-3,16	1,03±0,44 0,22-2,37	1,25±0,40 0,29-3,16	1,31±0,43 0,40-2,66	1,12±0,42 0,22-3,16	1,02±0,44 0,37-2,42
LDL_D [mmol/l]	2,36±0,91 0,78-5,44	1,48±0,35 0,78-1,99	2,90±0,71 2,00-5,44	2,07±0,75 0,78-4,11	2,43±0,92 0,78-5,36	2,85±1,07 1,03-5,44
apoB [g/l]	84,16±26,64 35,0-187,3	63,63±15,58 35,0-121,14	96,85±30,35 56,14-187,29	72,9±22,00 35,0-182,0	86,7±26,21 35,0-187,3	107,3±30,35 60,9-179,8
	Glukoza [mmol/l]		Hemoglobina A1c [%]		Kreatynina [umol/l]	
	<5,6	≥5,6	<6,0	≥6,0	<74,0	≥74,0
N	207	145	44	90	317	100
Średnia±SD						
Zakres						
TC [mmol/l]	4,05±1,06 1,60-7,16	3,84±1,12 1,65-7,95	4,09±0,93 2,29-6,45	4,07±1,12 1,65-6,91	3,94±1,11 1,60-7,95	4,01±1,13 1,29-7,46
TG [mmol/l]	1,42±0,71 0,39-4,03	1,28±0,06 0,29-3,93	1,18±0,52 0,39-2,56	1,04±0,64 0,29-3,51	1,43±0,75 0,38-4,25	1,88±0,78 0,56-3,93
HDLc [mmol/l]	1,16±0,42 0,29-2,66	1,21±0,49 0,22-3,16	1,23±0,27 0,82-1,90	1,38±0,47 0,52-2,66	1,12±0,42 0,22-3,16	1,13±0,43 0,22-2,42
LDL_D [mmol/l]	2,43±0,93 0,78-5,29	2,40±0,81 0,81-5,11	2,59±0,77 1,29-4,54	2,24±0,74 0,81-4,51	2,46±0,96 0,78-5,36	2,07±0,81 0,78-5,44
apoB [g/l]	86,8±27,14 36,5-187,2	79,4±26,18 35,0-182,0	82,5±23,00 36,7-144,8	81,4±28,86 35,0-182,0	85,1±27,42 35,0-187,3	86,5±23,66 40,4-189,8

Tabela II (ciąg dalszy). Średnie±(SD) wartości i zakres stężenia cholesterolu całkowitego (TC), triglicerydów (TG), cholesterolu frakcji HDL (HDLc), cholesterolu frakcji LDL (LDL_D) i apoproteiny B (apoB) w zależności od wieku dziecka, jednostki chorobowej i składu matrycy.

	Mocznik [mmol/l]		Kwas moczowy [umol/l]		Białko całkowite [g/l]	
	<6,0	≥6,0	<300,0	≥300,0	<60,0	≥60,0
N	230	195	85	101	121	151
	Średnia±SD					
	Zakres					
TC [mmol/l]	3,97±1,04 1,60-7,95	4,01±1,15 1,69-7,46	4,08±0,84 2,28-6,05	4,41±1,13 1,79-7,46	3,74±1,12 1,29-7,46	4,03±1,04 1,60-7,29
TG [mmol/l]	1,36±0,71 0,39-4,03	1,75±0,85 0,44-4,25	1,28±0,71 0,39-4,03	1,66±0,70 0,56-3,78	1,65±0,78 0,53-4,25	1,38±0,71 0,39-3,78
HDLc [mmol/l]	1,15±0,39 0,22-3,16	1,10±0,45 0,22-2,42	1,20±0,33 0,52-2,27	1,19±0,32 0,49-2,25	1,07±0,45 0,22-2,43	1,21±0,37 0,22-2,36
LDL_D [mmol/l]	2,54±0,96 0,78-5,44	2,21±0,88 0,78-5,19	2,61±0,82 0,78-5,29	2,71±0,96 0,78-5,44	2,11±0,86 0,78-4,33	2,65±0,93 0,78-5,44
apoB [g/l]	84,5±24,61 36,5-181,9	87,4±24,48 35,0-187,3	85,6±20,46 60,6-137,8	92,2±26,26 40,4-179,8	85,4±28,65 36,5-187,3	89,8±27,91 40,0-181,9

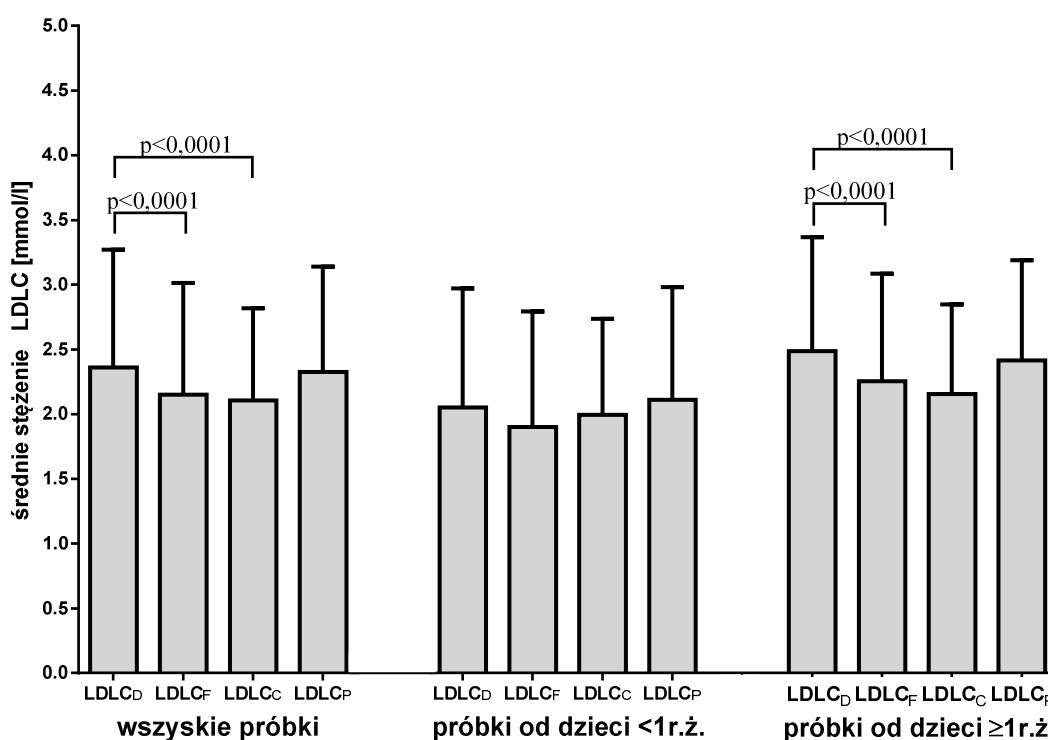
3.5 Analiza statystyczna

Do oceny statystycznej wykorzystano statystyki opisowe (średnia arytmetyczna oraz odchylenie standardowe (SD)). W celu porównania wartości stężeń LDLc wyliczonych za pomocą wzoru Friedewalda, wzoru Cordova i wzoru Planelli z wartościami stężeń LDL_D wykorzystano współczynnik korelacji Pearsona, metodę Passing-Bablok oraz analizę Blanda-Altmana (B-A). Do porównania średnich wartości stężeń zastosowano analizę wariancji z testem post-hock Tukey dla tych samych N. Natomiast do porównania średnich wartości różnic zastosowano analizę wariancji z testem post-hock Tukey dla różnych N lub test t-studenta. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programów Statistica 7.0 (StatSoft), Microsoft Excel 2007, GraphPad Prisma 5 oraz MedCalc (Statistical Software). Oceniono rozkład zmiennych ciągłych pod kątem jego zgodności z rozkładem normalnym przy zastosowaniu testu Shapiro-Wilk'a. Wartość $p < 0,05$ przyjęto za statystycznie znaczącą.

4. Wyniki

4.1 Porównywalność oszacowanych stężeń cholesterolu frakcji LDL ($LDLC_F$, $LDLC_C$ i $LDLC_P$) ze stężeniem $LDLC_D$

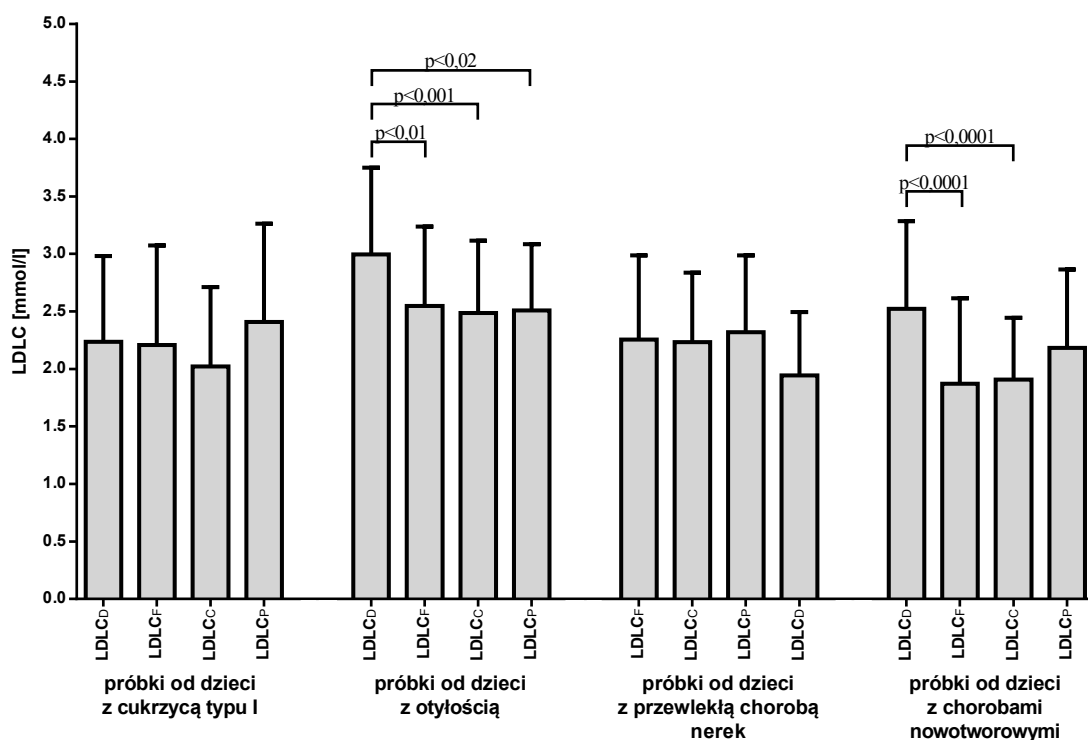
Analizując wszystkie próbki stwierdzono istotną statystycznie różnicę pomiędzy $LDLC_F$ a $LDLC_D$ ($p < 0,0001$), $LDLC_C$ a $LDLC_D$ ($p < 0,0001$) i brak istotnych różnic pomiędzy $LDLC_P$ a $LDLC_D$. Obserwowano różnice były podobne gdy porównano stężenia LDLC dla próbek pobranych od dzieci powyżej pierwszego roku życia, natomiast dla próbek pobranych od dzieci poniżej pierwszego roku życia nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy $LDLC_D$ a wartościami LDLC oszacowanymi ze wzorów (ryc.1).



Rycina 1. Średnie (\pm SD) wartości stężeń cholesterolu frakcji LDL oznaczonego metodą bezpośrednią ($LDLC_D$) i oszacowanego za pomocą wzoru Friedewalda ($LDLC_F$), wzoru Cordova ($LDLC_C$) i wzoru Planelli ($LDLC_P$) dla wszystkich próbek oraz dla próbek pobranych od dzieci poniżej i powyżej jednego roku życia.

Dla próbek pochodzących od dzieci z cukrzycą typu I i dzieci z przewlekłą chorobą nerek nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy średnią wartością $LDLC_D$ a wartościami średnimi LDLC oszacowanymi ze wzorów (ryc.2).

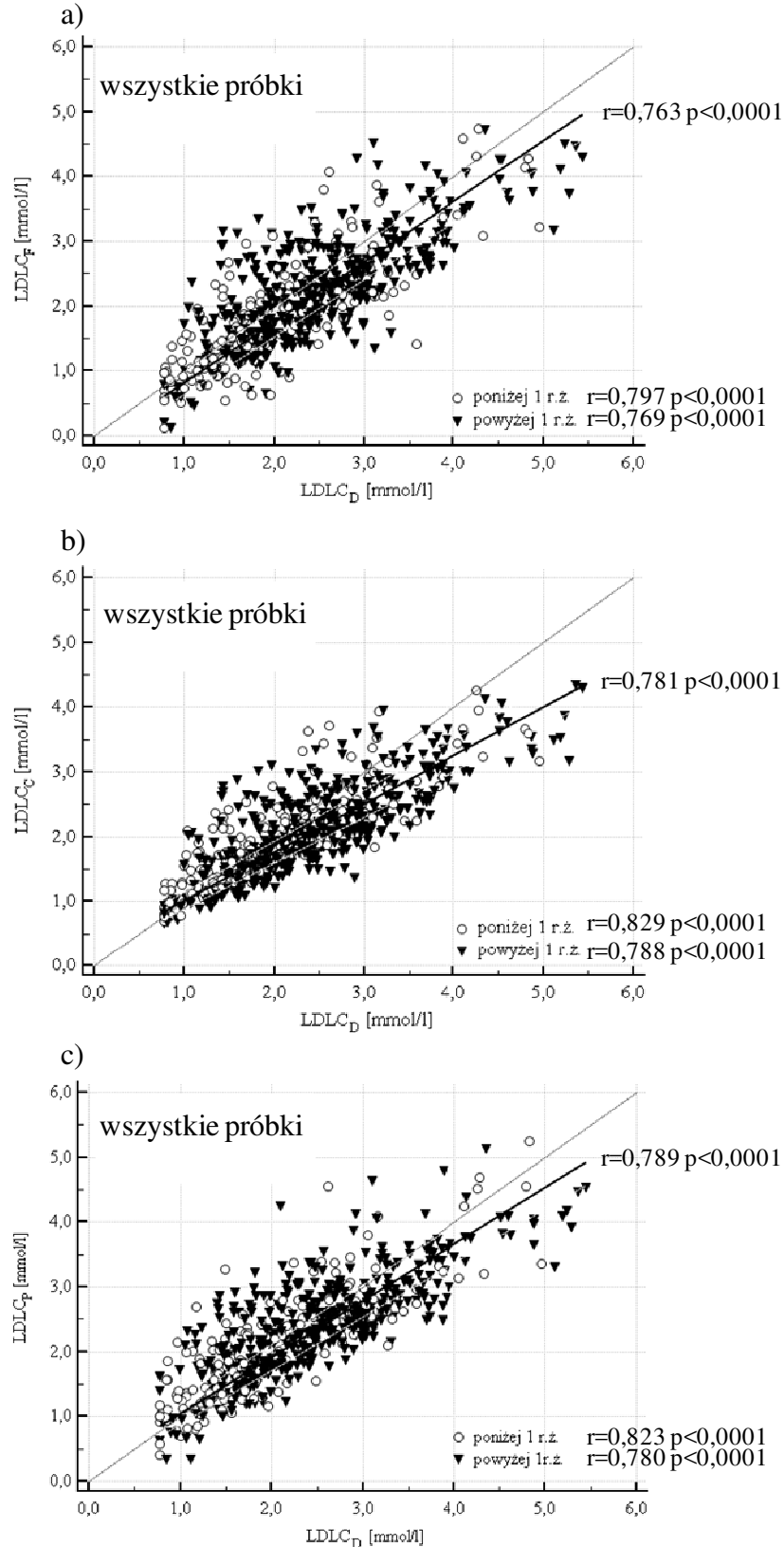
W przeciwieństwie do tego stwierdzono istotne statystycznie różnice pomiędzy $LDLC_D$ a $LDLC_F$, $LDLC_D$ a $LDLC_C$ dla próbek pobranych od dzieci z otyłością i chorobami nowotworowymi ($p < 0,01-0,0001$) i dodatkowo dla próbek od dzieci otyłych także pomiędzy $LDLC_D$ a $LDLC_P$ ($p < 0,02$)(ryc.2).



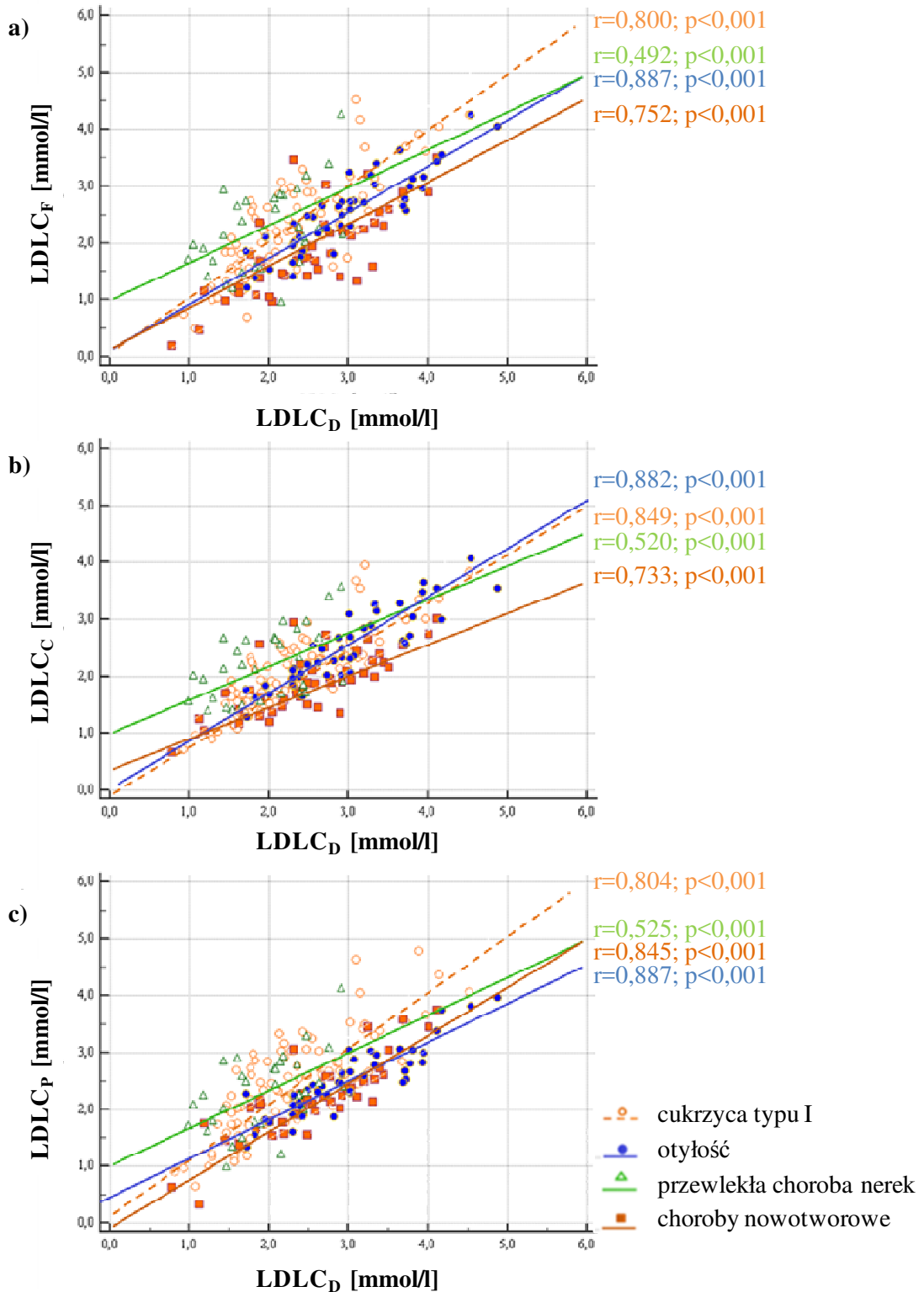
Rycina 2. Średnie (\pm SD) wartości stężeń cholesterolu frakcji LDL oznaczonego metodą bezpośrednią ($LDLC_D$) i oszacowanego za pomocą wzoru Friedewalda ($LDLC_F$), wzoru Cordova ($LDLC_C$) i wzoru Planelli ($LDLC_P$) dla próbek pobranych od dzieci cukrzycą typu I, dzieci z otyłością, dzieci z przewlekłą chorobą nerek i dzieci z chorobami nowotworowymi.

Na ryc.3 przedstawiono zależność pomiędzy stężeniem $LDLC_F$, $LDLC_C$, $LDLC_P$ a stężeniem $LDLC_D$ dla wszystkich próbek oraz dla próbek od dzieci poniżej i powyżej pierwszego roku życia. W każdym przypadku uzyskano wysokie współczynniki korelacji: dla wszystkich próbek odpowiednio $r=0,763$, $r=0,781$ i $r=0,789$, dla próbek od dzieci poniżej pierwszego roku życia $r=0,797$, $r=0,829$ i $r=0,823$ oraz dla próbek od dzieci powyżej pierwszego roku życia $r=0,769$, $r=0,788$ i $r=0,780$ (we wszystkich przypadkach $p < 0,001$). Podobne wartości współczynników korelacji obserwowano dla stężeń uzyskanych w próbkach pochodzących od dzieci z cukrzycą, otyłością

i chorobami nowotworowymi (ryc.4). Natomiast dla stężeń uzyskanych w próbkach pochodzących od dzieci z przewlekłą chorobą nerek współczynniki korelacji były znacznie niższe i wynosiły odpowiednio $r=0,492$, $r=0,520$, $r=0,525$ (we wszystkich przypadkach $p<0,001$) (ryc.4). Analiza regresji metodą Passing-Bablok wykazała brak istotnych statystycznie różnic pomiędzy wartościami stężenia LDLC oszacowanymi ze wzorów a wartościami stężenia LDLC_D dla wszystkich próbek.

