

Projekt „LDL-cholesterol“

„Zistenie analytickej presnosti nepriamych metód stanovenia a vplyv na diagnostickú presnosť a stratifikáciu pacientov.“

Medzinárodná multicentrická prospektívna štúdia.“

Štúdiu podporuje Výskumný grant Slovenskej kardiologickej spoločnosti na roky 2008-10.

VÝZVA NA SPOLUPRÁCU

Vážení kolegovia z Českej republiky a Slovenskej republiky, dovoľujeme si Vás pozvať k účasti na projekte. Stručný prehľad problematiky a samotného projektu je uvedený na nasledovných stranách.

Bod 1 Plánu výskumu je vykonanie metaanalýzy všetkých dostupných publikovaných porovnaní priamych a nepriamych metód stanovenia LDL-C, včítane šedej literatúry, od roku 2000 doteraz.

Prosíme o pomoc pri vyhľadávaní šedej literatúry publikovanej v českých, slovenských, ale prípadne aj inozajzyčných periodických aj neperiodických publikáciách. (Príklady sú uvedené v Literatúre, 25, 25a, 25b). V termíne do 30. 4. 2009 prijímame informácie, citácie prác, alebo lepšie plné texty prác.

O bodoch 3 a 4 Plánu výskumu budeme včas informovať.

Každý aktívny účastník sa stáva členom **Medzinárodnej výskumnej skupiny pre štúdium LDL cholesterolu - International Multicenter LDL Study Group (IMLS Group)**.

Riešiteľ:

MUDr. Rudolf Gaško

Bioštatistická jednotka

Železničná nemocnica s poliklinikou

Masarykova 5

040 01 Košice

SR

e-mail: rgasko@gmail.com

PREHĽAD PROBLEMATIKY

Pozadie:

Problém metódy stanovenia LDL-cholesterolu (LDL-C) je problémom, ktorý riešia predovšetkým laboratórni pracovníci. V prácach klinických, resp. preventívnych kardiológov je systematicky obchádzaný. V zásadnej práci (1, SCOPUS 210 citácií), ktorá popisuje a sumarizuje výsledky 5 veľkých

klinických štúdií s ovplyvňovaním lipidového statusu liečbou statínmi, je uvedená symptomatická veta: „Although this difference (between Friedewald formula and direct methods) could be of some significance for treatment decision, to avoid confusion the distinction will not be emphasized in the discussion to follow.“ Klinickí epidemiológovia v prácach iba konštatujú, alebo bez komentára popisujú použitú Friedewaldovu metódu.

Problematike korektného stanovenia LDL-C, buď priamou metódou alebo výpočtom podľa Friedewalda (LDL-F), sme sa venovali v niekoľkých publikáciách (2-4).

Krátky rozbor metodík LDL-C:

U absolútnej väčšiny rutinne používaných laboratórnych parametrov nepotrebuje klinický pracovník vedieť, akou metódou boli vykonané, pretože laboratórium zabezpečuje a garantuje spoľahlivosť výsledkov. U LDL-C je situácia iná.

Referenčná metóda: Beta kvantifikácia podskupín cholesterolu. Metodika je dostatočne presná a správna. Je však nepoužiteľná v rutínnej diagnostike pre extrémne vysokú cenu a veľkú časovú náročnosť.

Nepriame metódy (Indirect methods): Stanovenie nepriamou metódou výpočtom podľa Friedewalda (LDL-F) je najrozšírenejšie, avšak nie jediné nepriame stanovenie. Používajú sa nasledovné rovnice:

$LDL-C [mmol/l] = TC - HDL-C - (TAG/2,18)$ (Friedewald (5)), SCOPUS 7895 citácií

$LDL-C [mmol/l] = 0,41 TC - 0,32 TAG + 1,70 apoB - 0,27$ (Planella (6)), 26 citácií

$LDL-C [mg/dl] = 0,94 TC - 0,94 HDL-C - 0,19 TAG$ (Hattori (7)), 21 citácií

$LDL-C [mmol/l] = 0,48 + 0,99 TC - 0,23 TAG - 1,58 apoA-I$ (Jungner (8)), 335 citácií

$LDL-C [mg/dl] = 0,358 TC + 0,776 ApoB - 0,149 TAG$ (Wagner (9)), 5 citácií

$LDL-C [mg/dl] = (0,9 TC) - (0,9 TAG/5) - 28$ (Anandaraja (10)), 5 citácií

$LDL-C [mmol/l] = TC/1,19 + TAG/0,81 - HDL-C/1,1 - 0,98$ (Ahmadi (11)), 0 citácií

Boli vykonané aj pokusy s rôznym menovateľom ku čitateľu TAG v LDL-F (12), so záverom že originálny Friedewaldov menovateľ je najsprávnejší, čo však iné práce popierajú (13).