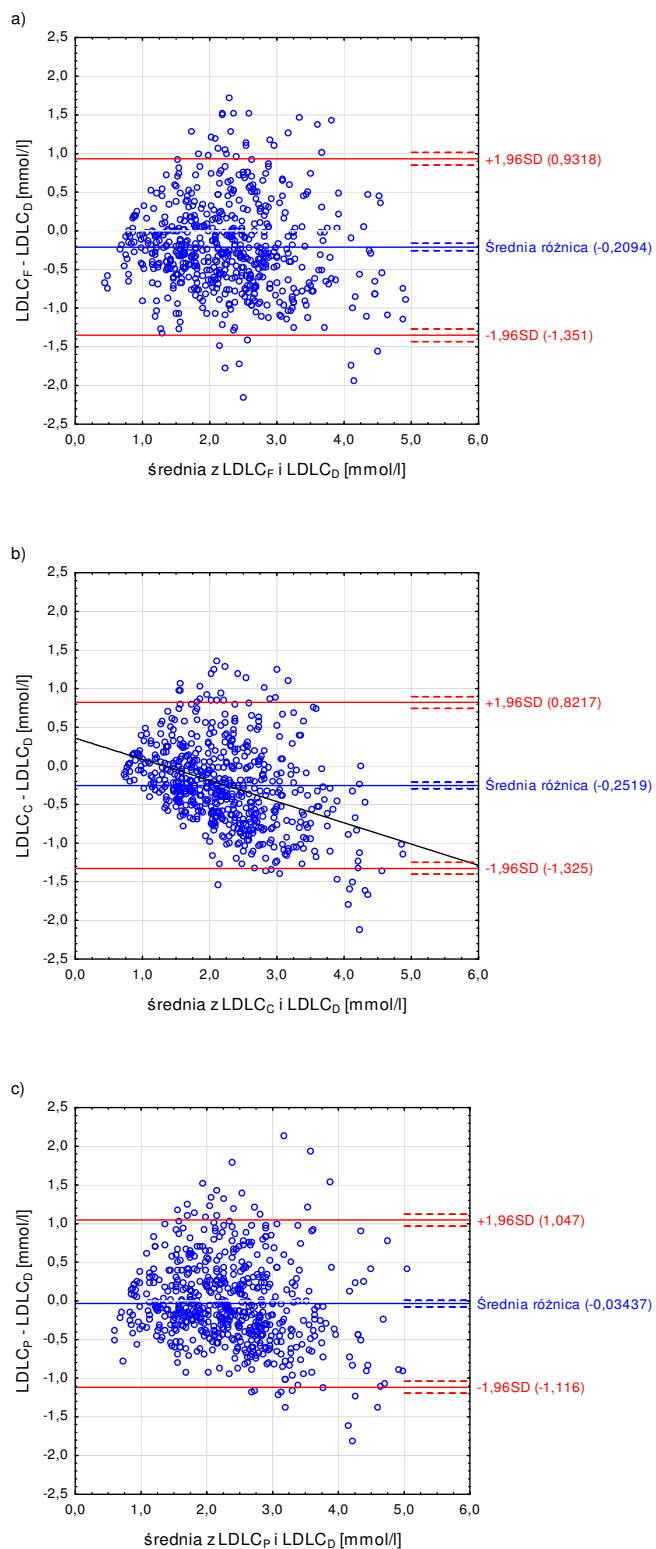


Rycina 3. Zależność pomiędzy stężeniem LDLC oszacowanym ze wzorów: a) Friedewalda, b) Cordova i c) Planelli a wartościami stężeń LDLC oznaczonymi metodą bezpośrednią dla wszystkich próbek oraz dla próbek od dzieci poniżej i powyżej pierwszego roku życia.



Rycina 4. Zależność pomiędzy stężeniem LDLC oszacowanym ze wzorów: a) Friedewalda, b) Cordova i c) Planelli a wartościami stężeń LDLC oznaczonych metodą bezpośrednią dla próbek pochodzących od dzieci cukrzycą typu I, otyłością, przewlekłą chorobą nerek i chorobami nowotworowymi.

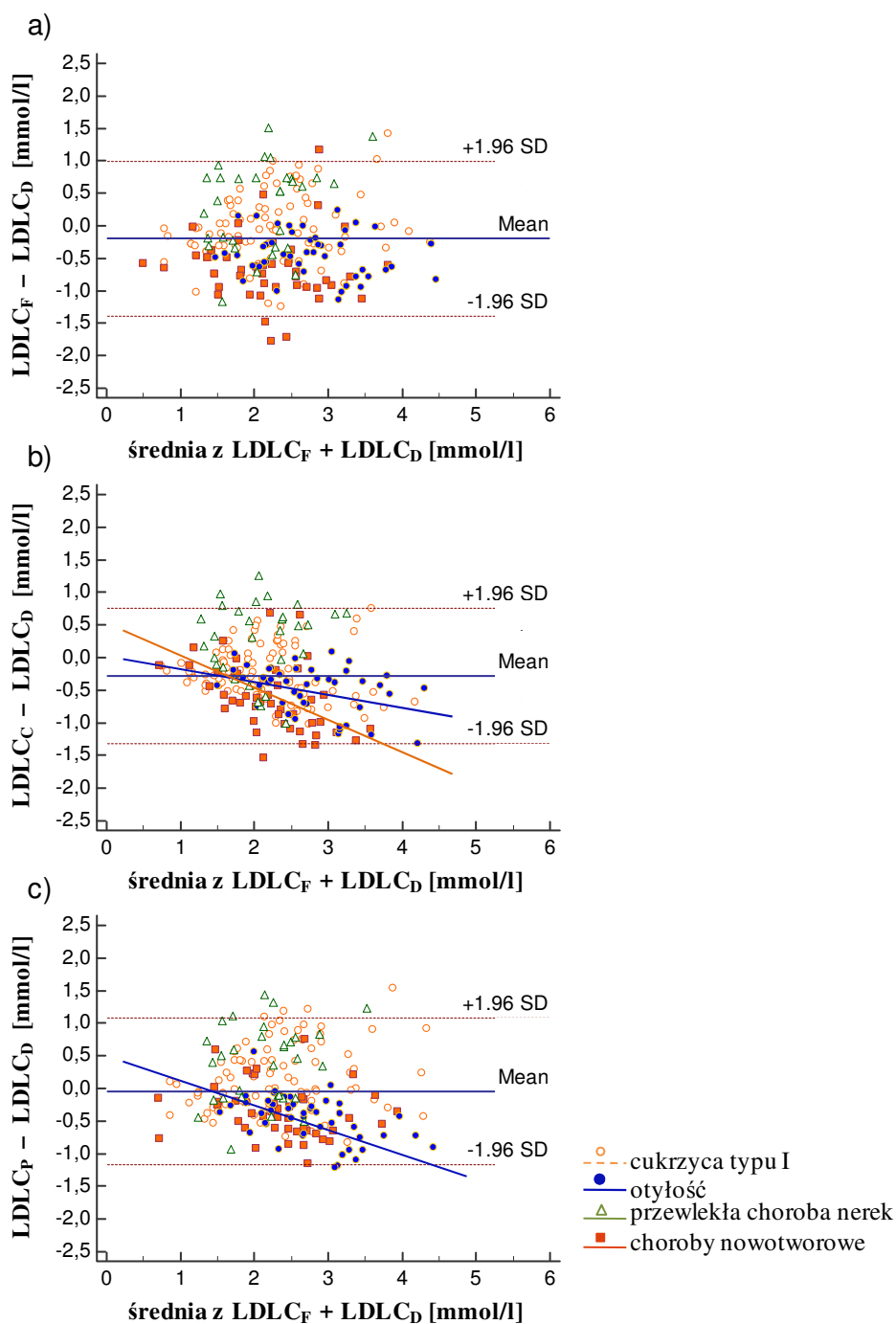
Metodą Blanda-Altmana porównano zgodność wyników stężeń LDLC oszacowanych za pomocą wzorów Friedewalda, Cordova i Planelli z wartościami stężeń oznaczonymi metodą bezpośrednią. Oszacowane stężenia były niższe od stężeń oznaczonych metodą bezpośrednią średnio o 0,21 mmol/l (95% CI: -1,35; 0,93) dla wzoru Friedewalda, średnio o 0,25 mmol/l (95% CI: -1,32; 0,82) dla wzoru Cordova i średnio o 0,03 mmol/l (95% CI: -1,12; 1,05) dla wzoru Planelli. Stwierdzono istotną ujemną korelację pomiędzy $(LDLC_C - LDLC_D)$ a $((LDLC_D + LDLC_C)/2)$ ($r=-0,386$; $p<0,0001$) (ryc.5b). Oznacza to, że stężenia $LDLC_C$ nie były porównywalne ze stężeniami $LDLC_D$ w analizowanym zakresie stężeń dla LDLC. Natomiast nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności pomiędzy $(LDLC_F - LDLC_D)$ a $((LDLC_D + LDLC_F)/2)$ oraz pomiędzy $(LDLC_P - LDLC_D)$ a $((LDLC_D + LDLC_P)/2)$ (ryc.5a,c). Oznacza to, że stężenia $LDLC_F$ i $LDLC_P$ były porównywalne ze stężeniami $LDLC_D$ w analizowanym zakresie stężeń dla LDLC.



Rycina 5. Porównanie wartości LDLC oszacowanych ze wzorów: a) Fridewalda, b) Cordova, c) Planelli z wartościami LDLC oznaczonymi metodą bezpośrednią dla wyników uzyskanych we wszystkich próbkach z wykorzystaniem metody Blanda-Altmana. Linia niebieska oznacza średnią, linie czerwone oznaczają zakres zgodności (średnia różnica \pm 1,96SD) a linia czarna oznacza linie trendu.

Metodą Blanda-Altmana porównano również zgodność wyników stężeń LDLC oszacowanych za pomocą trzech wzorów z wartościami stężeń LDLC_D dla wyników uzyskanych od dzieci z różnymi jednostkami chorobowymi. Zarówno dla próbek pochodzących od dzieci z otyłością jak i dla próbek od dzieci z chorobami nowotworowymi stężenia LDLC oszacowane ze wzoru Friedewalda, wzoru Cordova i wzoru Planelli były niższe od stężeń LDLC_D średnio o 0,44 mmol/l (95% CI: -1,13; 0,24), średnio o 0,51 mmol/l (95% CI: -1,21; 0,19) i średnio o 0,48 mmol/l (95% CI: -1,19; 0,22) dla próbek od dzieci z otyłością oraz średnio o 0,65 mmol/l (95% CI: -1,69; 0,39), średnio o 0,61 mmol/l (95% CI: -1,63; 0,40) i średnio o 0,34 mmol/l (95% CI: -0,99; 1,61) dla próbek od dzieci z chorobami nowotworowymi. Dla próbek pochodzących od dzieci z cukrzycą typu I jedynie wyniki stężeń LDLC_F i LDLC_C były niższe od wyników stężeń LDLC_D odpowiednio: średnio o 0,03 mmol/l (95% CI: -1,05; 1,00) i średnio o 0,21 mmol/l (95% CI: -0,99; 0,57) a wyniki stężeń LDLC_P były wyższe od wyników stężeń LDLC_D średnio o 0,17 mmol/l (95% CI: -0,83; 1,18). Natomiast dla próbek pochodzących od dzieci z przewlekłą chorobą nerek wyniki stężeń LDLC_F, LDLC_C i LDLC_P były wyższe od wyników stężeń LDLC_D średnio o 0,31 mmol/l (95% CI: -0,99; 1,61), średnio o 0,29 mmol/l (95% CI: -0,82; 1,40) i średnio o 0,37 mmol/l (95% CI: -0,81; 1,55).

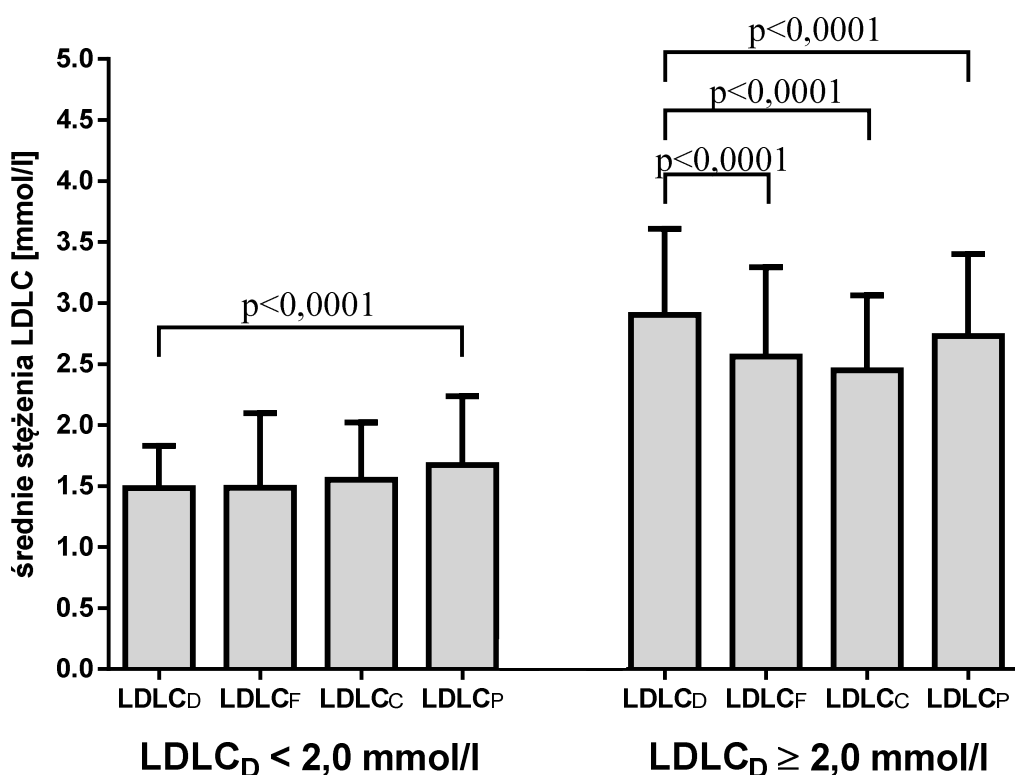
Dla próbek pobranych od dzieci z otyłością i dla próbek pobranych od dzieci z chorobami nowotworowymi stwierdzono także istotną statystycznie ujemną zależność pomiędzy (LDLC_C - LDLC_D) a ((LDLC_C + LDLC_D)/2) (odpowiednio $r=-0,336$ $p<0,01$; $r=-0,465$ $p<0,001$) (ryc.6b). Dodatkowo wykazano istotną zależność pomiędzy (LDLC_P - LDLC_D) a ((LDLC_P + LDLC_D)/2) dla próbkach pochodzących od dzieci z otyłością ($r=-0,515$ $p<0,001$) (ryc.6c). Oznacza to, że stężenia LDLC_C nie były porównywalne z wartościami stężeń LDLC_D dla próbek pochodzących od dzieci z otyłością i dzieci z chorobami nowotworowymi. Ponadto dla próbek pochodzących od dzieci z otyłością wykazano brak porównywalności wyników stężeń LDLC_P z wartościami stężeń LDLC_D.



Rycina 6. Porównanie wartości LDLC oszacowanych ze wzorów: a) Fridewalda, b) Cordova, c) Planelli z wartościami LDLC oznaczonymi metodą bezpośrednią dla próbek pochodzących od dzieci z zdiagnozowaną cukrzycą typu I, otyłością, przewlekłą chorobą nerek i z chorobami nowotworowymi z wykorzystaniem metody Blanda-Altmana. Linia pozioma ciągła oznacza średnią, linie poziome przerywane oznaczają zakres zgodności (średnia różnica $\pm 1,96SD$) a linie ukośne oznaczają linie trendu.

4.2 Porównywalność stężenia $LDLC_F$, $LDLC_C$ i $LDLC_P$ ze stężeniem $LDLC_D$ dla wartości $LDLC_D < 2,0$ mmol/l i $\geq 2,0$ mmol/l.

Dla stężeń $LDLC_D$ poniżej 2,0 mmol/l stwierdzono istotną różnicę tylkopomiędzy $LDLC_P$ a $LDLC_D$ ($p < 0,0001$) (ryc.7). Natomiast dla stężeń $LDLC_D$ powyżej 2,0 mmol/l znamienne statystycznie różnice wykazano pomiędzy średnimi wartościami $LDLC_F$ a $LDLC_D$, $LDLC_C$ a $LDLC_D$ i $LDLC_P$ a $LDLC_D$ (we wszystkich przypadkach $p < 0,0001$) (ryc.7).

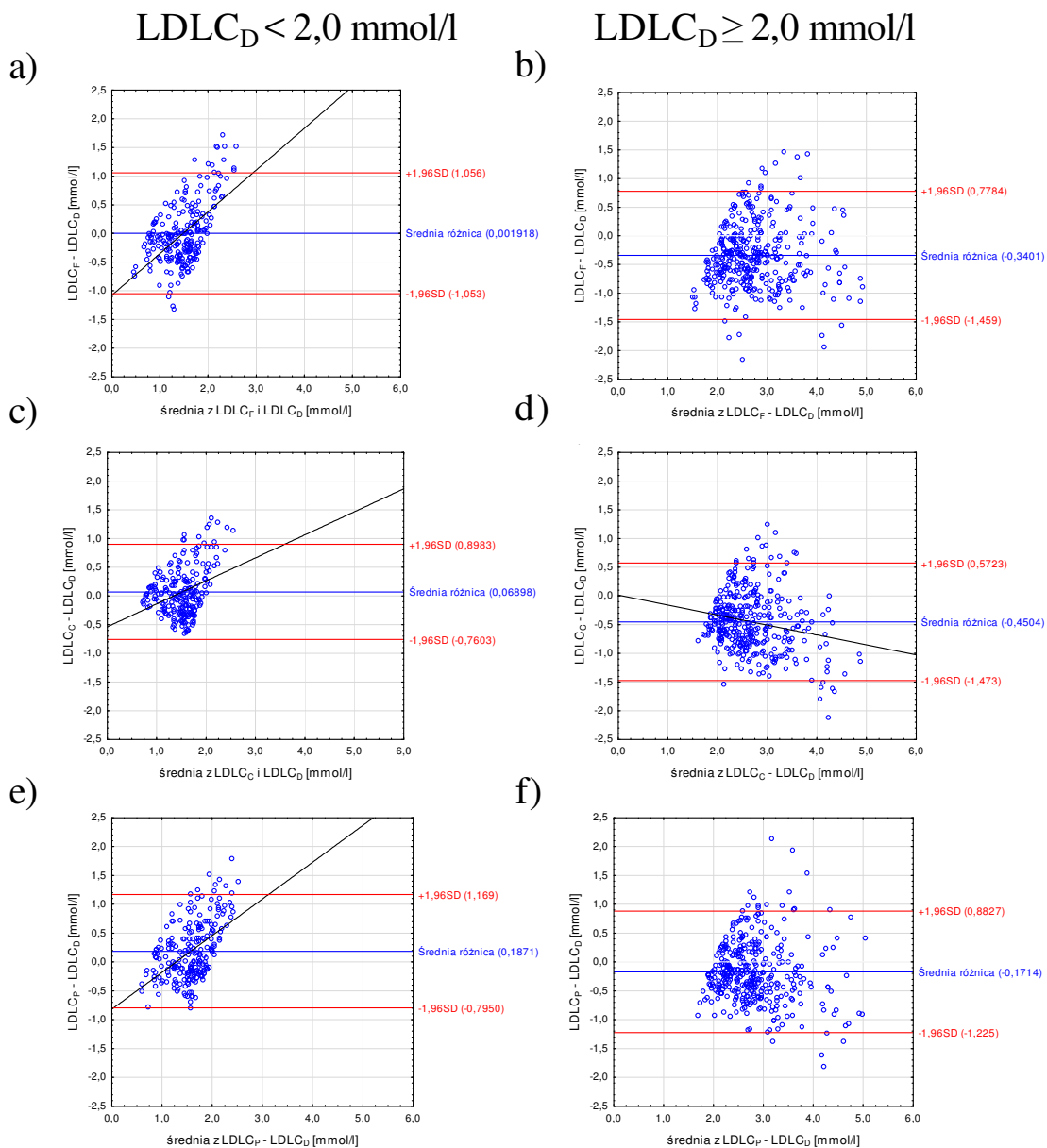


Rycina 7. Średnie (\pm SD) wartości stężeń cholesterolu frakcji LDL oznaczonego metodą bezpośrednią ($LDLC_D$) i oszacowanego za pomocą wzoru Friedewalda ($LDLC_F$), wzoru Cordova ($LDLC_C$) i wzoru Planelli ($LDLC_P$) dla próbek o stężeniu $LDLC_D$ poniżej 2,0 mmol/l i dla próbek o stężeniu $LDLC_D$ powyżej 2,0 mmol/l.

Dla niskich stężeń $LDLC_D$ (poniżej 2,0 mmol/l) wykazano istotną statystycznie zależność pomiędzy $LDLC_F$ a $LDLC_D$, $LDLC_C$ a $LDLC_D$ oraz $LDLC_P$ a $LDLC_D$ a uzyskane wartości współczynników korelacji były niskie (odpowiednio $r=0,484$; $r=0,496$; $r=0,481$ we wszystkich przypadkach $p < 0,001$). Natomiast dla próbek

w których stężenie $LDLC_D$ było powyżej 2,0 mmol/l wartości współczynników korelacji pomiędzy $LDLC_F$ a $LDLC_D$, $LDLC_C$ a $LDLC_D$ oraz $LDLC_P$ a $LDLC_D$ mieściły się w przedziale od $r=0,620$ do $r=0,645$ (we wszystkich przypadkach $p<0,001$). Metodą Passing-Bablok w przypadku niskich stężeń $LDLC_D$ (poniżej 2,0 mmol/l) wykazano istotne statystycznie różnice pomiędzy wartościami stężeń $LDLC$ uzyskanymi przy pomocy każdego ze wzorów a stężeniem $LDLC_D$. Natomiast dla próbek o stężeniu $LDLC_D$ powyżej 2,0 mmol/l metodą Passing-Bablok nie wykazano istotnych statystycznie różnic pomiędzy wartościami stężeń $LDLC$ oszacowanymi za pomocą wzorów a wartościami stężeń $LDLC$ oznaczonymi metodą bezpośrednią.

Metodą Blanda-Altmana porównano zgodność wyników $LDLC$ oszacowanych za pomocą wzorów Friedewalda, Cordova i Planelli z wartościami stężeń $LDLC_D$. Dla próbek o stężeniu $LDLC_D$ poniżej 2,0 mmol/l wykazano dodatnią korelację pomiędzy $(LDLC_F - LDLC_D)$ a $((LDLC_F + LDLC_D)/2)$, pomiędzy $(LDLC_C - LDLC_D)$ a $((LDLC_C + LDLC_D)/2)$ oraz pomiędzy $(LDLC_P - LDLC_D)$ a $((LDLC_P + LDLC_D)/2)$ (odpowiednio $r=0,566$; $r=0,336$; $r=0,504$ we wszystkich przypadkach $p<0,001$) (ryc.8a,c,e). Oznacza to, że wartości stężenia $LDLC$ uzyskane ze wzorów: Friedewalda, Cordova i Planelli nie były porównywalne z oznaczonymi wartościami stężeń $LDLC$ dla próbek o stężeniu $LDLC_D$ poniżej 2,0 mmol/l. Natomiast dla próbek o stężeniu $LDLC_D$ powyżej 2,0 mmol/l wyniki oszacowane za pomocą wzoru Friedewalda, wzoru Cordova i wzoru Planelli były niższe od wyników otrzymanych metodą bezpośrednią odpowiednio średnio o 0,34 mmol/l (95% CI: -1,46; 0,78), średnio o 0,45 mmol/l (95% CI: -1,47; 0,57) i średnio o 0,17 mmol/l (95% CI: -1,23; 0,88). Dodatkowo, wykazano słabą ujemną korelację pomiędzy różnicą $(LDLC_C - LDLC_D)$ a średnim stężeniem $LDLC$ $((LDLC_C + LDLC_D)/2)$ ($r=-0,386$; $p<0,0001$) (ryc.8d). Oznacza to, że wartości stężeń $LDLC$ oszacowane za pomocą wzoru Cordova nie były porównywalne z oznaczonymi wartościami stężeń $LDLC$ dla próbek o stężeniu $LDLC$ powyżej 2,0 mmol/l.

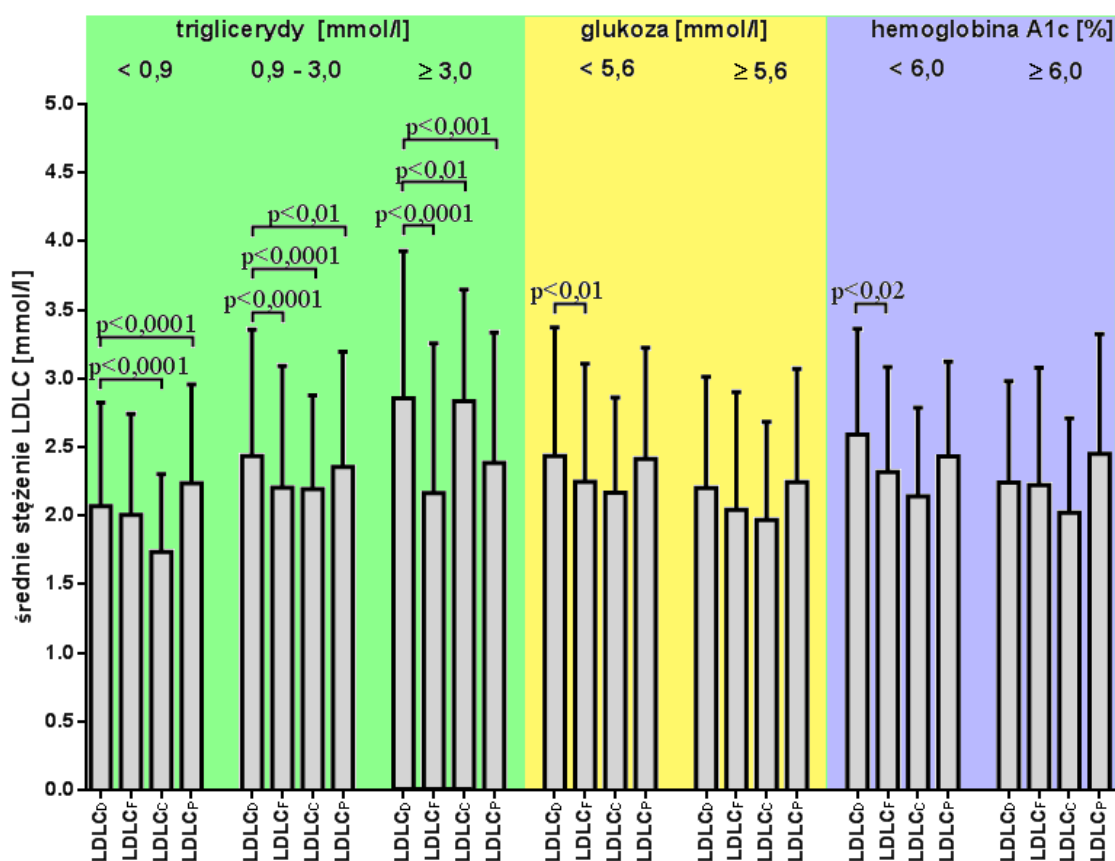


Rycina 8. Porównanie wartości LDLC oszacowanych ze wzorów: Fridewalda (a,b), Cordova (c,d), Planelli (e,f) z wartościami LDLC oznaczonymi metodą bezpośrednią w próbkach o stężeniu LDL_{C_D} poniżej 2,0 mmol/l i w próbkach o stężeniu LDL_{C_D} powyżej 2,0 mmol/l z wykorzystaniem metody Blanda-Altmana. Linia niebieska oznacza średnią, linie czerwone oznaczają zakres zgodności (średnia różnica±1,96SD) a linia czarna oznacza linie trendu.

4.3 Porównywalność stężenia LDL_{C_F}, LDL_{C_C} i LDL_{C_P} ze stężeniem LDL_{C_D} w zależności od stężenia triglicerydów, glukozy i HbA1c.

Porównanie średnich wartości stężeń LDLC oszacowanych za pomocą wzorów z LDL_{C_D} przeanalizowano osobno dla trzech zakresów stężeń triglicerydów (poniżej

0,9 mmol/l, od 0,9 do 3,0 mmol/l i powyżej 3,0 mmol/l), dla dwóch zakresów stężeń glukozy (poniżej 5,6 mmol/l i powyżej 5,6 mmol/l) oraz dla dwóch zakresów stężeń HbA1c (poniżej 6,0% i powyżej 6,0%). Dla próbek o stężeniu TG poniżej 0,9 mmol/l stwierdzono istotną statystycznie różnicę pomiędzy LDLC_C a LDLC_D ($p < 0,0001$), LDLC_P a LDLC_D ($p < 0,0001$) i brak istotnych różnic pomiędzy LDLC_F a LDLC_D (ryc.9). Natomiast dla próbek o stężeniu TG od 0,9 do 3,0 mmol/l oraz powyżej 3,0 mmol/l znamienne statystyczne różnice wykazano pomiędzy LDLC_F a LDLC_D (w obu przypadkach $p < 0,001$), LDLC_C a LDLC_D (odpowiednio $p < 0,0001$; $p < 0,01$) i LDLC_P a LDLC_D (odpowiednio $p < 0,01$; $p < 0,001$) (ryc.9). Dla próbek o stężeniu glukozy poniżej 5,6 mmol/l oraz dla próbek o stężeniu HbA1c poniżej 6,0% istotne statystycznie różnice wykazano tylko pomiędzy LDLC_F a LDLC_D (odpowiednio $p < 0,01$; $p < 0,02$) (ryc.9).



Rycina 9. Średnie (\pm SD) wartości stężeń cholesterolu frakcji LDL oznaczonego metodą bezpośrednią (LDLC_D) i oszacowanego za pomocą wzoru Friedewalda (LDL_C_F), wzoru Cordova (LDL_C_C) i wzoru Planelli (LDL_C_P) dla próbek o stężeniu TG poniżej 0,9 mmol/l, od 0,9 do 3,0 mmol/l, powyżej 3,0 mmol/l, dla próbek o stężeniu glukozy powyżej 5,6 mmol/l i powyżej 5,6 mmol/l oraz dla próbek o stężeniu hemoglobiny A1c poniżej 6,0% i powyżej 6,0%.

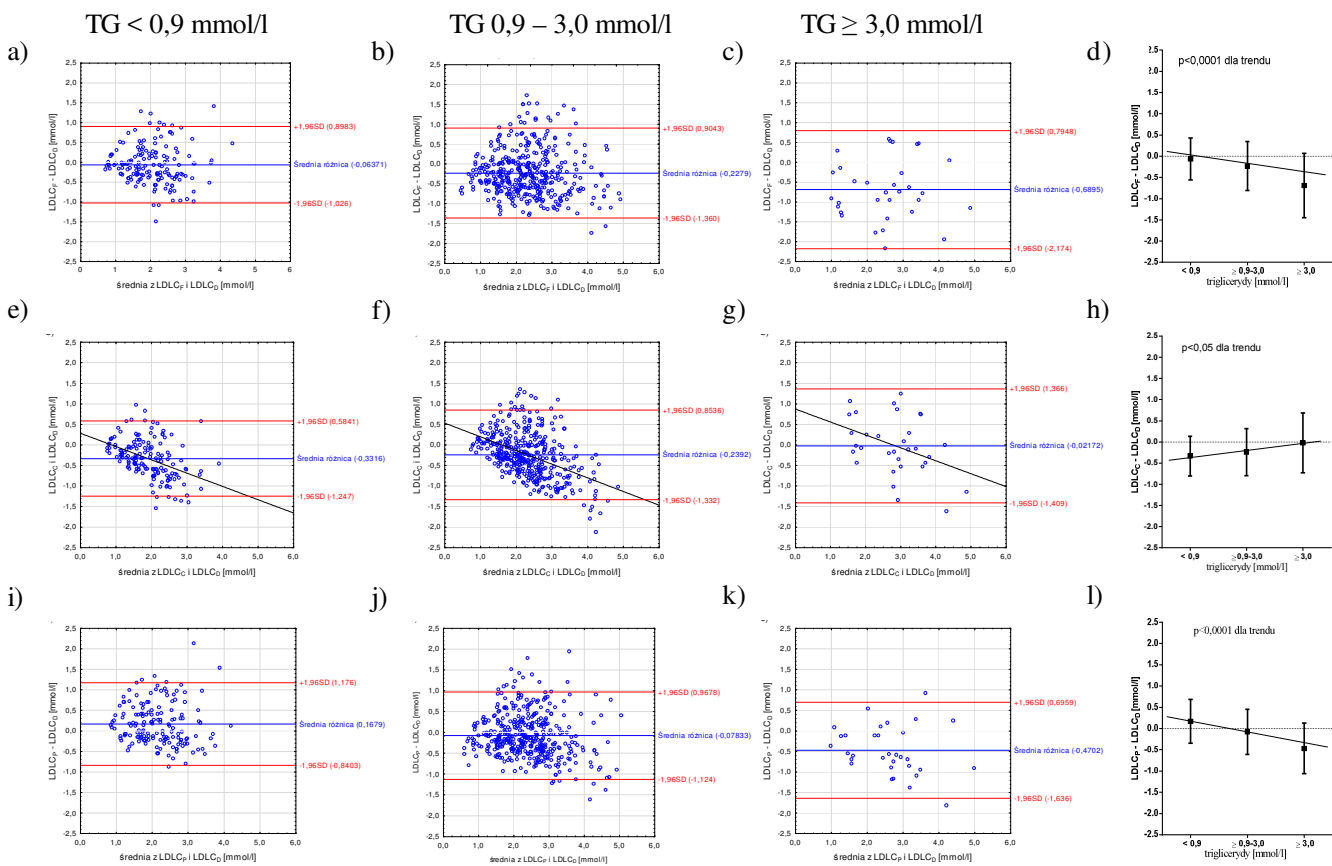
Dla próbek o stężeniu TG: poniżej 0,9 mmol/l, od 0,9 do 3,0 mmol/l oraz powyżej 3,0 mmol/l wykazano istotną statystycznie zależność pomiędzy $LDLC_F$ a $LDLC_D$, $LDLC_C$ a $LDLC_D$ oraz $LDLC_P$ a $LDLC_D$. Wartości współczynników korelacji mieściły się w przedziale 0,755 - 0,834; we wszystkich przypadkach $p < 0,0001$. Podobne wartości współczynników korelacji uzyskano dla próbek o stężeniu glukozy poniżej 5,6 mmol/l i dla próbek o stężeniu glukozy powyżej 5,6 mmol/l oraz dla próbek o stężeniu HbA1c powyżej 6,0% (0,723- 0,842; we wszystkich przypadkach $p < 0,0001$). Natomiast dla próbek o stężeniu HbA1c poniżej 6,0% uzyskano wyższe wartości współczynników korelacji ($r=0,949$; $r=0,952$; $r=0,946$ we wszystkich przypadkach $p < 0,0001$).

W oparciu o metodę Bland-Altmana stwierdzono, że niezależnie od stężenia TG nie było porównywalności pomiędzy $LDLC_C$ i $LDLC_D$ (ryc.10e-g) natomiast stężenia $LDLC_F$ i $LDLC_P$ były porównywalne z $LDLC_D$ (ryc.10a-c,i-k). Jednakże wraz ze wzrostem TG zaobserwowano coraz większe różnice pomiędzy $LDLC_F$ i $LDLC_D$ (ryc.10d). Dla różnicy pomiędzy $LDLC_F$ i $LDLC_D$ oraz pomiędzy $LDLC_P$ i $LDLC_D$ stwierdzono statystycznie istotny ujemny trend wraz ze wzrostem stężenia TG (w obu przypadkach $p < 0,001$) (ryc.10d,l). Natomiast średnie wartości różnic pomiędzy $LDLC_C$ a $LDLC_D$ były coraz mniejsze wraz ze wzrostem analizowanego zakresu stężenia TG i także wykazywały istotny trend ale w kierunku przeciwnym ($p < 0,05$) (ryc.10h).

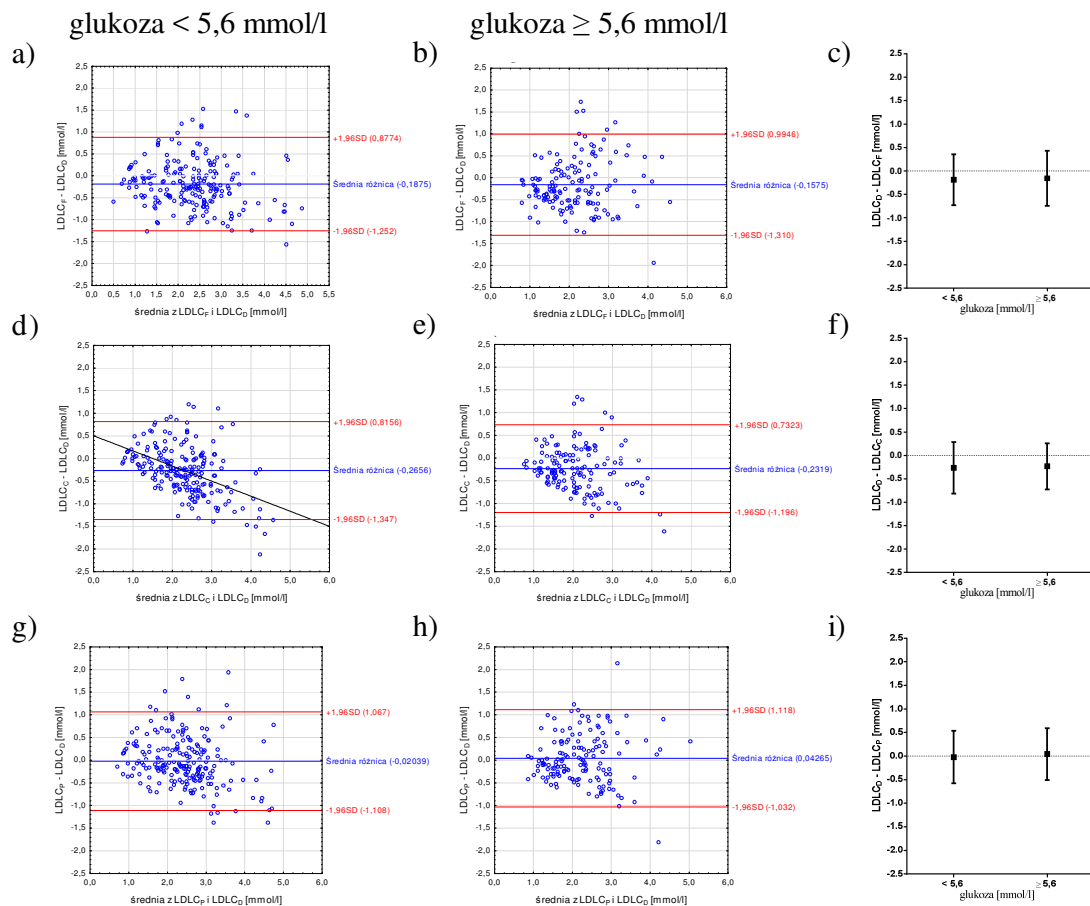
Dla próbek o stężeniu glukozy poniżej 5,6 mmol/l wartości stężeń $LDLC_C$ nie były porównywalne z $LDLC_D$ (ryc.11d). A dla próbek o stężeniu HbA1c poniżej 6,0% stężenia $LDLC_C$ oraz $LDLC_P$ nie były porównywalne z $LDLC_D$ (ryc.12d,g). Stwierdzono również mniejsze średnie wartości różnicy pomiędzy $LDLC_F$ i $LDLC_D$, oraz pomiędzy $LDLC_C$ i $LDLC_D$ dla próbek o stężeniu HbA1c powyżej 6,0% w porównaniu do odpowiadającym im średnim wartością dla próbek o stężeniu HbA1c poniżej 6,0% (ryc.12c,f,i). Dodatkowo zaobserwowano większy rozrzut wartości różnic pomiędzy $LDLC_F$ i $LDLC_D$, pomiędzy $LDLC_C$ i $LDLC_D$ oraz pomiędzy $LDLC_P$ i $LDLC_D$ dla próbek o stężeniu HbA1c powyżej 6,0% w porównaniu do odpowiadającym im wartością różnic dla próbek o stężeniu HbA1c poniżej 6,0% (ryc.12 a,b,d,e,g,h).

Natomiast nie wykazano istotnych statystycznie zmian w średnich wartościach różnic pomiędzy $LDLC_F$ i $LDLC_D$, pomiędzy $LDLC_C$ i $LDLC_D$ oraz pomiędzy $LDLC_P$

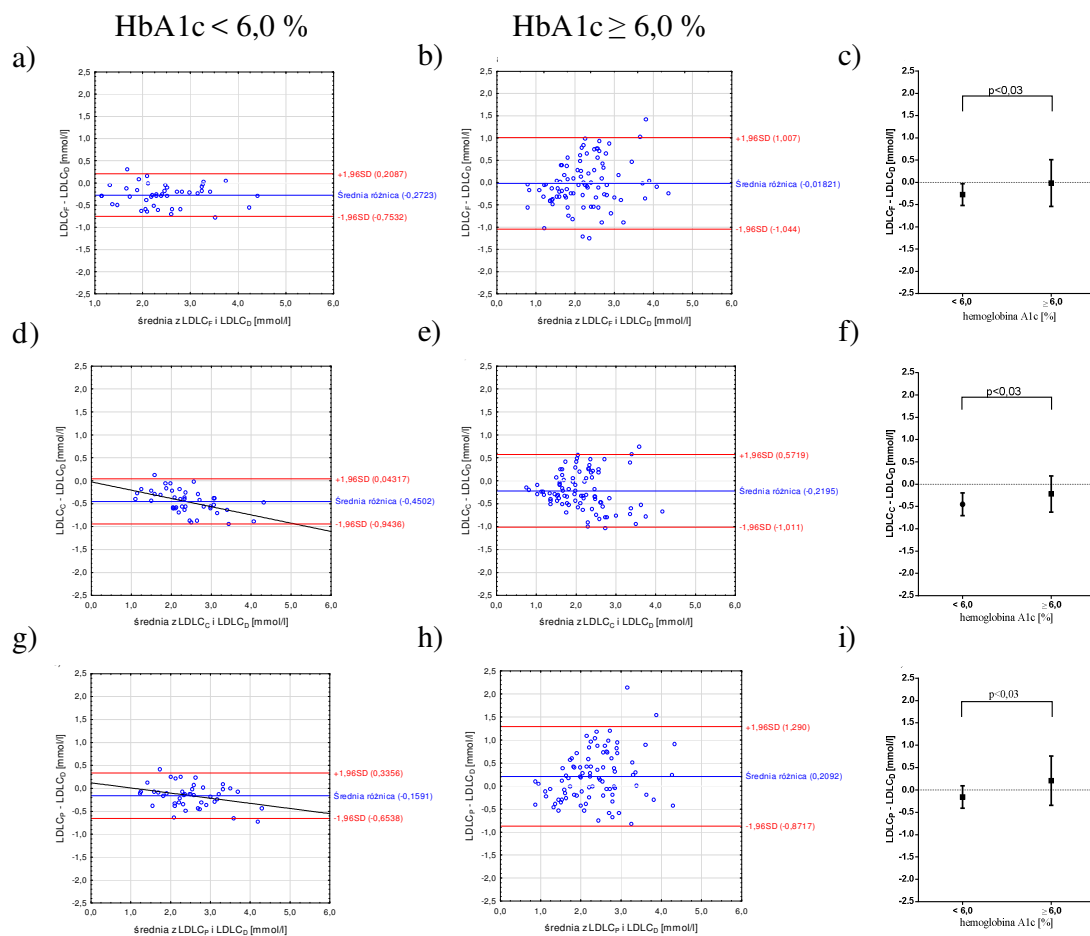
i LDL_{C_D} dla próbek o stężeniu glukozy poniżej 5,6 mmol/l w porównaniu do odpowiadającym im średnim wartością różnic dla próbek o stężeniu glukozy powyżej 5,6 mmol/l (ryc. 11c,f,i).



Rycina 10. Porównanie wartości LDLC oszacowanych ze wzorów: Fridewalda (a-c), Cordova (e-g), Planelli (i-k) z wartościami LDLC oznaczonymi metodą bezpośrednią w próbkach o stężeniu triglicerydów poniżej 0,9 mmol/l, próbkach o stężeniu triglicerydów od 0,9 do 3,0 mmol/l i próbkach o stężeniu triglicerydów powyżej 3,0 mmol/l z wykorzystaniem metody Blanda-Altmana (linia niebieska oznacza średnią, linie czerwone oznaczają zakres zgodności (średnia różnica \pm 1,96SD) a linia czarna oznacza linie trendu). Dla każdego z analizowanych wzorów porównano średnie (\pm SD) wartości różnicy pomiędzy LDLC oszacowanymi za pomocą wzorów: Fridewalda (d), Cordova (g), Planelli (l) a LDLC_D w zależności od stężenia triglicerydów.