Obmedzenia použitia LDL-F boli definované už Friedewaldom a spol (5) a sú doteraz platné: 12 hodín lačnenie, hodnota TAG pod 4,5 mmol/l, neprítomnosť typu III hyperlipoproteínémie (= pozit. chylomikrónový test). Kritika LDL-F

v posledných rokoch je založená na závislosti miery zhody medzi referenčnou metódou a výpočtom, a hodnôt TAG a hodnôt celkového cholesterolu (3,10,11,14,15). Ostatné rovnice ku nepriamemu výpočtu LDL-C, ktoré sú všetky založené na kritike LDL-F a snažia sa odvodiť a zdôvodniť iný model výpočtu, nenašli zatiaľ širšie uplatnenie.

LDL-F metodika môže byť dostatočne presná a správna pri dodržaní nasledovných predpokladov: Sú dodržané Friedewaldove obmedzenia, hodnota TAG a celkového cholesterolu je v referenčnom rozsahu, pri výpočte je použitá správna rovnica (v r. 2005 české a slovenské laboratória používali 11 rôznych variant výpočtu LDL-F, (16)!). Čím je vyššia hodnota TAG nad referenčný rozsah, alebo nižšia pod 2,25 mmol/l, a čím je cholesterol nižší pod referenčný rozsah, tým je vyšší rozdiel od správnych hodnôt (3,15). Vo všetkých ostatných prípadoch je LDL-F nepresná a nesprávna. Ďalej, LDL-F je nespoľahlivá u niektorých konkrétnych ochorení – metabolický syndróm, diabetes mellitus, dialýza, liečba antischizofrenikami (14,17,18).

Zásadným argumentom ku používaniu LDL-F má byť to, že všetky doterajšie epidemiologické štúdie, od ktorých sa odvodzujú medzinárodné odporúčenia ku stanoveniu rizika a terapie KVO sú založené dôsledne na tejto nepriamej metóde. Avšak, pri tejto argumentácii sa vedome zanedbáva nasledovný fakt (obrázok 1 - čiastočne prevzaté z publikácie Klinická biochemie, Galén, Praha, 2006): Pri epidemiologických štúdiách veľký počet probandov môže byť vyšetrovaný metódou c a sumárny výsledok môže byť presný, avšak pri individuálnej aplikácii metódy c bude určitá časť konkrétnych pacientov zaradená – stratifikovaná nesprávne. Jedine metóda a je použiteľná aj v epidemiologických štúdiách, aj v diagnostike. Zároveň, už sú v behu štúdie založené na priamom meraní LDL-C niektorou z dostupných metód (napr. 19), alebo na kombinovanom priamom meraní aj výpočtom podľa „modifikovanej Friedewaldovej rovnice“ (20, tento postup je však pokladaný za problematický)

Priame metódy (Direct methods): Od roku 1983 do konca storočia sa postupne používali metódy ktoré priamo merali LDL-C 1. a 2. generácie. Ukázali sa byť nedostatočne validné a v automatizovanej prevádzke nepoužiteľné (14), prestali sa vyrábať. Od roku 1998 sa doteraz používa niekoľko metód 3. generácie. Ich nedostatočná validita a vzájomná harmonizácia (21, 22) spôsobuje, že žiadna z komerčne na trhu ponúkaných priamych metód sa nestala všeobecne odporúčanou pre prax. Stanovenie LDL-C priamymi metódami stále nie je dostatočne presné, správne (23) a harmonizované. V niektorých národných guidelineoch je priamo uvádzané, že priame metódy nemôžu byť odporúčené (24).

Aj preto sa skúmajú stále nové metódy nepriameho stanovenia LDL, aj keď vo všeobecnosti nevýhody stanovenia laboratórnych parametrov výpočtom sú dobre známe.

Závery:

- V literatúre sa opakovane stále publikujú porovnaní LDL-F s niektorou z priamych metód, bez dokladovania spoľahlivosti priamej metódy jej porovnaním s referenčnou metódou (17,25-27). Každá z ďalších novo navrhnutých publikovaných nepriamych metód stanovenia v praxi zväčšuje rozpaky z použitia LDL ako hodnotiteľného cieľového parametra liečby pacienta. Protinázory sú iba ojedinelé (13).
- Dobre dokumentované zistenia o nespoľahlivosti všetkých rutinných metód používaných na stanovenie LDL-C (vedecká váha publikovaných štúdií – kategória C), včítane Friedewaldovej (vedecká váha publikovaných štúdií – kategória C), sa doteraz nepremietli do vývoja a výroby spoľahlivej metódy, ani do výmeny hodnoteného parametra LDL-C za niektorý iný.
- Metaanalýza publikovaných prác – viď predošlý odstavec - doteraz nebola vykonaná.
- Multicentrická prospektívna štúdia porovnania metód stanovenia LDL-C doteraz nebola publikovaná nikde v svetovom ani lokálnom písomníctve. V príslušných databázach nie je ani žiadna zmienka o takejto prebiehajúcej alebo pripravovanej štúdií.
- Za stavu, keď analytická presnosť stanovenia LDL-C je veľmi otázna, je ťažké akceptovať ambiciózne klinické úvahy o sprísnení hraničných, alebo cieľových hodnôt LDL-C v rôzne definovaných subpopuláciách pacientov, alebo v celej populácii (26, 28).
- Bludný kruh metód na stanovenie LDL-C je možné obísť. Výskum v ostatných rokoch jednoznačne smeruje k tomu, že v dohľadnej dobe sa budú guideleiny orientovať na iné parametre, non-HDL cholesterol a Apolipoprotein B (29-34, a množstvo iných), poťažne v kombinácii s Apolipoproteínom A-I (35), aj keď jednoznačné opustenie LDL-C nie je spomínané. Prvým krokom bolo zaradenie Apolipoproteínu B ako ďalšieho cieľového kritéria do niektorých národných guidelineov – Kanada, Taliansko, ČR (36).