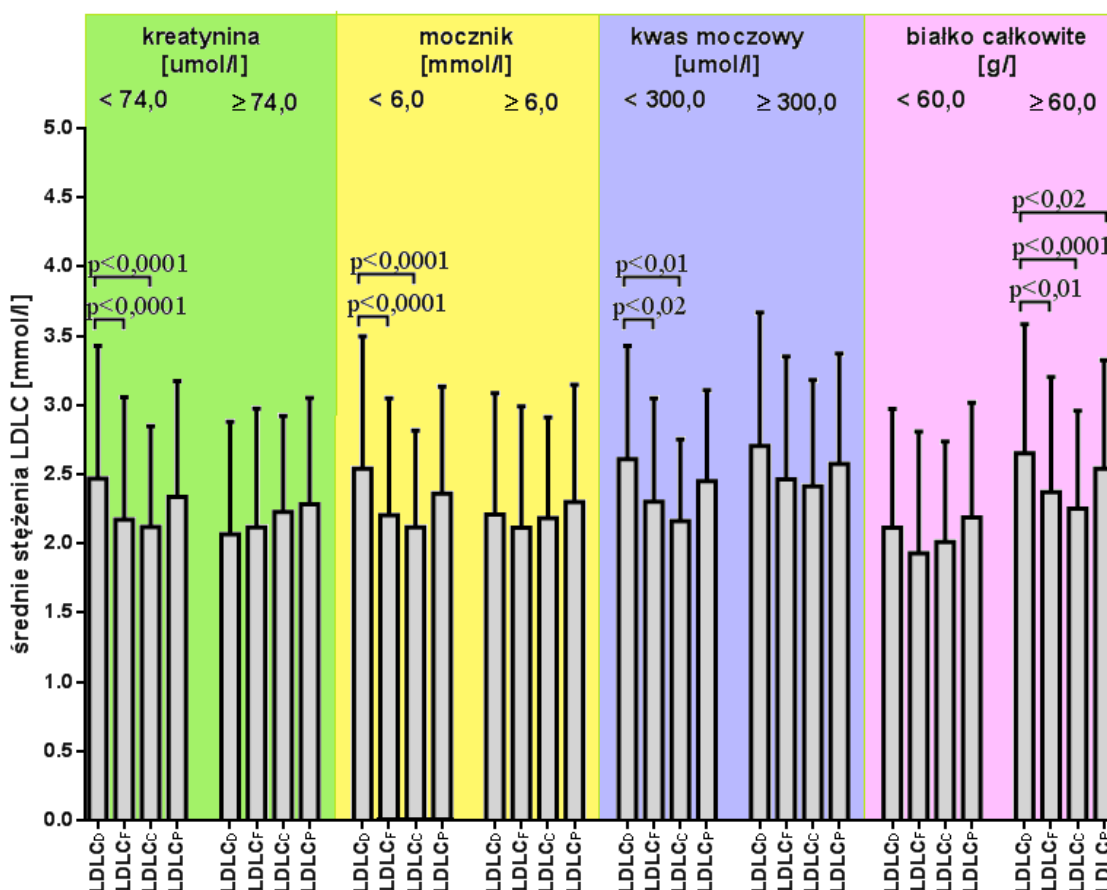
Rycina 11. Porównanie wartości LDLC oszacowanych ze wzorów: Fridewalda (a,b), Cordova (d,e), Planelli (g,h) z wartościami LDLC oznaczonymi metodą bezpośrednią w próbkach o stężeniu glukozy poniżej 5,6 mmol/l i próbkach o stężeniu glukozy powyżej 5,6 mmol/l z wykorzystaniem metody Blanda-Altmana. Linia niebieska oznacza średnią, linie czerwone oznaczają zakres zgodności (średnia różnica \pm 1,96SD) a linia czarna oznacza linie trendu. Dla każdego z analizowanych wzorów porównano średnie (\pm SD) wartości różnicy pomiędzy LDLC oszacowanymi za pomocą wzorów: Fridewalda (c), Cordova (f), Planelli (i) a LDLC_D w zależności od stężenia glukozy.



Rycina 12. Porównanie wartości LDLC oszacowanych ze wzorów: Fridewalda (a,b), Cordova (d,e), Planelli (g,h) z wartościami LDLC oznaczonymi metodą bezpośrednią w próbkach o stężeniu HbA1c poniżej 6,0% i próbkach o stężeniu HbA1c powyżej 6,0% z wykorzystaniem metody Blanda-Altmana. Linia niebieska oznacza średnią, linie czerwone oznaczają zakres zgodności ($\text{średnia różnica} \pm 1,96SD$) a linia czarna oznacza linie trendu. Dla każdego z analizowanych wzorów porównano średnie ($\pm SD$) wartości różnicy pomiędzy LDLC oszacowanymi za pomocą wzorów: Fridewalda (c), Cordova (f), Planelli (i) a LDLC_D w zależności od stężenia HbA1c.

4.4 Porównywalność stężenia LDLC_F, LDLC_C i LDLC_P ze stężeniem LDLC_D w zależności od stężenia nie białkowych związków azotowych i białka całkowitego

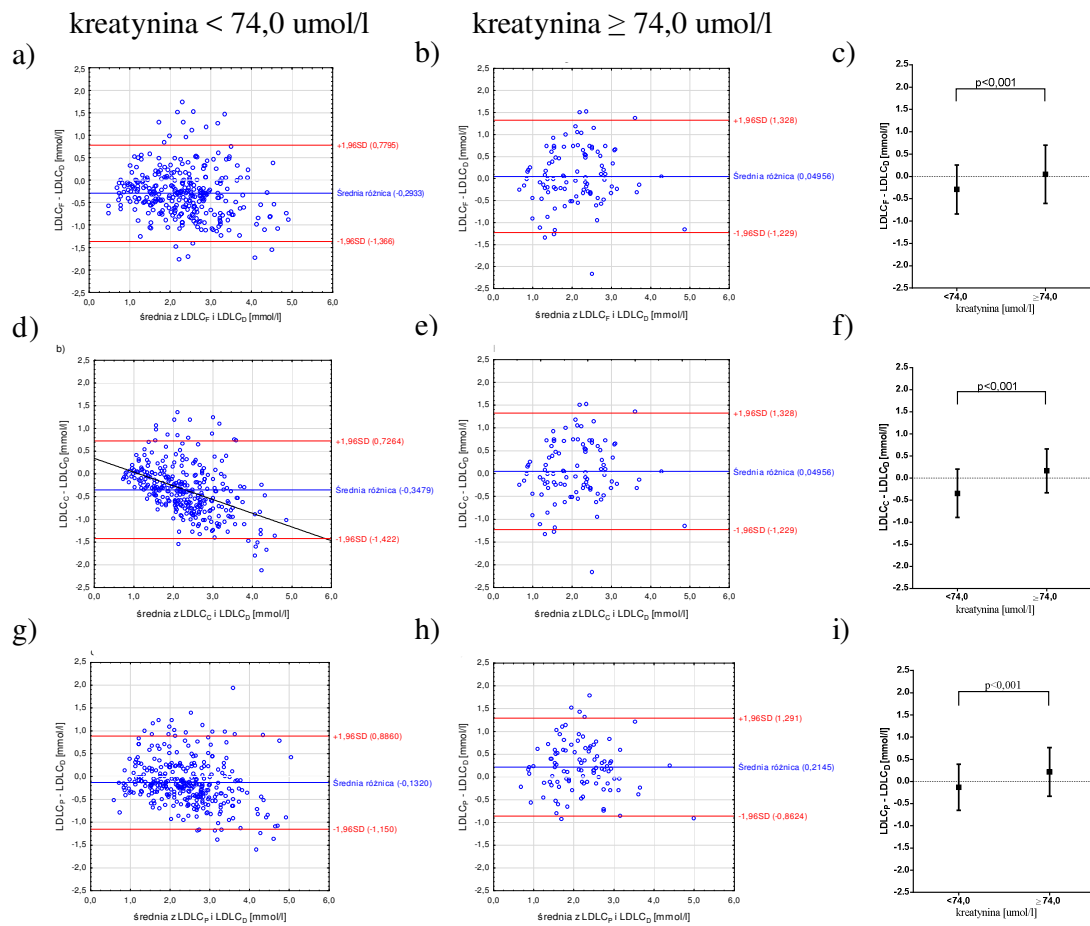
Do głównych związków azotowych nie białkowych występujących w organizmie należą mocznik, kreatynina i kwas moczowy. Średnie wartości pomiędzy oszacowanymi stężeniami LDLC a stężeniem LDLC_D przeanalizowano osobno dla dwóch zakresów stężeń kreatyniny (poniżej 74,0 umol/l i powyżej 74,0 umol/l), mocznika (poniżej 6,0 mmol/l i powyżej 6,0 mmol/l), kwasu moczowego (poniżej 300,0 umol/l i powyżej 300,0 umol/l) oraz białka całkowitego (poniżej 60,0 g/l i powyżej 60,0 g/l). Wykazano istotne statystycznie różnice tylko pomiędzy LDLC_F a LDLC_D oraz pomiędzy LDLC_C a LDLC_D dla próbek o stężeniu kreatyniny poniżej 74,0 umol/l (w obu przypadkach $p < 0,0001$), dla próbek o stężeniu mocznika poniżej 6,0 mmol/l (w obu przypadkach $p < 0,0001$) i dla próbek o stężeniu kwasu moczowego poniżej 300,0 umol/l (odpowiednio $p < 0,02$; $p < 0,01$) (ryc.13). Natomiast dla próbek, w których było oznaczone stężenie białka całkowitego istotną statystycznie różnicę pomiędzy LDLC_F a LDLC_D, pomiędzy LDLC_C a LDLC_D oraz pomiędzy LDLC_P a LDLC_D wykazano jedynie dla próbek o stężeniu białka całkowitego powyżej 60,0 g/l (odpowiednio $p < 0,01$; $p < 0,0001$; $p < 0,02$) (ryc.13).



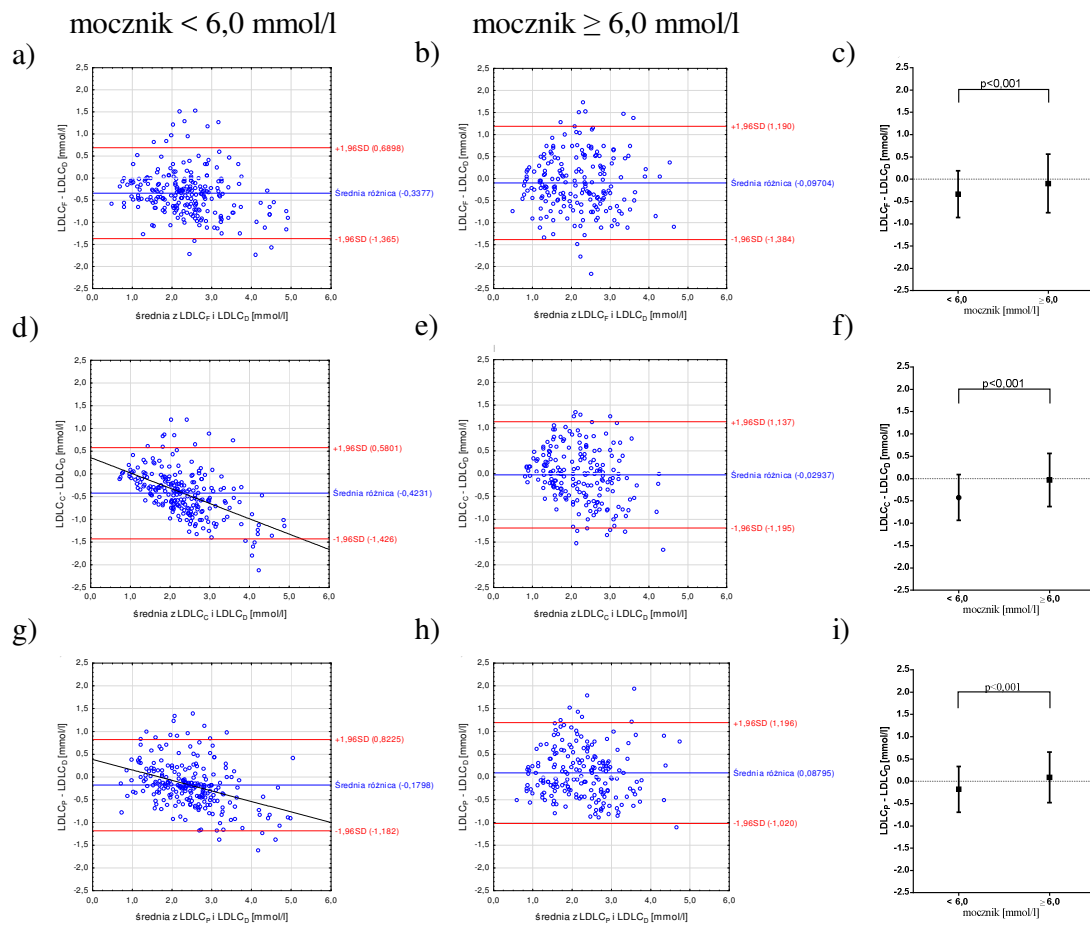
Rycina 13. Średnie (\pm SD) wartości stężeń cholesterolu frakcji LDLC oznaczonego metodą bezpośrednią (LDLc_D) i oszacowanego za pomocą wzoru Friedewalda (LDLc_F), wzoru Cordova (LDLc_C) i wzoru Planelli (LDLc_P) dla próbek o stężeniu kreatyniny poniżej 74,0 umol/l i powyżej 74,0 umol/l, dla próbek o stężeniu mocznika poniżej 6,0 mmol/l i powyżej 6,0 mmol/l, dla próbek o stężeniu kwasu moczowego poniżej 300,0 umol/l i powyżej 300,0 umol/l oraz dla próbek o stężeniu białka całkowitego poniżej 60,0 g/l i powyżej 60,0 g/l.

Dla próbek w których stężenie kreatyniny było poniżej 74,0 umol/l oraz dla próbek o stężeniu mocznika poniżej 6,0 mmol/l wykazano istotną statystycznie zależność pomiędzy LDLc_F a LDLc_D, LDLc_C a LDLc_D oraz LDLc_P a LDLc_D. Wartości współczynników korelacji mieściły się w przedziale 0,824-0,854; we wszystkich przypadkach $p < 0,0001$. Z kolei dla próbek o stężeniu kreatyniny powyżej 74,0 umol/l i dla próbek o stężeniu mocznika powyżej 6,0 mmol/l uzyskano niższe współczynniki korelacji (0,695-0,793 we wszystkich przypadkach $p < 0,0001$). Natomiast niezależnie od stężenia kwasu moczowego w próbce oraz stężenia białka całkowitego w próbce wartości współczynników korelacji były porównywalne (odpowiedni: 0,794 - 0,828 oraz 0,765 - 0,813; we wszystkich przypadkach $p < 0,0001$).

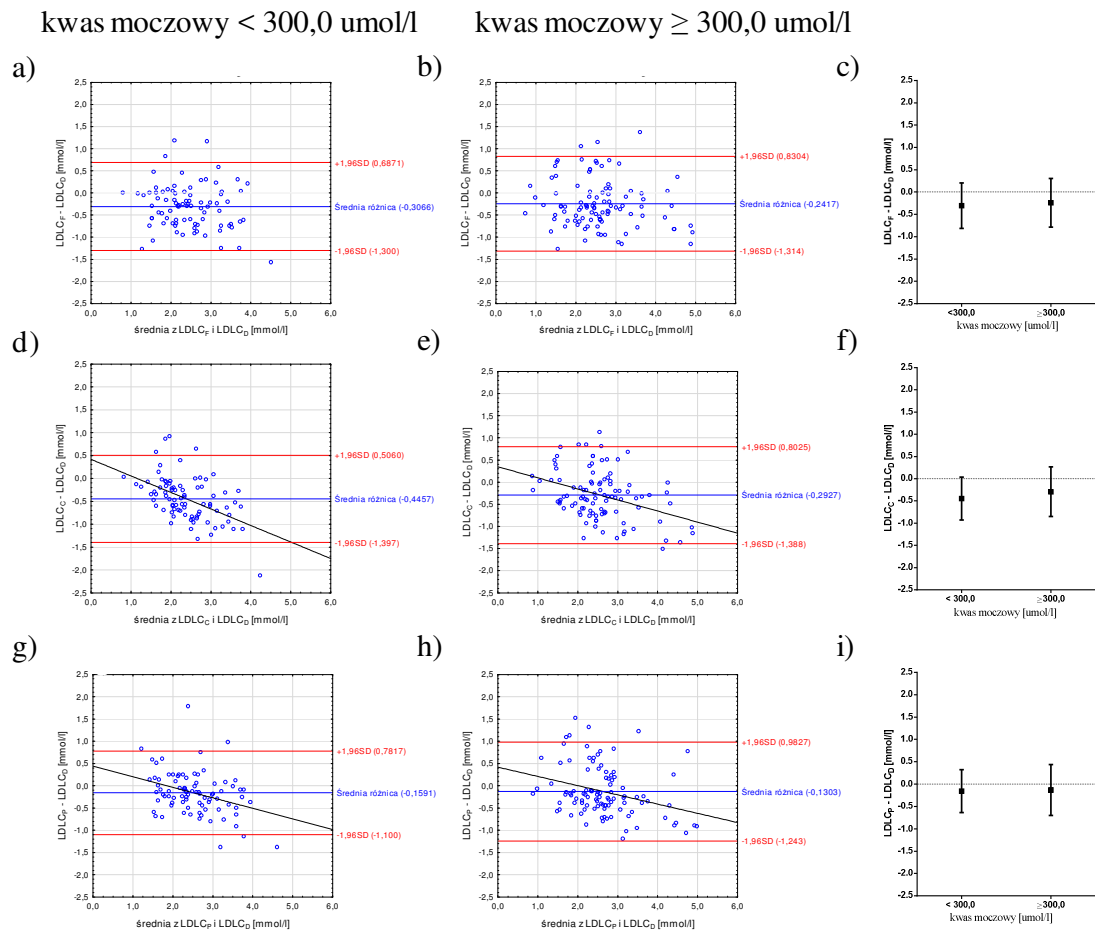
W oparciu o metodę Blanda-Altmana stwierdzono, że dla próbek o stężeniu kreatyniny poniżej 74,0 $\mu\text{mol/l}$ nie było porównywalności pomiędzy LDLC_C i LDLC_D (ryc.14d) a dla próbek o stężeniu mocznika poniżej 6,0 mmol/l wartości stężeń LDLC_C i LDLC_P nie były porównywalne z LDLC_D (ryc.15d,g). Różnica pomiędzy średnimi wartościami różnic pomiędzy LDLC_F i LDLC_D , pomiędzy LDLC_C i LDLC_D oraz pomiędzy LDLC_P i LDLC_D dla próbek o stężeniu kreatyniny $< 74,0 \mu\text{mol/l}$ oraz dla próbek o stężeniu kreatyniny $\geq 74,0 \mu\text{mol/l}$ wynosił odpowiednio 0,34 mmol/l , 0,40 mmol/l i 0,34 mmol/l (we wszystkich przypadkach $p < 0,001$) (ryc.14c,f,i). Natomiast dla próbek o stężeniu mocznika $< 6,0 \text{mmol/l}$ średnie wartości różnic pomiędzy LDLC_F i LDLC_D , pomiędzy LDLC_C i LDLC_D oraz pomiędzy LDLC_P i LDLC_D były istotnie statystycznie większe w porównaniu do odpowiadającym im średnim wartością dla próbek o stężeniu mocznika $\geq 6,0 \text{mmol/l}$ (we wszystkich przypadkach $p < 0,001$) (ryc.15c,f,i). Ponadto wykazano, że niezależnie od stężenia kwasu moczowego nie było porównywalności pomiędzy LDLC_D a stężeniami LDLC_C i LDLC_P (ryc.16d,e,g,h) natomiast stwierdzono porównywalność pomiędzy LDLC_F i LDLC_D (ryc.16a,b). A dla próbek o stężeniu białka całkowitego powyżej 60,0 g/l zaobserwowano brak porównywalności pomiędzy LDLC_C i LDLC_D (ryc.17e). Dodatkowo stwierdzono mniejszą średnią wartość różnicy pomiędzy LDLC_C i LDLC_D dla próbek o stężeniu białka całkowitego poniżej 60,0 g/l w porównaniu do odpowiadającej jej średniej wartości dla próbek o stężeniu białka całkowitego powyżej 60,0 g/l (ryc.17f). Natomiast nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy średnimi wartościami różnic pomiędzy LDLC_F i LDLC_D oraz pomiędzy LDLC_P i LDLC_D dla próbek o stężeniu białka całkowitego $< 60,0 \text{g/l}$ w porównaniu do odpowiadającym im średnim wartością różnic dla próbek o białka całkowitego $\geq 60,0 \text{g/l}$ (ryc.17c,i). Istotnych statystycznie zmian nie wykazano również w średnich wartościach różnic pomiędzy LDLC_F i LDLC_D , pomiędzy LDLC_C i LDLC_D oraz pomiędzy LDLC_P i LDLC_D dla próbek o stężeniu kwasu moczowego $< 300,0 \mu\text{mol/l}$ w porównaniu do odpowiadającym im średnim wartością różnic dla próbek o stężeniu kwasu moczowego $\geq 300,0 \mu\text{mol/l}$ (ryc.16c,f,i).



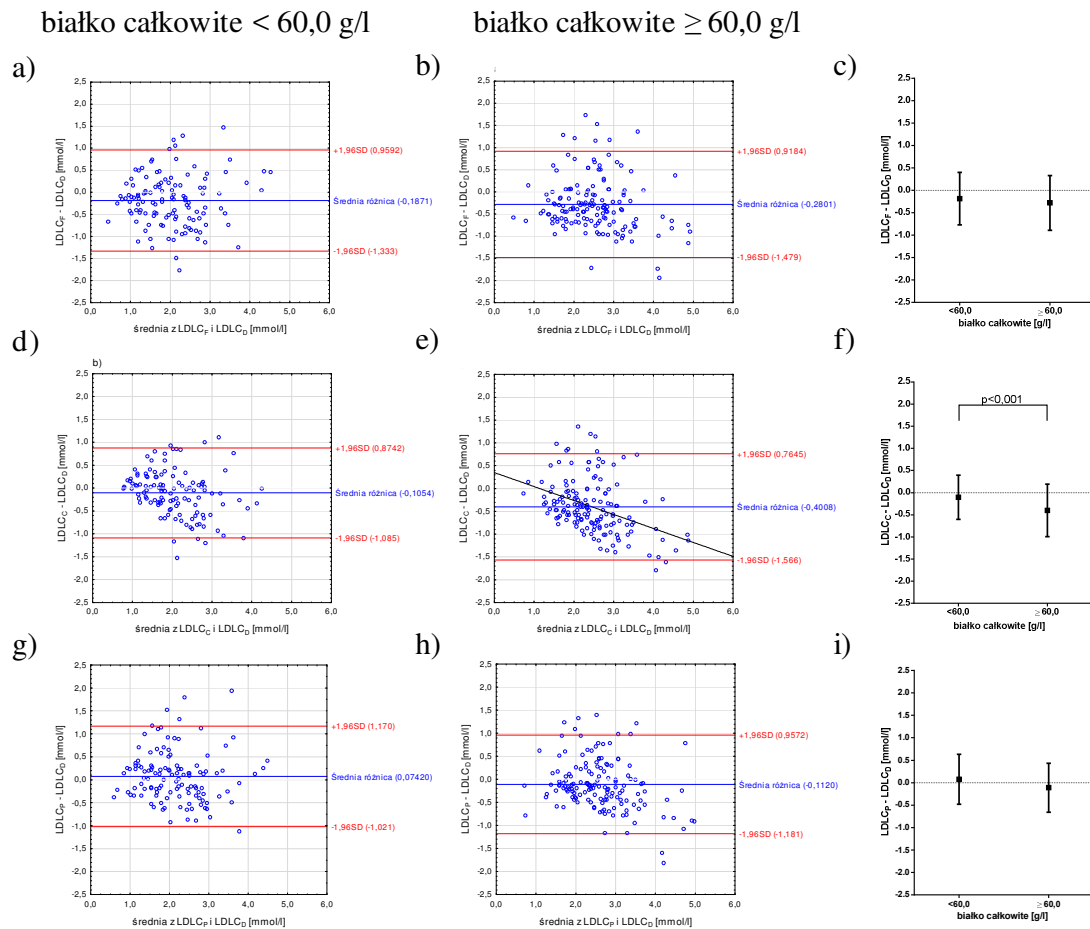
Rycina 14. Porównanie wartości LDLC oszacowanych ze wzorów: Fridewalda (a,b), Cordova (d,e), Planelli (g,h) z wartościami LDLC oznaczonymi metodą bezpośrednią w próbkach o stężeniu kreatyniny poniżej 74,0 $\mu\text{mol/l}$ i próbkach o stężeniu kreatyniny powyżej 74,0 $\mu\text{mol/l}$ z wykorzystaniem metody Bland-Altmana. Linia niebieska oznacza średnią, linie czerwone oznaczają zakres zgodności (średnia różnica $\pm 1,96\text{SD}$) a linia czarna oznacza linie trendu. Dla każdego z analizowanych wzorów porównano średnie ($\pm\text{SD}$) wartości różnicy pomiędzy LDLC oszacowanymi za pomocą wzorów: Fridewalda (c), Cordova (f), Planelli (i) a LDLC_D w zależności od stężenia kreatyniny.



Rycina 15. Porównanie wartości LDLC oszacowanych ze wzorów: Fridewalda (a,b), Cordova (d,e), Planelli (g,h) z wartościami LDLC oznaczonymi metodą bezpośrednią w próbkach o stężeniu mocznika poniżej 6,0 mmol/l i próbkach o stężeniu mocznika powyżej 6,0 mmol/l z wykorzystaniem metody Bland-Altmana. Linia niebieska oznacza średnią, linie czerwone oznaczają zakres zgodności (średnia różnica \pm 1,96SD) a linia czarna oznacza linie trendu. Dla każdego z analizowanych wzorów porównano średnie (\pm SD) wartości różnicy pomiędzy LDLC oszacowanymi za pomocą wzorów: Fridewalda (c), Cordova (f), Planelli (i) a LDLC_D w zależności od stężenia mocznika.



Rycina 16. Porównanie wartości LDLC oszacowanych ze wzorów: Fridewalda (a,b), Cordova (d,e), Planelli (g,h) z wartościami LDLC oznaczonymi metodą bezpośrednią w próbkach o stężeniu kwasu moczowego poniżej $300,0 \text{ umol/l}$ i próbkach o stężeniu kwasu moczowego powyżej $300,0 \text{ umol/l}$ z wykorzystaniem metody Blanda-Altmana. Linia niebieska oznacza średnią, linie czerwone oznaczają zakres zgodności ($\text{średnia różnica} \pm 1,96\text{SD}$) a linia czarna oznacza linie trendu. Dla każdego z analizowanych wzorów porównano średnie ($\pm\text{SD}$) wartości różnicy pomiędzy LDLC oszacowanymi za pomocą wzorów: Fridewalda (c), Cordova (f), Planelli (i) a LDL_{CD} w zależności od stężenia kwasu moczowego.



Rycina 17. Porównanie wartości LDLC oszacowanych ze wzorów: Fridewalda (a,b), Cordova (d,e), Planelli (g,h) z wartościami LDLC oznaczonymi metodą bezpośrednią w próbkach o stężeniu białka całkowitego poniżej 60,0 g/l i próbkach o stężeniu białka całkowitego powyżej 60,0 g/l z wykorzystaniem metody Blanda-Altmana. Linia niebieska oznacza średnią, linie czerwone oznaczają zakres zgodności (średnia różnica \pm 1,96SD) a linia czarna oznacza linie trendu. Dla każdego z analizowanych wzorów porównano średnie (\pm SD) wartości różnicy pomiędzy LDLC oszacowanymi za pomocą wzorów: Fridewalda (c), Cordova (f), Planelli (i) a LDLC_D w zależności od stężenia białka całkowitego.

5. Dyskusja

Miażdżycy pod względem histopatologicznym jest złożonym procesem polegającym na gromadzeniu się w błonie wewnętrznej naczyń krwionośnych złogów składających się z makrofagów, lipoprotein o małej gęstości, komórek piankowatych i pozakomórkowych skupisk cholesterolu. Lipoproteiny LDL odgrywają istotną rolę w rozwoju miażdżycy, która może rozpoczynać się już w dzieciństwie [1,2,6,7]. Dlatego też uzyskanie wiarygodnego wyniku stężenia LDLC jest kluczowym elementem w prawidłowej klasyfikacji pacjentów pod względem ryzyka rozwoju chorób sercowo-naczyniowych oraz w monitorowaniu terapii hipolipemizującej. Lipoproteiny LDL stanowią heterogenną grupę cząstek różniących się wielkością i składem lipidowym, co stwarza trudności metodyczne w opracowaniu wiarygodnej metody analitycznej do oznaczania stężenia LDLC. Przez wiele lat stężenie cholesterolu frakcji LDL było oszacowywane za pomocą wzoru Friedewalda. Obecnie wiele laboratoriów korzysta z metod enzymatycznych [57]. Metody enzymatyczne są rekomendowane przez NCEP i Cholesterol Reference Method Laboratory Network of Centre for Disease Control and Prevention [56]. Metody enzymatyczne pozwalają na oznaczenie stężenia LDLC w próbkach pobieranych nie na czczo, co jest dużym ułatwieniem w przypadku pacjentów pediatrycznych oraz pacjentów z cukrzycą typu I. Jednakże metody te nadal są kosztowne a ponadto nie są wolne od błędów analitycznych i interferencji. Z drugiej strony, każde dodatkowe oznaczenie wymaga dodatkowej objętości krwi, co w przypadku małych dzieci często jest problemem. Dlatego celem niniejszej pracy było porównanie wyników stężeń cholesterolu frakcji LDL oszacowanych przy użyciu trzech różnych wzorów: wzoru Friedewalda, wzoru Cordova i wzoru Planelli z wynikami stężeń cholesterolu frakcji LDL oznaczonych metodą bezpośrednią z wykorzystaniem surowic pobranych od dzieci hospitalizowanych uwzględniając wiek dziecka, jednostkę chorobową i matrycę próbek. Ze względu na niskie stężenia cholesterolu występujące u dzieci podjęto też próbę porównania metod szacunkowych z metodą bezpośrednią dla niskich i prawidłowych stężeń LDLC.

W literaturze dostępne są tylko nieliczne doniesienia naukowe, w których porównywano wartości stężeń LDLC oszacowane przy pomocy analizowanych w obecnej pracy wzorów, z wartościami stężeń LDLC oznaczonymi metodą

bezpośrednią dla próbek pochodzących od dzieci hospitalizowanych. Trudno jest też ustosunkować się do wielu publikacji ze względu na różnorodność metod stosowanych do bezpośredniego oznaczania cholesterolu frakcji LDL.

W obecnej pracy uzyskano znacznie niższą wartość współczynnika korelacji pomiędzy $LDLC_F$ a $LDLC_D$ ($r=0,763$; $p<0,0001$) w porównaniu do danych opublikowanych przez Garoufi i wsp. [87] ($r=0,910$; $p<0,001$; metoda firmy Kynowa Medex) oraz Kubo i wsp.[88] ($r=0,977$; $p<0,001$; metoda firmy Sekisui Chemical Co). Różnice te mogą wynikać nie tylko z doboru badanej grupy pediatrycznej ale też zastosowanej metody bezpośredniej do oznaczenia stężenia LDLC. W niniejszej pracy badanie przeprowadzono dla próbek pochodzących od hospitalizowanych pacjentów pediatrycznych w wieku od 1 dnia życia do 18 lat natomiast Garoufi i wsp. [87] przeprowadzili porównanie wyników dla próbek pobranych na czczo od dzieci w wieku od 2 do 18 lat, które nie były hospitalizowane w przeciągu ostatniego miesiąca i nie wystąpiła u nich ostra infekcja w przeciągu ostatnich 10 dni [87]. Ponadto, w cytowanej pracy w 31% analizowanych próbek stężenie LDLC było powyżej 3,36 mmol/l a z badania wykluczono próbki, w których stężenie TC było poniżej 2,59 mmol/l i stężenie LDLC było poniżej 1,29 mmol/l [87]. Podobnie Kubo i wsp. [88] przeprowadzili badanie dla próbek pobranych na czczo i nie na czczo od dzieci zdrowych w wieku od 3 do 14 lat, przed okresem pokwitania. Z badanej grupy wykluczono dzieci z cukrzycą, niedoczynnością tarczycy i otyłością. W obecnej pracy w obliczeniach uwzględniono wszystkie wyniki, ale analizę przeprowadzono także w zależności od stężenia niektórych składowych matrycy próbki.

Większość dostępnych w literaturze badań analizujących zależność pomiędzy $LDLC_F$ a $LDLC_D$ oraz $LDLC_C$ a $LDLC_D$ zostało przeprowadzonych dla próbek pochodzących od osób dorosłych. W większości prac wartości współczynnika korelacji dla zależności pomiędzy $LDLC_F$ a $LDLC_D$ [89,90,91,92,93,94,95,96,97] oraz między $LDLC_C$ a $LDLC_D$ [89,63,90,91,92] były wyższe (od $r= 0.881$ do $r=0.980$) niż uzyskane w niniejszej pracy. Cytowani autorzy przeprowadzili badania korzystając z próbek pobranych na czczo od osób dorosłych pochodzenia azjatyckiego, afrykańskiego i brazylijskiego a stężenie TG w badanych próbkach było poniżej 4,56 mmol/l. Próbki pochodziły od osób które nie brały środków antykoncepcyjnych, estrogenów, tyroksyny, nie zażywały regularnie leków, nie miały zdiagnozowanych chorób przewlekłych ani ostrych, nie były hospitalizowane, nie były kobietami w ciąży ani do

roku po porodzie, nie miały zdiagnozowanego wirusowego zapalenia wątroby typu B lub C oraz ludzkiego wirusa niedoboru odporności, nie miały otyłości ($BMI < 30 \text{ kg/m}^2$), nie spożywały więcej niż 70g alkoholu na dzień oraz nie paliły więcej niż 20 papierosów na dzień [90]. Można wnioskować, że uzyskanie tak wysokich wartości współczynników korelacji było możliwe tylko w wyselekcjonowanej grupie pacjentów.

Wartość współczynnika korelacji dla zależności pomiędzy $LDLC_F$ a $LDLC_D$ uzyskana w niniejszej pracy była porównywalna z wartościami współczynnika przedstawioną przez Badrakiya i wsp. ($r=0,78$; $p<0,001$; metoda firmy Kynowa Medex) [97] i przez Kamal i wsp. [98] ($r=0,786$; $p<0,001$; metoda firmy Wako Pure Chemicals Industries) a dla zależności pomiędzy $LDLC_C$ a $LDLC_D$ z wynikami Dansethakul i wsp. ($r=0,785$; nie podano metody i producenta odczynników) [96]. Cytowani autorzy wykluczyli z badania próbki od pacjentów przyjmujących leki hypolipemizujące [97] oraz próbki o stężeniu TG powyżej 4,52 mmol/l [98].

Różnice w wartościach współczynników korelacji pomiędzy wartościami uzyskanymi w niniejszej pracy a przedstawionymi w literaturze mogą wynikać nie tylko z odmiennej charakterystyki grupy badanej ale również z zastosowanej metody do oznaczenia stężenia LDLC oraz TC, TG czy HDLC. Różnice pomiędzy metabolizmem dzieci a metabolizmem dorosłych mogą powodować, że skład matrycy próbek pochodzący od pacjentów pediatrycznych może być odmienny od składu matrycy próbek pochodzących od osób dorosłych. Pobranie materiału na czczo od dziecka, czyli po około 12 godzinnej przerwie od ostatniego posiłku, jest trudne do osiągnięcia, natomiast w materiale pobranym nie na czczo obecność podwyższonego stężenia różnych składników pokarmowych powoduje zmianę matrycy próbki. Należy również pamiętać, że analizowane w obecnej pracy wzory do oszacowywania stężenia LDLC zostały opracowane w oparciu o populację dorosłych. Stosowanie innej metody do bezpośredniego oznaczania stężenia LDLC w obecnej pracy w porównaniu do innych autorów: metoda firmy Kynowa Medex [87], metoda firmy Sekisui Chemical Co [88], metoda firmy Siemens Dimension [89], metoda firmy Wako Pure Chemical Industries [63], metoda firmy Erba Mannheim [99], metoda firmy Daiichi Pure Chemicals [90,91,92,93,94] może istotnie wpływać na porównywalność szacowanych metod oznaczania LDLC. W niektórych pracach brak jest nawet producenta metody [96,95]. Jak wiadomo, metody mogą różnić się swoistością i podatnością na interferencje. W niniejszej pracy do oznaczenia stężenia TC, TG i HDLC korzystano z innych metod

niż w cytowanych pracach co mogło mieć wpływ na różnice w oszacowaniu stężenia cholesterolu frakcji LDL.

Trudno odnieść uzyskane w obecnej pracy dane dotyczące wzoru Planelli, bowiem brak jest publikacji, w których porównywane byłyby wartości stężeń LDLC wyliczonych ze wzoru Planelli z wartościami stężeń LDLC oznaczonymi metodą bezpośrednią.

W obecnej pracy porównano różnice pomiędzy wartościami stężeń LDLC oszacowanymi za pomocą wzoru Friedewalda, wzoru Cordova i wzoru Planelli, a wartościami oznaczonymi metodą bezpośrednią. Wykazano, że średnie wartości różnic między stężeniem LDLC_F a LDLC_D (-0,21 mmol/l) oraz między LDLC_C a LDLC_D (-0,25 mmol/l) były większe w porównaniu do średniej wartości różnicy pomiędzy LDLC_P a LDLC_D (-0,03 mmol/l). Uzyskane wartości różnicy pomiędzy LDLC_F a LDLC_D były porównywalne z danymi opublikowanymi przez Kubo i wsp. [88] dla stężeń uzyskanych dla pacjentów pediatrycznych nie będących na czczo (-0,26 mmol/l) ale nie dla próbek pobranych na czczo (-0,05 mmol/l). Ta ostatnia wartość była zbliżona do podanej przez Garoufi i wsp. [87] dla próbek pobranych na czczo od dzieci, w których stężenie TC było powyżej 2,56 mmol/l a stężenie LDLC mieściło się w zakresie od 1,29 do 3,36 mmol/l. Natomiast dla próbek, w których stężenie LDLC było powyżej 3,36 mmol/l, Garoufi i wsp. [87] uzyskali różnicę pomiędzy LDLC_F a LDLC_D równą -0,14 mmol/l. Podobną wartość różnicy pomiędzy LDLC_F a LDLC_D otrzymali Yu i wsp. [100] (0,13 mmol/l; metoda firmy Daiichi Pure Chemicals i 0,11 mmol/l; metoda firmy Kynowa Medex) w próbkach pobranych na czczo od dzieci, które nie brały leków przeciwdrgawkowych, steroidów, leków na trądzik, nie miały zdiagnozowanych chorób tarczycy, wątroby, nadnerczy lub nerek.

W większości opublikowanych badań, w których analizowano średnie wartości różnic pomiędzy LDLC_F a LDLC_D było prowadzonych dla próbek pochodzących od osób dorosłych należących do różnych populacji m.in. indyjskiej [93,94], afrykańskiej [90,92] czy koreańskiej [101] pobranych na czczo. Uzyskana w obecnej pracy średnia wartość różnicy pomiędzy LDLC_F a LDLC_D (-0,21mmol/l) była porównywalna z wynikami otrzymanymi u osób dorosłych: -0,28 mmol/l; metoda firmy Daiichi Pure Chemicals [93], -0,28 mmol/l; metoda firmy Daiichi Pure Chemicals [94], 0,30 mmol/l; metoda firmy Daiichi Pure Chemicals [90], -0,28 mmol/l; metoda firmy Kynowa Medex [101]. Nieco niższą średnią wartość różnicy wykazali Martins i wsp. (-0,11 mmol/l; metodę firmy Daiichi Pure Chemicals) [92]. Autorzy [97,98], którzy w badaniach

przeprowadzonych z wykorzystaniem próbek surowicy krwi pobranych na czczo i wysokim stężeniem TG jako jedynym kryterium odrzucenia otrzymano prawie dwukrotnie większe średnie wartości różnic pomiędzy $LDLC_F$ a $LDLC_D$: -0,43 mmol/l (metoda firmy Wako Pure Chemicals Industries) [98], -0,50 mmol/l (metoda firmy Kynowa Medex) [97]. Z kolei Choi i wsp. [102] i Sridevi i wsp. [99] wykazali niższe średnie wartości różnic pomiędzy $LDLC_F$ a $LDLC_D$ (odpowiednio -0,04 mmol/l; nie podano producenta metody, -0,06 mmol/l; metoda firmy Erba Mannheim) w próbkach o stężeniu TG poniżej 4,52 mmol/l, pobranych na czczo od osób dorosłych. Sridevi i wsp. [99] wyłączyli z badania próbki pochodzące od osób ze zdiagnozowaną cukrzycą, chorobami nerek, wątroby oraz chorobami serca. Natomiast Choi i wsp. [102] przeprowadził badanie próbek osób wśród których byli pacjenci ze zdiagnozowanym nadciśnieniem tętniczym (13,5%), cukrzycą (3,7%) oraz dyslipidemią (14,8%). Mimo, że badania były prowadzone w różnych populacjach nie było różnic w średnich wartościach pomiędzy $LDLC_F$ a $LDLC_D$ [99,102].

W piśmiennictwie można znaleźć także porównanie średnich wartości różnic ($LDLC_C$ a $LDLC_D$). Wzór Cordova powstał w oparciu o badania szpitalnej populacji brazylijskiej (pacjenci w wieku od 1 roku życia do 93 lat) [63]. W niniejszej pracy wykazano, że średnia wartość różnicy (-0,25 mmol/l) była większa od średnich wartości różnic podanych przez Onyenekwu i wsp. [90] (-0,18 mmol/l; metoda firmy Daiichi Pure Chemicals), Martins i wsp. [92] (-0,17 mmol/l; metodę firmy Daiichi Pure Chemicals) oraz mniejsza od średniej różnicy uzyskanej z danych opublikowanymi przez Choi i wsp. [102] (-0,31 mmol/l; nie podano producenta metody). Dodatkowo z danych przedstawionych przez Choi i wsp. [102] wynika, że średnia różnica pomiędzy $LDLC_C$ a $LDLC_D$ była mniejsza dla próbek pochodzących od pacjentów hospitalizowanych (-0,10 mmol/l) w porównaniu do średniej wartości różnicy wyliczonej dla próbek pochodzących od osób niehospitalizowanych (-0,31 mmol/l), co potwierdza przydatność stosowania tego wzoru w populacji szpitalnej.

Do oszacowania stężenia $LDLC_C$ wymagane jest jedynie oznaczenie stężenia TC i HDLC. Ważne jest to szczególnie dla dzieci bo umożliwia pobranie mniejszej objętości krwi. Jednak zaobserwowany w niniejszej pracy słaby ujemny trend między $(LDLC_C - LDLC_D)$ a $((LDLC_C + LDLC_D)/2)$ sugeruje, że wyniki stężenia $LDLC_C$ nie są porównywalne z wynikami stężenia $LDLC_D$ w analizowanym zakresie stężeń dla LDL. Dlatego też wzór Cordova nie powinien być stosowany w populacji

pediatrycznej. Porównywalny trend został przedstawiony również na wykresie Blanda-Altmana przez Onyenekwu i wsp. [90]. Z kolei Siddiquei wsp. [89] nie zaobserwowali trendu pomiędzy różnicą ($LDLC_C - LDLC_D$) a średnim stężeniem ($(LDLC_C + LDLC_D)/2$) natomiast zaobserwowali dodatni trend dla zależności pomiędzy ($LDLC_F - LDLC_D$) a ($(LDLC_F + LDLC_D)/2$). W piśmiennictwie brak jest prac porównujących stężenia LDLC oszacowane za pomocą wzoru Cordova a wartościami $LDLC_C$ oznaczonymi metodą bezpośrednią dla próbek pochodzących od pacjentów pediatrycznych.

Rozbieżności pomiędzy średnimi wartościami różnic ($LDLC_F - LDLC_D$) oraz ($LDLC_C - LDLC_D$) otrzymanymi w bieżącej pracy a danymi literaturowymi mogą wynikać m.in. z doboru badanej populacji, różnicy w składzie matrycy próbek badanych oraz zastosowanych metod do oznaczania stężenia LDLC o różnej czułości, swoistości i podatności na interferencje. Zatem porównywanie wyników stężenia LDLC, uzyskiwanych w różnych badaniach naukowych jest bardzo trudne a w konsekwencji trudne jest ustalanie decyzyjnych wartości w różnych algorytmach postępowania klinicznego.

Oszacowana wartość stężenia LDLC zależy od dokładności oznaczenia stężenia parametrów wchodzących w skład wzoru zastosowanego do wyliczenia stężenia LDLC. Im więcej składowych wzoru tym błąd oszacowanej wartości stężenia LDLC może być większy. Dodatkowo wartość błędu wzrasta przy niskich wartościach stężeń oznaczanych parametrów. W obecnej pracy przy zastosowaniu metody Passing-Bablok, wykazano, że dla próbek o stężeniu $LDLC_D$ poniżej 2,0 mmol/l, wartości stężeń LDLC oszacowane przy użyciu wzoru Friedewalda, wzoru Cordova i wzoru Planelli nie były porównywalne z wartościami stężeń $LDLC_D$. Dla próbek o stężeniu $LDLC_D$ powyżej 2,0 mmol/l, wykazano, że wartości stężeń LDLC oszacowane za pomocą analizowanych wzorów były średnio niższe od wartości stężeń $LDLC_D$ o 0,34 mmol/l dla wzoru Friedewalda; o 0,45 mmol/l dla wzoru Cordova i 0,17 mmol/l dla wzoru Planelli. Ponadto zaobserwowano słaby ujemny trend pomiędzy wartościami różnic ($LDLC_C - LDLC_D$) a średnimi wartościami stężeń ($(LDLC_C + LDLC_D)/2$) dla próbek o stężeniu $LDLC_D$ powyżej 2,0 mmol/l. Może to sugerować brak porównywalności wartości stężeń $LDLC_C$ z $LDLC_D$ w danym zakresie stężeń LDLC. Można wnioskować, że chociaż wzory do obliczania stężenia są powszechnie

stosowane i ogólnie dostępne, powinno się jednak zwracać uwagę na ograniczenia związane z zakresem stężeń jak i populacją.

Parametry wykorzystywane we wzorach do oszacowania stężenia LDLC również mogą mieć wpływ na porównywalność wyliczonych wartości stężeń LDLC z wartościami stężeń LDLC oznaczonymi metodami bezpośrednimi. Przykładem takiego parametru są triglicerydy. W większości stosowanych do oszacowania stężenia LDLC wzorach używane jest stężenie triglicerydów [103]. Wyjątek stanowi wzór Cordova, który nie uwzględnia stężenia TG [63]. Na wartość stężenia TG wpływa wiele czynników m.in. czas jaki upłynął od spożycia ostatniego posiłku do momentu pobrania próbki od pacjenta, dieta, aktywność fizyczna, wiek, płeć jak również choroby [104]. Bugajska i wsp. [105] wykazali, że zarówno niskie stężenia TG (poniżej 0,9 mmol/l) obserwowane u noworodków [105] jak i wysokie stężenia triglicerydów przyczyniają się do zwiększenia wartości błędu oszacowanego stężenia LDLC. Niezależnie podwyższone stężenie TG może przyczyniać się do wzrostu stężenia LDLC oznaczonego metodą bezpośrednią [19,106]. W niniejszej pracy stwierdzono statystycznie istotny ujemny trend pomiędzy wzrostem stężenia TG a wartościami różnic pomiędzy $LDLC_F$ i $LDLC_D$ oraz pomiędzy $LDLC_P$ i $LDLC_D$. Podobne wyniki dla zależności pomiędzy stężeniem TG a średnimi wartościami różnic pomiędzy $LDLC_F$ a $LDLC_D$ otrzymali inni autorzy [107,102,89,101,97,108]. Gupta i wsp. [94] oraz Sridevic i wsp. [99] zaobserwowali zwiększenie się średniej wartości różnicy pomiędzy $LDLC_F$ a $LDLC_D$ wraz ze wzrostem TG ale tylko do wartości stężenia TG 3,41 mmol/l. Dla wyższych stężeń TG (od 3,41 mmol/l do 4,55 mmol/l) zaobserwowali spadek średniej wartości różnicy pomiędzy $LDLC_F$ a $LDLC_D$ wraz ze wzrostem TG. Stężenie triglicerydów powyżej którego nie powinno się szacować stężenia LDLC ze wzoru Friedewalda wynosi 4,52 mmol/l [17]. Warunek ten został sprawdzony dla populacji osób dorosłych. Wyniki obecnej pracy sugerują, że stężenie TG powyżej którego nie należy stosować wzoru Friedewalda w populacji pediatrycznej powinno zostać obniżone. Dla próbek o stężeniu TG powyżej 3,0 mmol/l otrzymano szerszy rozrzut wartości różnic pomiędzy $LDLC_F$ a $LDLC_D$ niż dla próbek o stężeniu TG poniżej 3,0 mmol/l co zgodne jest w publikowanymi wcześniej danymi [105].

Podobnie, dla wzoru Cordova i wzoru Planelli wykazano szerszy rozrzut wartości różnic pomiędzy $LDLC_C$ a $LDLC_D$ oraz $LDLC_P$ a $LDLC_D$ dla próbek o stężeniu TG powyżej 3,0 mmol/l. Wartości stężeń triglicerydów nie są brane pod

uwagę przy szacowaniu stężenia LDLC za pomocą wzoru Cordova. W niniejszej pracy wykazano, że wraz ze wzrostem stężenia triglicerydów zmniejsza się średnia wartość różnicy pomiędzy $LDLC_C$ a $LDLC_D$. Porównywalne wyniki wykazali Wadhwa i wsp. [107] oraz Choi i wsp. [102] w grupie osób dorosłych. Niestety w obecnej pracy, zaobserwowano również ujemny trend pomiędzy $(LDLC_C - LDLC_D)$ a $((LDLC_C + LDLC_D)/2)$ niezależnie od stężenia triglicerydów. Sugeruje to brak porównywalności wartości stężeń LDLC oszacowanych ze wzoru Cordova z $LDLC_D$. W literaturze brak jest doniesień, w których porównywanoby wartości stężeń LDLC oszacowane ze wzoru Planelli z wartościami stężeń LDLC oznaczonymi metodą bezpośrednią w zależności od stężenia triglicerydów.

Matryca próbek surowic krwi pochodzących od pacjentów hospitalizowanych może być zmieniona w porównaniu do matrycy próbek surowic uzyskanych od osób zdrowych. Różnice są bardziej widoczne w przypadku surowic pacjentów z chorobami przewlekłymi, w których funkcja narządów m. in. nerek, wątroby czy trzustki może być nieprawidłowa [25]. To z kolei powoduje wzrost stężenia wielu analitów normalnie występujących w krwi, takich jak mocznik, kreatynina, glukoza a także do pojawienia się substancji, które w warunkach prawidłowych nie są obecne w łożysku naczyniowym [25]. Znacznie zmienioną matrycę krwi/surowicy obserwuje się dla próbek pochodzących od pacjentów z chorobami nerek, cukrzycą, otyłością czy z chorobami hematologiczno-onkologicznymi.

Jakiegokolwiek nieprawidłowości w funkcjonowaniu nerek przyczyniają się do zaburzenia homeostazy w organizmie [25], wzrostu stężenia mocznika, kreatyniny, kwasu moczowego oraz innych toksyn mocznicowych. Obserwowane są również zaburzenia gospodarki lipidowej charakteryzujące się hiperlipoproteinemią [24]. Inne stężenia różnych podstawowych analitów w surowicy krwi (inna matryca) mogą być przyczyną obserwowanych różnic pomiędzy oszacowanymi stężeniami LDLC a stężeniami oznaczonymi metodą bezpośrednią. W obecnej pracy wykazano, że zarówno dla próbek surowic o stężeniu mocznika poniżej 6,0 mmol/l oraz dla próbek o stężeniu kreatyniny poniżej 74,0 $\mu\text{mol/l}$ średnie wartości różnic pomiędzy $LDLC_F$ a $LDLC_D$, pomiędzy $LDLC_C$ a $LDLC_D$ oraz pomiędzy $LDLC_P$ a $LDLC_D$ różniły się istotnie statystycznie w porównaniu do odpowiadającym im średnim wartościom różnic dla próbek o stężeniu mocznika powyżej 6,0 mmol/l oraz dla próbek o stężeniu kreatyniny powyżej 74,0 $\mu\text{mol/l}$. Nie jest to dowodem na to, że te dwa anality mają

wpływ na obserwowane różnice ale jest pośrednim dowodem, że w surowicach z nieprawidłowym stężeniem mocznika lub kreatyniny można spodziewać się różnic pomiędzy oszacowanym a oznaczonym stężeniem LDLC.

W chorobach nerek obserwowane są zmiany w składzie krwi pacjenta. U pacjentów z ostrą niewydolnością nerek oraz u pacjentów z ostrym zapaleniem nerek występuje wzrost stężenia we krwi m. in. mocznika oraz kreatyniny. Natomiast w zespole nerczykowym obserwowana jest hipoalbuminemia oraz wzrost stężenia triglicerydów i cholesterolu całkowitego [25]. U pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek oprócz podwyższonego stężenia mocznika i kreatyniny wzrasta również stężenie kwasu moczowego i triglicerydów. Hipertriglicerydemia spowodowana jest najczęściej wzrostem wątrobowej syntezy triglicerydów z wolnych kwasów tłuszczowych [109] oraz obniżonym usuwaniem TG z układu krążenia [110,111]. W przewlekłej chorobie nerek upośledzony jest również metabolizm lipoprotein, obserwuje się wzrost ilości cząstek Lp(a) oraz małych gęstych LDL i obniżenie stężenia cholesterolu frakcji HDL [112]. Dodatkowo wzrasta ilość toksyn mocznicowych. Składniki mocznicowe wykazują różną zdolność przyłączania się do białek osocza krwi oraz różne właściwości biologiczne i nie zawsze dializa umożliwia ich całkowite usunięcie z organizmu, dlatego też mogą zakłócać pomiar stężenia LDLC metodą bezpośrednią oraz pomiar stężenia parametrów wchodzących w skład wzorów wykorzystywanych do szacowania stężenia LDLC. W obecnej pracy, dla próbek pochodzących od dzieci z przewlekłą chorobą nerek wykazano, że średnie wartości różnic pomiędzy $LDLC_F$ a $LDLC_D$ (0,31 mmol/l), pomiędzy $LDLC_C$ a $LDLC_D$ (0,29 mmol/l) oraz pomiędzy $LDLC_P$ a $LDLC_D$ (0,38 mmol/l) były wyższe w porównaniu do odpowiadających im średnich wartości różnic dla próbek o stężeniu mocznika powyżej 6,0 mmol/l oraz dla próbek o stężeniu kreatyniny powyżej 74,0 μ mol/l.

Dyslipidemia jest powszechnym problemem u dzieci z przewlekłą chorobą nerek [113]. W dużej mierze ocena dyslipidemii w tej grupie pacjentów opiera się o wyniki oznaczeń stężenia LDLC. Dlatego też uzyskanie wiarygodnego wyniku stężenia LDLC jest istotnym elementem w podjęciu decyzji klinicznej. Obecnie brak jest danych w literaturze na temat wpływu toksyn mocznicowych na oznaczenia LDLC u pacjentów pediatrycznych. W populacji pacjentów dorosłych hemodializowanych porównano wartości stężeń LDLC oszacowanych za pomocą wzoru Friedewalda i wzoru Palnelli z wartościami stężeń LDLC oznaczonymi metodą bezpośrednią firmy Genzyme

Diagnostics [67]. Średnie wartości różnic pomiędzy $LDLC_F$ a $LDLC_D$ oraz pomiędzy $LDLC_P$ a $LDLC_D$ wynosiły odpowiednio 0,08 mmol/l i -0,18 mmol/l, co wskazuje na wysoką porównywalność metod w badanej grupie w przeciwieństwie do uzyskanych w obecnej pracy wyników [67].

Podwyższone stężenie kwasu moczowego obserwowane jest nie tylko w niewydolności nerek, ale również w dnie moczanowej oraz zespołach mieloproliferacyjnych [25]. W obecnej pracy wykazano, że stężenie kwasu moczowego surowicy krwi nie wpływa istotnie na wartości średnich różnic pomiędzy $LDLC_F$ a $LDLC_D$, pomiędzy $LDLC_C$ a $LDLC_D$ oraz pomiędzy $LDLC_P$ a $LDLC_D$. Brak jest danych w literaturze na temat wpływu kwasu moczowego na oznaczenia LDLC u pacjentów pediatrycznych.

Dyslipidemia obserwowana jest także u pacjentów z chorobami onkologiczno-hematologicznymi. Profil lipidowy u pacjentów z rozpoznaną ostrą białaczką limfo- lub mieloblastyczną charakteryzuje się obniżonym stężeniem TC, HDLC i LDLC oraz wzrostem stężenia TG i VLDLC [114,115,116,117,118,119]. Hypocholesterolemia w tej grupie pacjentów może być spowodowana wzrostem aktywności i ilości receptorów dla cząsteczek LDL [118,120], obniżoną syntezą cholesterolu całkowitego [119,117] i apoproteiny A-I [117] lub wzrostem katabolizmu cholesterolu [119]. Dodatkowo u pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną obserwowany jest wzrost stężenia małych gęstych LDL [121]. Ponadto stosowane u pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną leki takie jak L-asparaginaza, kortykosteroidy czy leki immunosupresyjne mogą przyczyniać się do zaburzenia profilu lipidowego [122,114]. Po remisji choroby nowotworowej, wartości stężeń TC, HDLC, LDLC, TG i VLDLC wracają do wartości prawidłowych [115]. Powyżej zaprezentowane zmiany w metabolizmie lipoprotein oraz leki i ich metabolity mogą powodować zmianę składu matrycy i przyczyniać się do rozbieżności pomiędzy wynikami stężeń LDLC wyliczonymi za pomocą wzorów a oznaczonymi metodami bezpośrednimi. W bieżącej pracy porównano wartości stężeń LDLC oszacowane za pomocą wzoru Friedewalda, wzoru Cordova i wzoru Planelli z wartościami stężeń LDLC oznaczonymi bezpośrednio dla próbek pochodzących od pacjentów z chorobami onkologiczno-hematologicznymi. Wykazano, że średnie wartości różnic pomiędzy $LDLC_F$ a $LDLC_D$ (0,65 mmol/l) oraz $LDLC_C$ a $LDLC_D$ (0,61 mmol/l) były prawie dwukrotnie większe w porównaniu do średniej wartości różnicy pomiędzy $LDLC_P$ a $LDLC_D$ (0,34 mmol/l). Dodatkowo

wykazano, słaby ujemny trend pomiędzy ($LDLC_C - LDLC_D$) a $((LDLC_C + LDLC_D)/2)$, co sugeruje, że wyniki stężenia LDLC oszacowane za pomocą wzoru Cordova nie są porównywalne z wartościami stężenia $LDLC_D$ w analizowanym zakresie stężeń. Niestety brak jest danych w literaturze, z którymi można by porównać otrzymane wyniki. Sugeruje się aby u dzieci z chorobami onkologiczno-hematologicznymi przyjmując jednoznaczny sposób oceny stężenia LDLC, a na pewno należy wykorzystywać tylko jedną metodę (oszacowanie lub bezpośredni pomiar) w przypadku monitorowania dzieci z tymi schorzeniami.

U pacjentów z cukrzycą typu I, na skutek zaburzeń w gospodarce białkowej, mineralnej oraz lipidowej dochodzi do zmiany w składzie matrycy próbki. Niewystarczająca ilość insuliny powoduje zwolnienie szybkości syntezy lipidów, apolipoprotein oraz ogranicza syntezę receptorów B-100 i receptorów E. Utrzymujące się przez dłuższy okres czasu podwyższone stężenie glukozy we krwi powoduje glikację białek, lipoprotein LDL, HDL i VLDL oraz ich receptorów np. receptorów B-100 [123,75,124,125]. Glikacja receptorów B-100 utrudnia prawidłowe rozpoznawanie cząsteczek LDL. Należy również zwrócić uwagę, że budowa lipoprotein LDL, VLDL, IDL oraz HDL u pacjentów z cukrzycą typu I znacznie różni się od budowy lipoprotein osób zdrowych [126]. Również przyjmowane przez pacjentów leki oraz ich metabolity powodować mogą zmianę matrycy [123]. Zmodyfikowane pod wpływem procesu glikacji lipoproteiny LDL mogą przyczyniać się do obniżenia swoistości metod do oznaczania stężenia LDLC jak również, wpływać na oznaczenia parametrów stosowanych do oszacowywania stężenia LDLC. W niniejszej pracy wykazano, że dla próbek o stężeniu HbA1c poniżej 6,0% średnie wartości różnic pomiędzy $LDLC_F$ a $LDLC_D$, pomiędzy $LDLC_C$ a $LDLC_D$ oraz pomiędzy $LDLC_P$ a $LDLC_D$ różniły się istotnie statystycznie w porównaniu do odpowiadającym im średnim wartościom różnic dla próbek o stężeniu HbA1c powyżej 6,0%. Obecność glikowanych białek może wpływać na oznaczenie stężenia $LDLC_D$ lub też może wpływać na oznaczenia stężenia TC, TG, HDLC czy apoB. Brak jest doniesień literaturowych, w których autorzy porównywaliby stężenia LDLC wyliczone za pomocą wzorów ze stężeniami LDLC oznaczonymi metodą bezpośrednią z równoczesnym uwzględnieniem stężenia glukozy lub stężenia HbA1c. W bieżącej pracy nie wykazano, wpływu stężenia glukozy na wartości średnich różnic pomiędzy $LDLC_F$ a $LDLC_D$, pomiędzy $LDLC_C$ a $LDLC_D$ oraz pomiędzy $LDLC_P$ a $LDLC_D$, co sugeruje, że na rozbieżność wyników stężeń LDLC pomiędzy oszacowanymi

a oznaczonymi wartości mogą mieć wpływ białka glikowane a nie glukoza. Na podstawie pojedynczego pomiaru stężenia glukozy nie można określić jak bardzo nasilony jest proces glikacji białek. Podwyższone stężenie glukozy powyżej 5,6 mmol/l może wynikać z niewłaściwego pobrania krwi m.in. z pobrania materiału nie na czczo lub zanieczyszczenia próbki roztworami infuzyjnymi.

U pacjentów z otyłością dochodzi do zaburzeń w gospodarce węglowodanowej i lipidowej [127], obserwuje się upośledzoną tolerancję glukozy, insulinoporność, obniżone stężenie HDLC i wzrost stężenia TG [127], nasilenie procesów glikacji oraz oksydacji lipidów. W niniejszej pracy wykazano, że u pacjentów z otyłością niezależnie od zastosowanego wzoru średnie wartości różnic pomiędzy $LDLC_F$ a $LDLC_D$ (-0,45 mmol/l), pomiędzy $LDLC_C$ a $LDLC_D$ (-0,51 mmol/l) oraz pomiędzy $LDLC_P$ a $LDLC_D$ (-0,48 mmol/l) są porównywalne. Zaobserwowano także ujemny trend pomiędzy $(LDLC_C - LDLC_D)$ a $((LDLC_C + LDLC_D)/2)$ oraz pomiędzy $(LDLC_P - LDLC_D)$ a $((LDLC_P + LDLC_D)/2)$, co sugeruje brak porównywalności wartości stężeń LDLC oszacowanych za pomocą wzoru Cordova i wzoru Planelli z wartościami LDLC oznaczonymi metodą enzymatyczną. Można przypuszczać, że zmiany składu matrycy próbki u pacjentów z otyłością mogą wpływać na oznaczanie stężenia LDLC metodą enzymatyczną lub na oznaczanie stężenia parametrów stosowanych do szacowania LDLC.

Białka odgrywają istotną rolę w organizmie odpowiadają za utrzymanie ciśnienia osmotycznego, pełnią funkcje enzymatyczne, immunologiczne, transportowe [25]. Ostre stany zapalne, marskość wątroby, choroby nerek czy nowotwory powodują zmiany w składzie ilościowym i jakościowym białek [25]. W niniejszej pracy wykazano, że stężenie białka całkowitego nie wpływa na różnice pomiędzy $LDLC_F$ a $LDLC_D$ oraz pomiędzy $LDLC_C$ a $LDLC_D$. Natomiast wykazano, że średnia wartość różnicy pomiędzy $LDLC_C$ a $LDLC_D$ jest większa dla próbek o stężeniu białka całkowitego powyżej 60,0 g/l niż dla próbek o stężeniu poniżej 60,0 g/l. Dodatkowo zaobserwowano ujemny korelację pomiędzy $(LDLC_C - LDLC_D)$ a $((LDLC_C + LDLC_D)/2)$. Sugeruje to, że wartości stężeń LDLC oszacowane ze wzoru Cordova nie były porównywalne z wartościami stężeń $LDLC_D$.

Metody bezpośrednie jak i wzory stosowane do oszacowywania stężenia cholesterolu frakcji LDL mają swoje ograniczenia, które uwidaczniają się szczególnie przy zmianach ilościowych i strukturalnych lipoprotein [128]. Może to przyczyniać się do wystąpienia różnic pomiędzy stężeniem LDLC oszacowanym przy użyciu wzoru

a oznaczonym metodą bezpośrednią, co może wpływać na decyzje kliniczne [128]. Zarówno metody do bezpośredniego oznaczania LDLC jak i wzory do szacowania LDLC są najczęściej sprawdzane na populacji osób dorosłych. Należy zauważyć, że wiarygodny pomiar stężenia LDLC_D zależy w dużym stopniu od komutabilności matrycy próbki pacjenta z matrycą kalibratorów [25,54]. W niniejszej pracy analizowane próbki pochodziły od hospitalizowanych pacjentów pediatrycznych. Skład matrycy badanych próbek mógł różnić się od matrycy próbek pobieranych od zdrowych dzieci oraz od matrycy próbek pochodzących od osób dorosłych. Zmieniony skład matrycy próbki może powodować zmniejszenie swoistości metod do bezpośredniego oznaczania stężenia LDLC jak i metod stosowanych do oznaczania parametrów wykorzystywanych we wzorach do szacowania stężenia LDLC, a co za tym idzie powodować większe rozbieżności pomiędzy wynikami uzyskanymi z metody bezpośredniej a wynikami oszacowanymi ze stosowanych wzorów [128]. Metody bezpośrednie mają dobrą zgodność z metodą referencyjną tylko dla próbek pochodzących od osób zdrowych [48,129]. Natomiast dla próbek pochodzących od osób chorych dostępne metody bezpośredniego oznaczania LDLC wykazują znacznie większą wartość błędu całkowitego niż wartość dopuszczalna przez NCEP [48,129]. Dlatego też w próbkach pochodzących od pacjentów z przewlekłymi chorobami, przy monitorowaniu stężenia LDLC, należałoby oznaczać stężenie LDLC zawsze tą samą metodą bezpośrednią lub zawszeszacować wybranym wzorem.

Można się sprzeczać o wartość diagnostyczną oszacowanych stężeń LDLC i ich przydatność w różnych grupach wiekowych czy grupach klinicznych. Można też krytykować każdy wzór służący temu celowi. Ale przy tak znacznym ulepszeniu metod oznaczania stężenia cholesterolu frakcji LDL nadal publikowane są prace oceniające przydatność oszacowanych wartości stężeń LDLC w zależności od stężenia cholesterolu całkowitego, triglicerydów w różnych jednostkach chorobowych [130]. Pokazuje to, że ani metoda bezpośrednia, ani wzory stosowane do oszacowania stężenia LDLC nie są w 100% wiarygodne. Chociaż w wielu wypadkach różnice stężeń LDLC uzyskane metodą bezpośrednią i w oparciu o dany wzór nie są istotne statystycznie, to u niektórych pacjentów może się zdarzyć, że przy konkretnym obrazie klinicznym i dodatnim wywiadzie rodzinnym różnice te będą przyczynkiem do włączenia leczenia hipolipemizującego.

6. Wnioski

1. Różnice pomiędzy stężeniem LDLC mierzonym metodą bezpośrednią a stężeniem oszacowanym zależą w znacznym stopniu od składu matrycy próbki oraz zastosowanego wzoru.
2. U dzieci z otyłością i chorobami nowotworowymi stwierdza się większe różnice stężeń LDLC uzyskanych bezpośrednio i oszacowanych ze wzorów w porównaniu do dzieci z cukrzycą typu I i dzieci z przewlekłą chorobą nerek.
3. Ze względu na istotne różnice pomiędzy stężeniem LDLC oznaczonym metodą bezpośrednią a stężeniem oszacowanym ze wzorów monitorowanie terapii hipolipemizującej powinno prowadzić się w oparciu o ten sam sposób oceny stężenia LDLC.

7. Streszczenie

Miażdżycy jest złożonym, wieloczynnikowym procesem polegającym na gromadzeniu się w błonie wewnętrznej naczyń krwionośnych nadmiernych ilości cholesterolu oraz innych lipidów. Miażdżycy może rozpocząć się już w dzieciństwie. Wysokie stężenie cholesterolu całkowitego (TC), cholesterolu frakcji LDL (LDLC), cholesterolu frakcji VLDL (VLDLC) i niskie stężenie cholesterolu frakcji HDL (HDLC) w surowicy wpływają na szybkość rozwoju miażdżycy u dzieci. Według zaleceń National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Blood Cholesterol Levels in Children and Adolescence stężenie cholesterolu frakcji LDL (LDLC) jest głównym parametrem klasyfikującym pacjentów pod względem ryzyka rozwoju chorób sercowo-naczyniowych. Ze względu na rolę jaką cholesterol frakcji LDL pełni w rozwoju miażdżycy wydaje się istotne uzyskanie wiarygodnego wyniku stężenia LDLC w surowicy krwi. U pacjentów z chorobami przewlekłymi, noworodków, niemowlaków, dzieci i pacjentów geriatrycznych stwierdza się duże różnice w składzie matrycy próbek surowic w porównaniu do surowic pochodzących od osób zdrowych. Dlatego też uzyskanie porównywalności pomiędzy matrycą próbek pacjentów a matrycą kalibratorów jest trudne do osiągnięcia. Co więcej, stężenie cholesterolu frakcji LDL może być nie tylko mierzone metodą bezpośrednią ale również oszacowywane przy użyciu wzorów. Dlatego istotne wydaje się sprawdzenie porównywalności pomiędzy wartościami stężeń LDLC oszacowanymi za pomocą wzorów a stężeniem LDLC oznaczonym metodą bezpośrednią.

Celem pracy było porównanie wartości stężeń cholesterolu frakcji LDL oszacowanych przy użyciu wzoru Friedewalda, wzoru Cordova i wzoru Planelli z wartościami stężeń LDLC oznaczonymi metodą bezpośrednią dla próbek pochodzących od dzieci hospitalizowanych z uwzględnieniem wieku pacjenta, jednostki chorobowej i matrycy próbki.

Dla potrzeb niniejszej pracy zebrano 549 surowic dzieci w wieku od pierwszego dnia życia do 18 lat leczonych w Uniwersyteckim Szpitalu Dziecięcym w Krakowie, które pozostały po wykonaniu rutynowych badań. Kryterium włączenia próbki do badania było oznaczenie stężenia mocznika, kreatyniny, białka całkowitego, glukozy, kwasu moczowego i/lub hemoglobiny glikowanej w trybie rutynowym. W oparciu o historię choroby uzyskano jednoznaczną informację o jednostkach chorobowych 213 dzieci (92 dzieci – cukrzyca typu I, 26 – otyłość, 31 – przewlekła choroba nerek, 44 –

choroby nowotworowe). We wszystkich surowicach wykonano oznaczenie stężenia cholesterolu całkowitego (TC), triglicerydów (TG), cholesterolu frakcji HDLC, cholesterolu frakcji LDLC i apoproteiny B (apoB) na analizatorze Vitros 5.1 FS (Firma Ortho-Clinical Diagnostics, United Kindom) z zastosowaniem odczynników i kalibratorów firmy Johnson & Johnson Clinical Diagnostics Rochester, USA. Surowice, w których stężenie triglicerydów wynosiło powyżej 4,56 mmol/l nie były brane pod uwagę. Dodatkowo oszacowano stężenie LDLC z wykorzystaniem wzoru Friedewalda ($LDLC_F = TC[\text{mmol/l}] - TG[\text{mmol/l}]/2,2 - HDLC[\text{mmol/l}]$), wzoru Cordova ($LDLC_C = 3/4 * (TC[\text{mmol/l}] - HDLC[\text{mmol/l}])$) i wzoru Planelli ($LDLC_P = 0,41 * TC[\text{mmol/l}] - 0,32 * TG[\text{mmol/l}] + 1,7 * apoB[\text{g/l}] - 0,27$).

W niniejszej pracy wykazano, że średnie wartości stężeń: $LDLC_F$ i $LDLC_C$ były istotnie statystycznie niższe w porównaniu do średniej wartości $LDLC_D$ dla wszystkich analizowanych próbek oraz dla próbek pobranych od dzieci powyżej 1 roku życia (we wszystkich przypadkach $p < 0,0001$). Natomiast nie wykazano istotnej statystycznie różnicy pomiędzy średnią wartością $LDLC_P$ a $LDLC_D$ dla wszystkich zebranych próbek. Uzyskano wysokie wartości współczynników korelacji dla zależności pomiędzy wartościami stężeń $LDLC_F$, $LDLC_C$, $LDLC_P$ a stężeniem $LDLC_D$ dla wszystkich próbek, dla próbek od dzieci poniżej i powyżej 1 roku życia oraz dla próbek pochodzących od dzieci z cukrzycą, otyłością i chorobami nowotworowymi ($r = 0,733$ do $r = 0,887$; we wszystkich przypadkach $p < 0,001$). Niższą wartość współczynników korelacji zaobserwowano dla próbek pochodzących od dzieci z przewlekłą chorobą nerek ($r = 0,492$ do $r = 0,525$; we wszystkich przypadkach $p < 0,001$). Przy zastosowaniu metody Blanda-Altmana wykazano, że stężenia $LDLC_C$ nie były porównywalne ze stężeniami $LDLC_D$ w analizowanym zakresie stężeń LDLC dla wszystkich zebranych próbek. Przeprowadzono analizę z uwzględnieniem jednostki chorobowej i wykazano brak porównywalności pomiędzy stężeniem $LDLC_C$ a stężeniem $LDLC_D$ dla próbek pochodzących od dzieci z otyłością oraz dla próbek od dzieci z chorobami nowotworowymi. Ponadto dla próbek pochodzących od dzieci z otyłością wykazano brak porównywalności wyników stężeń $LDLC_P$ z wartościami stężeń $LDLC_D$. Wykazano również, że dla próbek o stężeniu LDLC poniżej 2,0 mmol/l wartości stężenia $LDLC_F$, $LDLC_C$ i $LDLC_P$ nie były porównywalne z wartościami stężeń $LDLC_D$. Natomiast dla próbek o stężeniu LDLC powyżej 2,0 mmol/l jedynie wartości stężenia $LDLC_C$ nie były porównywalne z $LDLC_D$. Dla różnicy pomiędzy $LDLC_F$ i $LDLC_D$ oraz pomiędzy $LDLC_P$ i $LDLC_D$ zaobserwowano istotnie statystycznie ujemny

trend wraz ze wzrostem stężenia TG (w obu przypadkach $p < 0,001$). W przeciwieństwie do tego dla różnicy pomiędzy $LDLC_C$ i $LDLC_D$ stwierdzono istotnie statystycznie dodatni trend wraz ze wzrostem stężenia TG ($p < 0,05$). Zaobserwowano również większy rozrzut wartości pomiędzy $LDLC_F$ i $LDLC_D$, pomiędzy $LDLC_C$ i $LDLC_D$ oraz pomiędzy $LDLC_P$ i $LDLC_D$ dla próbek o stężeniu HbA1c powyżej 6,0% w porównaniu do odpowiadającym im wartością różnic dla próbek o stężeniu HbA1c poniżej 6,0%. Natomiast dla próbek o stężeniu mocznika $< 6,0$ mmol/l średnie wartości różnic pomiędzy $LDLC_F$ i $LDLC_D$, pomiędzy $LDLC_C$ i $LDLC_D$ oraz pomiędzy $LDLC_P$ i $LDLC_D$ były istotnie statystycznie większe w porównaniu do odpowiadającym im średnim wartością dla próbek o stężeniu mocznika $\geq 6,0$ mmol/l (we wszystkich przypadkach $p < 0,001$). Stwierdzono również mniejsze średnie wartości różnicy pomiędzy $LDLC_C$ i $LDLC_D$ dla próbek o stężeniu białka całkowitego poniżej 60,0 g/l w porównaniu do wartości uzyskanych dla próbek o stężeniu białka całkowitego powyżej 60,0 g/l ($p < 0,001$).

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że różnice pomiędzy stężeniem LDLC mierzonym metodą bezpośrednią a stężeniem oszacowanym zależą w znacznym stopniu od składu matrycy próbki oraz zastosowanego wzoru. U dzieci z otyłością i chorobami nowotworowymi stwierdza się większe różnice stężeń LDLC uzyskanych bezpośrednio i oszacowanych ze wzorów w porównaniu do dzieci z cukrzycą typu I i dzieci z przewlekłą chorobą nerek. Ze względu na istotne różnice pomiędzy stężeniem LDLC oznaczonym metodą bezpośrednią a stężeniem oszacowanym ze wzorów monitorowanie terapii hipolipemizującej powinno prowadzić się w oparciu o ten sam sposób oceny stężenia LDLC.

8. Summary

Atherosclerosis is a complex multifactorial process that is determined by an accumulation of cholesterol and other lipids within the intima of artery. The process of atherosclerosis can begin early in life. High serum concentration of total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDLC), very-low-density lipoprotein cholesterol (VLDLC) and low concentration of high-density lipoprotein cholesterol (HDLC) is correlated with the extent of early atherosclerotic in children. According to the recommendations of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Blood Cholesterol Levels in Children and Adolescence, measurement of serum LDLC concentration, may be helpful in the stratification of risk and the management of cardiovascular disease. The LDLC plays a key role in the development of atherosclerosis, thus accurate measurement of LDLC concentration in children is very important. In patients with chronic diseases, newborns, infants, children and geriatric patients many rapid biochemical changes occur which could affect the sample matrix. Therefore the comparability between patients samples and calibrators is difficult to achieve. Moreover, concentration of LDLC instead of measuring might be calculated. For this reason checking the comparability between LDLC estimated by formulas and direct LDLC is important.

The aim of the study was to compare LDL cholesterol concentration calculated by the Friedewald, the Cordova and the Planelli formulas and LDLC measured by direct method in serum samples from pediatric patients.

Five hundred forty-nine leftover serum samples were collected from children aged from 1 month to 18 years hospitalized in University Children's Hospital in Cracow. Concentration of urea, creatinine, total protein, glucose, uric acid and/or hemoglobin A1c in serum samples were determined. 213 children were divided into groups with regards to medical record (type I diabetes (n=92), obesity (n=46), chronic kidney disease (n=31) and cancer (n=44)). In all serum samples total cholesterol (TC), triglycerides (TG), high-density lipoprotein cholesterol (HDLC), low-density lipoprotein cholesterol (LDLC) and apoprotein B (apoB) were measured on a Vitros 5.1 FS Chemistry System (Ortho-Clinical Diagnostics, United Kingdom) using the manufacturer's reagents and calibrators (Johnson & Johnson Clinical Diagnostics Rochester, USA). The serum samples with TG concentration above 4,56 mmol/l were excluded from all analyses. In addition, the LDLC concentration was estimated for each sample using Friedewald formula: $(LDLC_F[\text{mmol/l}] = TC[\text{mmol/l}] - HDLC[\text{mmol/l}] -$

TG[mmol/l]/2,22), Cordova formula: $(LDLC_C[mmol/l]=\frac{3}{4}*(TC[mmol/l]-HDL_C[mmol/l])$
 and Planelli formula: $(LDLC_P[mmol/l]=0,41*TC[mmol/l]-0,32*TG[mmol/l]+1,7*apoB[g/l]-0,27)$.

The results of this study indicated that the means of the $LDLC_F$ and $LDLC_C$ concentration were significantly lower compared to the mean of the $LDLC_D$ in all serum samples and in serum samples from children over 1 years of age (in all cases $p<0,0001$). Nevertheless, there was not statistically significant difference between the means of the $LDLC_P$ and $LDLC_D$ in all serum samples. The high correlations between $LDLC_D$ concentration and LDLC calculated by all formulas in all serum samples ($r=0,763$ do $r=0,789$; in all cases $p<0,001$) were noticed. Also the high correlations were observed in serum samples from children with type I diabetes, obesity and cancer ($r=0,733$ do $r=0,887$; in all cases $p<0,001$). The lower correlations were showed in serum samples from children with chronic kidney disease ($r=0,492$ do $r=0,525$; in all cases $p<0,001$). Bland-Altman analysis was used to find the agreement between calculated LDLC and direct measured LDLC. This analysis showed, that the values of $LDLC_F$ and $LDLC_P$ were comparable to the values of $LDLC_D$, nevertheless the values of $LDLC_C$ were not comparable to the values of $LDLC_D$ in samples from all children. Moreover, the values of $LDLC_C$ were not comparable to the values of $LDLC_D$ in samples from patients with obesity and cancer. Furthermore, the values of $LDLC_P$ were not comparable to the values of $LDLC_D$ in samples from obese children. In serum samples with $LDLC < 2,0$ mmol/l the values of $LDLC_F$, $LDLC_C$ and $LDLC_P$ were not comparable to the values of $LDLC_D$. Whereas for serum samples with $LDLC \geq 2,0$ mmol/l only values of $LDLC_C$ were not comparable to the values of $LDLC_D$. Also, Bland-Altman plots were used to find the agreement between calculated LDLC and direct method related to components of samples. In the samples from all children, the differences between $LDLC_F$ and $LDLC_D$ as well as for the differences between $LDLC_P$ and $LDLC_D$ were negatively correlated with TG concentration (in both cases $p<0,001$). In contrast, the differences between $LDLC_C$ and $LDLC_D$ were positive correlated with TG concentration ($p<0,05$). On the other hand, more widespread of the mean values of differences between ($LDLC_F$ and $LDLC_D$) between ($LDLC_C$ and $LDLC_D$) and between ($LDLC_P$ and $LDLC_D$) for samples with HbA1c above 6,0% than for samples with HbA1c below 6,0% were observed. In samples with concentration of urea below 6,0 mmol/l the mean values of differences between ($LDLC_F$ and $LDLC_D$), between ($LDLC_C$ and $LDLC_D$) and between ($LDLC_P$ and $LDLC_D$) were significantly higher compared to

the mean values of differences obtained in samples with concentration of urea above 6,0 mmol/l (in all cases $p < 0,001$). Whereas, the mean value of differences (LDLC_C and LDLC_D) was significantly lower in samples with concentration of total protein below 60,0 g/l compared to the mean value of differences obtained in samples with concentration of total protein above 60,0 g/l ($p < 0,001$).

The obtained results indicated that the differences between concentration of LDLC determined and estimated depend on composition of samples matrix and formula which is used to calculated. There is the higher difference between concentration of determined LDLC and estimated using different formulas in serum samples either from children with obesity or children with cancer than in serum samples from children with type I diabetes and children with chronic kidney disease. In the monitoring of the hypolipemic therapy, the same LDLC method should be using, due to the significant differences between the determined LDLC by the direct method and the LDLC concentration estimated by the different formulas.

9. Bibliografia

- [1] S. Mendis, P. Puska i B. Norrving, “*Global atlas on cardiovascular disease prevention and control.*,” World Health Organization, 2015, ISBN: 978 92 4 156437 3.
- [2] A. Skoczyńska, “*Patogeneza miażdżycy.*,” Elsevier Urban & Partner, 2006, ISBN: 83-60290-02-4.
- [3] R. Ross, “Atherosclerosis is an inflammatory disease.,” *Am. Heart J.*, vol. 138, no. 5 Pt 2, pp. 419-20, Nov. 1999.
- [4] S. R. Daniels i F. R. Greer, “Lipid screening and cardiovascular health in childhood.,” *Pediatrics*, vol. 122, no. 1, pp. 198–208, Jul. 2008.
- [5] “European Cardiovascular Disease Statistics 2017”, dostępny: www.ehnheart.org/cvd-statistics.html.
- [6] B. W. McCrindle, P. O. Kwiterovich, P. E. McBride, S. R. Daniels i R.E. Kavey, “Guidelines for lipid screening in children and adolescents: bringing evidence to the debate.,” *Pediatrics*, vol. 130, no. 2, pp. 353–356, Aug. 2012.
- [7] C. Napoli, C. K. Glass, J. L. Witztum, R. Deutsch, F. P. D’Armiento i W. Palinski, “Influence of maternal hypercholesterolaemia during pregnancy on progression of early atherosclerotic lesions in childhood: Fate of Early Lesions in Children (FELIC) study.,” *Lancet*, vol. 354, no. 9186, pp. 1234–1241, Oct. 1999.
- [8] L. S. Webber, S. R. Srinivasan, W. A. Wattigney i G. S. Berenson, “Tracking of serum lipids and lipoproteins from childhood to adulthood. The Bogalusa Heart Study.,” *Am. J. Epidemiol.*, vol. 133, no. 9, pp. 884–899, May 1991.
- [9] B. Uznańska, M. Plewka, “Rewizja wytycznych dotyczących leczenia zaburzeń lipidowych wysokiego ryzyka u dzieci i młodzieży — najnowsze stanowisko The American Heart Association,” *Cardiovasc. Forum*, vol. 12, no. 1–2, pp. 32–38, 2007.
- [10] J.P. Strong, C. A. McMahan, M.C. Oalman i G.T. Malcom, “Natural history of aortic and coronary atherosclerotic lesions in youth. Findings from the PDAY Study. Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Research Group.,” *Arterioscler. Thromb.*, vol. 13, no. 9, pp. 1291–1298, Sep. 1993.
- [11] G. S. Berenson, S. R. Srinivasan, W. Bao, W. P. 3rd Newman, R. E. Tracy i W. A. Wattigney, “Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. The Bogalusa Heart Study.,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 338, no.

- 23, pp. 1650–1656, Jun. 1998.
- [12] M. Urban, “*Miażdżyca u dzieci i młodzieży.*” Cornetis, 2007, ISBN: 83-919540-3-X.
- [13] “Pediatrics Official Journal of the American Academy of Pediatric - Overview and Summary,” *Pediatrics*, vol. 89, no. 3, pp. 524-528, March 1992, dostępny: <http://pediatrics.aappublications.org/content/89/3/525>
- [14] P. S. Jellinger, D.A. Smith, A.E. Mehta i wsp., “American Association of Clinical Endocrinologists’ Guidelines for Management of Dyslipidemia and Prevention of Atherosclerosis: executive summary.,” *Endocr. Pract.*, vol. 18, no. 2, pp. 269–293, Mar-Apr. 2012.
- [15] S.R.Daniels, I.Benuck, D.A. Christakis i wsp. “Expert panel on integrated guidelines for cardiovascular health and risk reduction in children and adolescents: summary report.,” *National Institutes of Health Publication No. 12-7486A*, October 2012, dostępne: https://www.nhlbi.nih.gov/files/docs/peds_guidelines_sum.pdf
- [16] S.M. Grundy, D. Becker i wsp. “Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report.,” *Circulation*, vol. 106, no. 25, pp. 3143–3421, Dec. 2002.
- [17] P. S. Bachorik i wsp. “Recommendations on Lipoprotein Measurement From the Working Group on Lipoprotein Measurement,” *National Institutes of Health, National Heart, Lung, Blood Institute, NIH Publication, No. 95-3044*, Sep.1995.
- [18] R. K. Murray i wsp. “Biochemia Harpera,” pod red. F. Kokot, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, ISBN: 978-83-200-4554-3, 2015.
- [19] E. T. Bairaktari, K. I. Seferiadis i M. S. Elisaf, “Evaluation of methods for the measurement of low-density lipoprotein cholesterol.,” *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.*, vol. 10, no. 1, pp. 45–54, Mar. 2005.
- [20] A. Michajlik i E. Bartnikowska, “Lipidy i lipoproteiny osocza.,” Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, ISBN 83-200-2240-1, 1999.
- [21] B. Cybulska i L. Kłosiewicz-Latoszek, “Zaburzenia lipidowe.,” Wydawnictwa Medyczne Termedia, Poznań, ISBN:9788362138272, 2010.
- [22] J. Gmiński i J. Kopeć, “Małe gęste LDL - wyzwanie terapeutyczne dla statyn.,” *Przew. Lek.*, vol. 6, no. 7/8, pp. 36–42, 2003.

- [23] M. Kuliszewicz-Janus, A. Saeed Mohamed i N. Abod, "Biologia lipoproteiny HDL i jej przeciwmiażdżycowe działanie.," *Postep. Hig Med Dosw.*, vol. 60, pp. 307–315, 2006.
- [24] H. Szafran i M. Knapik-Czajka, "Podstawy biochemiczne gospodarki lipidowej organizmu człowieka.," Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, ISBN: 83-86101-04-0, 1994.
- [25] A. Dembińska-Kieć i J. W. Naskalski, "Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej.," Elsevier Urban & Partner, Wrocław, ISBN:978-83-7609-137-2, 2010.
- [26] J. W. Gofman, O. Delalla i wsp., "The serum lipoprotein transport system in health, metabolic disorders, atherosclerosis and coronary heart disease.," *J. Clin. Lipidol.*, vol. 1, no. 2, pp. 104–141, May 2007.
- [27] D. W. Swinkels, P. N. Demacker, J. C. Hendriks i A. van 't Laar, "Low density lipoprotein subfractions and relationship to other risk factors for coronary artery disease in healthy individuals.," *Arteriosclerosis*, vol. 9, no. 5, pp. 604–613, Sep.-Oct. 1989.
- [28] C. J. Packard i J. Shepherd, "Lipoprotein heterogeneity and apolipoprotein B metabolism.," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 17, no. 12, pp. 3542–3556, Dec. 1997.
- [29] K. K. Berneis i R. M. Krauss, "Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity.," *J. Lipid Res.*, vol. 43, no. 9, pp. 1363–1379, Sep. 2002.
- [30] D. J. Betteridge, D. R. Illingworth i J. Shepherd, "Lipoproteins in health and disease.," Arnold, Oxford University Press, Londyn, 1999.
- [31] "National Reference System for Cholesterol Cholesterol Reference Method Laboratory Network LDL Cholesterol Certification Protocol for Manufacturers LDL Cholesterol Method Certification Protocol for Manufacturers.," 2006, dostępny: www.cdc.gov/labstandards/pdf/crmln/MFRLDLJune2006final.pdf.
- [32] M. Nauck, G. R. Warnick i N. Rifai, "Methods for measurement of LDL-cholesterol: a critical assessment of direct measurement by homogeneous assays versus calculation.," *Clin. Chem.*, vol. 48, no. 2, pp. 236–254, Feb. 2002.
- [33] M. Nakamura, Y. Kayamori i wsp., "LDL cholesterol performance of beta quantification reference measurement procedure.," *Clin. Chim. Acta.*, vol. 431, pp. 288–293, Apr.

2014.

- [34] T. G. Cole i D. W. Gibson, "Evaluation of heat-sealed ultracentrifuge tubes in the isolation of plasma lipoproteins.," *J. Lipid Res.*, vol. 25, no. 3, pp. 312–314, Mar. 1984.
- [35] L.L. Abel, B.B. Levy, B.B. Brodie i F.E. Kendall, "A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity.," *J. Biol. Chem.*, vol. 195, no. 1, pp. 357–366, Mar. 1952.
- [36] B. Neumeister i wsp., "Diagnostyka laboratoryjna - poradnik kliniczny. ," pod red. M. Pietruczuk, Elsevier Urban & Partner, Wrocław, ISBN: 978-83-7609-804-3, 2013.
- [37] R. Siekmeier, W. Marz i W. Gross, "Precipitation of LDL with sulfated polyanions: three methods compared.," *Clin. Chim. Acta.*, vol. 177, no. 3, pp. 221–230, Oct. 1988.
- [38] N. Rifai, G.R. Warnick, J.R. McNamara i wsp. "Measurement of low-density-lipoprotein cholesterol in serum: a status report.," *Clin. Chem.*, vol. 38, no. 1, pp. 150–160, Jan. 1992.
- [39] P.N. Demacker, A.G. Hijmans, B.J. Breninkmeijer, A.P. Jansen i A. van 't Laar, "Five methods for determining low-density lipoprotein cholesterol compared.," *Clin. Chem.*, vol. 30, no. 11, pp. 1797–1800, Nov. 1984.
- [40] G. Assmann, H.U. Jabs, W. Nolte i H. Schriewer, "Precipitation of LDL with sulphopolyanions: a comparison of two methods for LDL cholesterol determination.," *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, vol. 22, no. 11, pp. 781–785, Nov. 1984.
- [41] R. Siekmeier, W. Marz i W. Gross, "Insufficient accuracy and specificity of polyanion precipitation methods for quantifying low-density lipoproteins.," *Clin. Chem.*, vol. 36, no. 12, pp. 2109–2113, Dec. 1990.
- [42] J.R. McNamara, T.G. Cole, J.H. Contois, C.A. Ferguson, J.M. Ordovas i E. J. Schaefer, "Immunoseparation method for measuring low-density lipoprotein cholesterol directly from serum evaluated.," *Clin. Chem.*, vol. 41, no. 2, pp. 232–240, Feb. 1995.
- [43] G. Schectman, M. Patsches i E.A. Sasse, "Variability in cholesterol measurements: comparison of calculated and direct LDL cholesterol determinations.," *Clin. Chem.*, vol. 42, no. 5, pp. 732–737, May 1996.
- [44] N. Harris, E.J. Neufeld, J.W. Newburger i wsp., "Analytical performance and clinical utility of a direct LDL-cholesterol assay in a hyperlipidemic pediatric population.," *Clin. Chem.*, vol. 42, no. 8 Pt 1, pp. 1182–1188, Aug. 1996.

- [45] K. L. Becker, J.P. Bilezikian, W.J. Bremner i wsp., "Principles and practice of endocrinology and metabolism.," Lippincott Williams & Wilkins, ISBN-13: 978-0781717502, 2001.
- [46] I. Jialal, S. V Hirany, S. Devaraj i T. A. Sherwood, "Comparison of an immunoprecipitation method for direct measurement of LDL-cholesterol with beta-quantification (ultracentrifugation).," *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 104, no. 1, pp. 76–81, Jul. 1995.
- [47] H. Sugiuchi, T. Irie, Y. Uji i wsp., "Homogeneous assay for measuring low-density lipoprotein cholesterol in serum with triblock copolymer and alpha-cyclodextrin sulfate.," *Clin. Chem.*, vol. 44, no. 3, pp. 522–531, Mar. 1998.
- [48] W.G. Miller, G.L. Myers, i wsp., "Seven direct methods for measuring HDL and LDL cholesterol compared with ultracentrifugation reference measurement procedures.," *Clin. Chem.*, vol. 56, no. 6, pp. 977–986, Jun. 2010.
- [49] J. H. Contois, "A Critical Review of LDL Cholesterol and HDL Cholesterol Measurement.," 2012, dostępne: www.sundiagnosics.us/wp-content/uploads/2012/09/white-paper-a-critical-review-of-hdl-and-ldl-measurement.pdf
- [50] M. Nauck, M.S. Graziani i wsp., "Analytical and clinical performance of a detergent-based homogeneous LDL-cholesterol assay: a multicenter evaluation.," *Clin. Chem.*, vol. 46, no. 4, pp. 506–514, Apr. 2000.
- [51] N. Rifai, E. Iannotti, K. DeAngelis i T. Law, "Analytical and clinical performance of a homogeneous enzymatic LDL-cholesterol assay compared with the ultracentrifugation-dextran sulfate-Mg²⁺ method.," *Clin. Chem.*, vol. 44, no. 6 Pt 1, pp. 1242–1250, Jun. 1998.
- [52] M. Esteban-Salan, A. Guimon-Bardesi i wsp., "Analytical and clinical evaluation of two homogeneous assays for LDL-cholesterol in hyperlipidemic patients.," *Clin. Chem.*, vol. 46, no. 8 Pt 1, pp. 1121–1131, Aug. 2000.
- [53] T. Kakuyama, K.Ochiai, K.Kishi i wsp., "New homogeneous assays for estimation of serum HDL and LDL-cholesterol levels," *Clin. Chem.*, vol. 47, no. S6, pp. 55–56, 2001.
- [54] K. Sztefko, "Problemy standaryzacji i kalibracji metod immunochemicznych.," *Diagnostyka Lab.*, vol. 47, no. 1, pp. 7–15, 2011.
- [55] K. Sztefko, "Wykłady monograficzne z diagnostyki laboratoryjnej. Cz. 1.,"

Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, ISBN: 83-233-1636-8, 2002.

- [56] “CDC - Laboratory Quality Assurance and Standardization Programs - Manufacturer Certification Program.” dostępny:
www.cdc.gov/labstandards/crmln_manufacturers.html.
- [57] W. T. Friedewald, R. I. Levy i D. S. Fredrickson, “Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge.,” *Clin. Chem.*, vol. 18, no. 6, pp. 499–502, Jun. 1972.
- [58] T. Planella, M. Cortes, C. Martinez-Bru, F. Gonzalez-Sastre i J. Ordonez-Llanos, “Calculation of LDL-cholesterol by using apolipoprotein B for classification of nonchylomicronemic dyslipemia.,” *Clin. Chem.*, vol. 43, no. 5, pp. 808–815, May 1997.
- [59] S. Anandaraja, R. Narang, R. Godeswar, R. Laksmi, and K. K. Talwar, “Low-density lipoprotein cholesterol estimation by a new formula in Indian population.,” *Int. J. Cardiol.*, vol. 102, no. 1, pp. 117–120, Jun. 2005.
- [60] Y. Hattori, M. Suzuki, M. Tsushima i wsp., “Development of approximate formula for LDL-chol, LDL-apo B and LDL-chol/LDL-apo B as indices of hyperapobetalipoproteinemia and small dense LDL.,” *Atherosclerosis*, vol. 138, no. 2, pp. 289–299, Jun. 1998.
- [61] T. Teerakanchana, W. Puavilai, K. Suriyaprom i R. Tungtrongchitr, “Comparative study of LDL-cholesterol levels in Thai patients by the direct method and using the Friedewald formula.,” *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, vol. 38, no. 3, pp. 519–527, May 2007.
- [62] S.A. Ahmadi, M.A. Boroumand, K. Gohari-Moghaddam i wsp., “The impact of low serum triglyceride on LDL-cholesterol estimation.,” *Arch. Iran. Med.*, vol. 11, no. 3, pp. 318–321, May 2008.
- [63] C.M.M. de Cordova i M.M. de Cordova, “A new accurate, simple formula for LDL-cholesterol estimation based on directly measured blood lipids from a large cohort.,” *Ann. Clin. Biochem.*, vol. 50, no. Pt 1, pp. 13–19, Jan. 2013.
- [64] C.A. Burtis, E.R. Ashwood, D.E. Bruns, “Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics.,” Saunders, 4 wydanie, ISBN-13: 978-0721601892, 2005.
- [65] M. Okada, H. Matsui, Y. Ito, A. Fujiwara i K. Inano, “Low-density lipoprotein cholesterol can be chemically measured: a new superior method.,” *J. Lab. Clin. Med.*,

- vol. 132, no. 3, pp. 195–201, Sep. 1998.
- [66] E. T. Bairaktari, C. Tzallas, M. Kalientzidou i wsp., “Evaluation of alternative calculation methods for determining low-density lipoprotein cholesterol in hemodialysis patients.,” *Clin. Biochem.*, vol. 37, no. 10, pp. 937–940, Oct. 2004.
- [67] E. Bairaktari, M. Elisaf, C. Tzallas i wsp., “Evaluation of five methods for determining low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) in hemodialysis patients(1).,” *Clin. Biochem.*, vol. 34, no. 8, pp. 593–602, Nov. 2001.
- [68] J. Rubies-Prat, J.L. Reverter i wsp., “Calculated low-density lipoprotein cholesterol should not be used for management of lipoprotein abnormalities in patients with diabetes mellitus.,” *Diabetes Care*, vol. 16, no. 8, pp. 1081–1086, Aug. 1993.
- [69] C. Matas, M. Cabre, A. La Ville i wsp., “Limitations of the Friedewald formula for estimating low-density lipoprotein cholesterol in alcoholics with liver disease.,” *Clin. Chem.*, vol. 40, no. 3, pp. 404–406, Mar. 1994.
- [70] G.R. Warnick, “Lipoprotein(a) is included in low-density lipoprotein by NCEP definition.,” *Clinical chemistry*, vol. 40, no. 11 Pt 1, pp. 2115–2116, Nov. 1994.
- [71] E. Bairaktari, K. Hatzidimou, C. Tzallas i wsp., “Estimation of LDL cholesterol based on the Friedewald formula and on apo B levels.,” *Clin. Biochem.*, vol. 33, no. 7, pp. 549–555, Oct. 2000.
- [72] W.G. Miller, “Matrix effects in the measurement and standardization of lipids and apolipoproteins,” *Curr. Opin. Lipidol.*, vol. 3, no. 6, pp. 361–364, 1992.
- [73] B. Lisowska-Myjak i Ewa Skarżyńska, “Wielonarządowe następstwa akumulacji toksyn mocznicowych,” *Nefrol. Dial. Pol.*, vol. 19, no. 2, pp. 81–86, 2015.
- [74] R. Vanholder, S. Van Laecke i G. Glorieux, “What is new in uremic toxicity?,” *Pediatr. Nephrol.*, vol. 23, no. 8, pp. 1211–1221, Aug. 2008.
- [75] N. Ahmed i P. J. Thornalley, “Advanced glycation endproducts: what is their relevance to diabetic complications?,” *Diabetes. Obes. Metab.*, vol. 9, no. 3, pp. 233–245, May 2007.
- [76] M. Warwas, A. Piwowar i G. Kopiec, “Zaawansowane produkty glikacji (AGE) w organizmie – powstawanie, losy, interakcja z receptorami i jej następstwa,” *Farm Pol.*, vol. 66, no. 8, pp. 585–590, 2010.

- [77] J. Pietkiewicz, E. Seweryn, A. Bartyś i A. Gamian, “Receptory końcowych produktów zaawansowanej glikacji – znaczenie fizjologiczne i kliniczne.,” *Postep. Hig Med Dosw.*, vol. 62, pp. 511–523, 2008.
- [78] B. Solnica i K. Sztefko, “Medyczne laboratorium diagnostyczne.,” Wydawnictwo Medyczne PZWL, ISBN-13: 978-83-200-4851-3, 2015.
- [79] “Instrukcja użycia - slajd CHOL - produkt do systemu Vitros REF 1669829”, dostępne: <http://techdocs.orthoclinical.com/TechDocs/TechDocSearch.aspx?tID=0&culture=en-gb>
- [80] “Instrukcja użycia - slajd TRIG - produkt do systemu Vitros REF 8329930”, dostępne: <http://techdocs.orthoclinical.com/TechDocs/TechDocSearch.aspx?tID=0&culture=en-gb>
- [81] “Instrukcja użycia - slajd dHDL- produkt do systemu Vitros REF 6802469”, dostępne: <http://techdocs.orthoclinical.com/TechDocs/TechDocSearch.aspx?tID=0&culture=en-gb>
- [82] “Instrukcja użycia - odczynnik dLDL - produkt do systemu Vitros REF 6801728”, dostępne: <http://techdocs.orthoclinical.com/TechDocs/TechDocSearch.aspx?tID=0&culture=en-gb>
- [83] “Instrukcja użycia - odczynnik ApoB - produkt do systemu Vitros REF 6801738”, dostępne: <http://techdocs.orthoclinical.com/TechDocs/TechDocSearch.aspx?tID=0&culture=en-gb>
- [84] S. J. Soldin, C. Brugnara i J.M. Hicks, “Pediatric Reference Ranges, Third Edition.,” AACC Press, Washington, ISBN-13: 978-1890883225, 1999.
- [85] “Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę 2016 - Stanowisko Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego.,” *Via Medica*, vol. 5, no. A, 2016, dostępne: https://journals.viamedica.pl/clinical_diabetology/article/view/44880/30969
- [86] M. Krawczyński, “Norma kliniczna w pediatrii.,” Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, ISBN: 83-200-301-6, 2004.
- [87] A. Garoufi, A. Drakatos, C. Tsentidis i wsp., “Comparing calculated LDL-C with directly measured LDL-C in healthy and in dyslipidemic children.,” *Clin. Biochem.*, vol. 50, no. 1–2, pp. 16–22, Jan. 2017.
- [88] T. Kubo, K. Takahashi, M. Furujo i wsp., “Usefulness of non-fasting lipid parameters in children.,” *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.*, vol. 30, no. 1, pp. 77–83, Jan. 2017.
- [89] A. Siddique, M. Saiedullah, N. Chowdhury i A. Khan, “Evaluation of Performance of

the Newly Developed de Cordova's Formula for Calculation of Low-Density Lipoprotein Cholesterol without Use of Triglycerides," *J. Enam Med. Coll.*, vol. 4, no. 1, pp. 10–14, 2014.

- [90] C. P. Onyenekwu, M. Hoffmann, F. Smit, T. E. Matsha i R. T. Erasmus, "Comparison of LDL-cholesterol estimate using the Friedewald formula and the newly proposed de Cordova formula with a directly measured LDL-cholesterol in a healthy South African population.," *Ann. Clin. Biochem.*, vol. 51, no. Pt 6, pp. 672–679, Nov. 2014.
- [91] B. Hichem, B. Hanane, Z. Mouna i S. Radia, "The best formula for estimating the low density lipoprotein cholesterol on a North African population," *bioRxiv*, Oct. 2016.
- [92] J. Martins, S. A. S. Olorunju, L. M. Murray i T. S. Pillay, "Comparison of equations for the calculation of LDL-cholesterol in hospitalized patients.," *Clin. Chim. Acta.*, vol. 444, pp. 137–142, Apr. 2015.
- [93] R. Kapoor, M. Chakraborty i N. Singh, "A Leap above Friedewald Formula for Calculation of Low-Density Lipoprotein-Cholesterol.," *J. Lab. Physicians*, vol. 7, no. 1, pp. 11–16, 2015.
- [94] S. Gupta, M. Verma i K. Singh, "Does LDL-C Estimation Using Anandaraja's Formula Give a Better Agreement with Direct LDL-C Estimation than the Friedewald's Formula?," *Indian J. Clin. Biochem.*, vol. 27, no. 2, pp. 127–133, Apr. 2012.
- [95] J. P. Warade, H. Dahake i R. Kavitha, "Comparison between direct estimation of LDL and Friedewald's formula," *Int. Arch. Integr. Med.*, vol. 3, no. 2, pp. 10–17, 2016.
- [96] P. Dansethakul, L. Thapanathamchai, S. Saichanma, A. Worachartcheewan i P. Pidetcha, "Determining a new formula for calculating low-density lipoprotein cholesterol: data mining approach.," *EXCLI J.*, vol. 14, pp. 478–483, 2015.
- [97] K. Mukeshbhai Badrakiya, A. Darshanbhai Shah i wsp., "Comparison of LDL - cholesterol estimated by direct method and by calculation," *IJBAR*, vol. 7, no. 8, pp. 353–358, 2016.
- [98] A. Kamal, M. Hossain i S. Chowdhury, "A comparison of calculated with direct measurement of low density lipoprotein cholesterol level," *J. Chittagong Med. Coll. Teach. Assoc.*, vol. 20, no. 2, pp. 19–23, 2009.
- [99] V. Sridevi, V. Anand i S. Mahendrappa, "Comparison of Friedewald's and Anandaraja's formula with direct estimation of low-density lipoprotein cholesterol in Shivamogga

- population,” *IAIM*, vol. 3, no. 7, pp. 120–131, 2016.
- [100] H.H. Yu, R. Markowitz i wsp., “Direct measurement of LDL-C in children: performance of two surfactant-based methods in a general pediatric population,” *Clin. Biochem.*, vol. 33, no. 2, pp. 89–95, Mar. 2000.
- [101] K.R. Jun, H.I. Park, S.Chun, H.Park i W.K. Min, “Effects of total cholesterol and triglyceride on the percentage difference between the low-density lipoprotein cholesterol concentration measured directly and calculated using the Friedewald formula,” *Clin. Chem. Lab. Med.*, vol. 46, no. 3, pp. 371–375, 2008.
- [102] H. Choi, J.S. Shim, M.H. Lee, Y M. Yoon, D.P. Choi i H.C. Kim, “Comparison of Formulas for Calculating Low-density Lipoprotein Cholesterol in General Population and High-risk Patients with Cardiovascular Disease,” *Korean Circ. J.*, vol. 46, no. 5, pp. 688–698, Sep. 2016.
- [103] P. K. Nigam, “Calculated Low Density Lipoprotein-Cholesterol: Friedewald’s Formula versus Other Modified Formulas,” *Int. J. Life Sci. Med. Res.*, vol. 4, no. 2, pp. 22–31, 2014.
- [104] F.B. Dalpino, L. Menna-Barreto i E.C. de Faria, “Influences of sex and age on biological rhythms of serum lipids and lipoproteins,” *Clin. Chim. Acta.*, vol. 406, no. 1–2, pp. 57–61, Aug. 2009.
- [105] J. Bugajska, J. Berska i K. Sztefko, “Przydatność wzoru Friedewalda w pediatrii,” *Diagnostyka Lab.*, vol. 44, pp. 217–223, 2008.
- [106] W.G. Miller, P.P. Waymack, F.P. Anderson, S.F. Ethridge i E. C. Jayne, “Performance of four homogeneous direct methods for LDL-cholesterol,” *Clin. Chem.*, vol. 48, no. 3, pp. 489–498, Mar. 2002.
- [107] N. Wadhwa i R. Krishnaswamy, “Comparison of LDL-Cholesterol Estimate using Various Formulae with Directly Measured LDL-Cholesterol in Indian Population,” *J. Clin. Diagn. Res.*, vol. 10, no. 12, p. BC11-BC13, Dec. 2016.
- [108] Y. Chen, X. Zhang i wsp., “A modified formula for calculating low-density lipoprotein cholesterol values,” *Lipids Health Dis.*, vol. 9, p. 52, May 2010.
- [109] P.O. Attman, O. Samuelsson i P. Alaupovic, “Lipoprotein metabolism and renal failure,” *Am. J. Kidney Dis.*, vol. 21, no. 6, pp. 573–592, Jun. 1993.
- [110] M. K. Chan, J. Persaud, Z. Varghese i J. F. Moorhead, “Pathogenic roles of post-heparin

- lipases in lipid abnormalities in hemodialysis patients.,” *Kidney Int.*, vol. 25, no. 5, pp. 812–818, May 1984.
- [111] D.C. Cattran, S.S. Fenton, D.R. Wilson i G. Steiner, “Defective triglyceride removal in lipemia associated with peritoneal dialysis and haemodialysis.,” *Ann. Intern. Med.*, vol. 85, no. 1, pp. 29–33, Jul. 1976.
- [112] C. Baigent, K. Burbury i D. Wheeler, “Premature cardiovascular disease in chronic renal failure.,” *Lancet (London, England)*, vol. 356, no. 9224, pp. 147–152, Jul. 2000.
- [113] “Chapter 3: Assessment of lipid status in children with CKD.,” *Kidney Int. Suppl.*, vol. 3, no. 3, pp. 280–281, Nov. 2013.
- [114] N. Einollahi *et al.*, “Serum lipid profile alterations in acute leukemia before and after chemotherapy,” *Iran. J. Blood*, vol. 6, no. 1, pp. 3–9, 2013.
- [115] R.J. Spiegel, E.J. Schaefer, I.T. Magrath i B. K. Edwards, “Plasma lipid alterations in leukemia and lymphoma.,” *Am. J. Med.*, vol. 72, no. 5, pp. 775–782, May 1982.
- [116] L.J. Tao i Y.Q. Qin, “Alteration of serum lipids in patients with acute leukemia and its clinical significance.,” *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi*, vol. 10, no. 4, pp. 371–372, Aug. 2002,[Abstrakt]
- [117] D. Scribano, S. Baroni, L. Pagano, C. Zuppi, G. Leone i B. Giardina, “Return to normal values of lipid pattern after effective chemotherapy in acute lymphoblastic leukemia.,” *Haematologica*, vol. 81, no. 4, pp. 343–345, 1996.
- [118] C. Peterson, S. Vitols, M. Rudling, H. Blomgren, F. Edsmyr i L. Skoog, “Hypocholesterolemia in cancer patients may be caused by elevated LDL receptor activities in malignant cells.,” *Med. Oncol. Tumor Pharmacother.*, vol. 2, no. 3, pp. 143–147, 1985.
- [119] P.P. Naik, M.S. Ghadge, and A.S. Raste, “Lipid profile in leukemia and Hodgkin’s disease.,” *Indian J. Clin. Biochem.*, vol. 21, no. 2, pp. 100–102, Sep. 2006.
- [120] S. Vitols, G. Gahrton, M. Bjorkholm i C. Peterson, “Hypocholesterolaemia in malignancy due to elevated low-density-lipoprotein-receptor activity in tumour cells: evidence from studies in patients with leukaemia.,” *Lancet (London, England)*, vol. 2, no. 8465, pp. 1150–1154, Nov. 1985.
- [121] J. Malhotra, E.S. Tonorezos, M. Rozenberg i wsp., “Atherogenic low density lipoprotein phenotype in long-term survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia.,” *J. Lipid*

Res., vol. 53, no. 12, pp. 2747–2754, Dec. 2012.

- [122] S. K. Parsons, S.X. Skapek i wsp., “Asparaginase-associated lipid abnormalities in children with acute lymphoblastic leukemia.,” *Blood*, vol. 89, no. 6, pp. 1886–1895, Mar. 1997.
- [123] M.H. Kroll i R.J. Elin, “Interference with clinical laboratory analyses.,” *Clin. Chem.*, vol. 40, no. 11 Pt 1, pp. 1996–2005, Nov. 1994.
- [124] A. Szutowicz, “Hiperglikacja białek wewnątrz i zewnątrzkomórkowych; marker czy aktywny element patomechanizmów cukrzycy,” *Diagnostyka Lab.*, vol. 51, no. 3, pp. 213–220, 2015.
- [125] A. Yegin, T. Ozben i H. Yegin, “Glycation of lipoproteins and accelerated atherosclerosis in non-insulin-dependent diabetes mellitus.,” *Int. J. Clin. Lab. Res.*, vol. 25, no. 3, pp. 157–161, 1995.
- [126] A. Perez, A. Caixas, G. Carreras i wsp., “Lipoprotein compositional abnormalities in type I diabetes: effect of improved glycaemic control.,” *Diabetes Res. Clin. Pract.*, vol. 36, no. 2, pp. 83–90, May 1997.
- [127] A. Gawlik, A. Zachurzok-Buczyńska i E. Małecka-Tendera, “Endokrynologia, otyłość i zaburzenia przemiany materii : czasopismo Polskiego Towarzystwa Badań nad Otyłością.,” *Endokrynol. Otyłość i Zaburzenia Przemiany Mater.*, vol. 5, no. 1, pp. 19–27, 2009.
- [128] E. Ciach, D. Bobilewicz i E. Kmin, “Porównanie stężeń cholesterolu frakcji LDL wyliczonych z równania Friedewalda i oznaczonych metodą bezpośrednią,” *Diagnostyka Lab.*, vol. 47, no. 4, pp. 419–423, 2011.
- [129] T. Miida, K. Nishimura, T. Okamura i wsp., “A multicenter study on the precision and accuracy of homogeneous assays for LDL-cholesterol: comparison with a beta-quantification method using fresh serum obtained from non-diseased and diseased subjects.,” *Atherosclerosis*, vol. 225, no. 1, pp. 208–215, Nov. 2012.
- [130] R. Quispe , A. Hendrani, M.B. Elshazly i wsp., “Accuracy of low-density lipoprotein cholesterol estimation at very low levels.,” *BMC Medicine*, vol.15, no.1, pp.83, Apr. 2017.