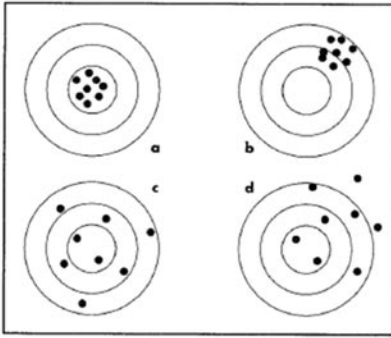
Literatúra:

1. Grundy, SM, Cleeman, JI, Merz, CNB et al, for the Coordinating Committee of the National Cholesterol Education Program. Implications of recent clinical trials for the NCEP ATP III guidelines. Circulation 2004, 110 : 227-239.

2. Gaško, R, Cordova, CMM, Klímová, E, a spol. LDL-cholesterol 2005 – porovnávací štúdia stanovenia metódou Friedewaldovho vzorca a priamou metódou Wako – dizajn štúdie a základné závery. *Klin Biochem Metab* 2005, 13(34): 190-196.
3. Gaško, R., Cordova, CMM. Je stanovenie LDL-cholesterolu Friedewaldovou rovnicou dostatočne spoľahlivé? *Lek Obzor* 2005, 53: 455-460.
4. Gaško, R, Klímová, E. LDL-cholesterol 2005 – štúdia porovnania dvoch metód – neštandardné štatistické postupy. *Lab Diagnostika* 2006, 11: 41-44.
5. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.
6. Planella T, Cortes M, Martinez-Bru C, et al. Calculation of LDL-Cholesterol by using apolipoprotein B for classification of non-chylomicronemic dyslipemia. *Clin Chem*, 1997;43:808–15.
7. Hattori Y, Suzuki M, Tsushima M, et al. 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*, 1998;138:289– 99.
8. Walldius, G, Jungner, I, Holme, I, et al. High apolipoprotein B, low apolipoprotein A-I, and improvement in the prediction of fatal myocardial infarction (AMORIS study): a prospective study. *Lancet* 2001; 358: 2026-33.
9. Wagner, AM, Zapico, E, Bonet, R, et al. The effect of VLDL particles on the accuracy of a direct LDL-cholesterol method in type 2 diabetic patients. *Clin Biochem* 2003, 36: 177-183.
10. Anandaraja, S, Narang, R, Godeswar, R, et al. Low-density lipoprotein cholesterol estimation by a new formula in Indian population. *Int J Cardiol* 2005, 102: 117-120.
11. Ahmadi, S-A, Boroumand, M-A, Gohari-Moghaddam, K et al. The impact of low serum triglyceride on LDL-cholesterol estimation. *Arch Iran Med* 2008, 11:318-321.
12. Nakanishi, N, Matsuo, Y, Yoneda, H, et al. Validity of the Conventional Indirect Methods Including Friedewald Method for Determining Serum Low-Density Lipoprotein Cholesterol Level: Comparison with the Direct Homogeneous Enzymatic Analysis. *J Occup Health* 2000; 42: 130-137.
13. Abudu, N, Levinson, SS. Calculated low-density lipoprotein cholesterol remains a viable and important test for screening and targeting therapy. *Clin Chem Lab Med* 2007, 45 : 1319-1325.
14. Bairaktari, ET, Seferiadis, KI, Elisaf, MS. Evaluation of methods for the measurement of low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C). *J Cardiovasc Pharmacol Therap* 2005, 10: 45-54.
15. Kyung, RJ, Hae-il, P, Sail, Ch et al. Effects of total cholesterol and triglyceride on the percentage difference between the low-density lipoprotein cholesterol concentration measured directly and calculated using the Friedewald formula. *Clin Chem Lab Med* 2008, 46: 371-375.
16. Novotný, D, Budina, M, Friedecký, B, a spol. Friedewaldův vztah a LDL cholesterol – studie dat z externího hodnocení kvality. *Klin Biochem Metab* 2005, 13(34): 151-154.
17. Paz, E, Hermida, J, Bouzas, L, et al. LDL cholesterol estimation using the Anandaraja's and Friedewald's formulas in schizophrenic patients treated with antipsychotic drugs. *Clin Biochem* 2008, 41 : 1002-1007.
18. Gazi, I, Tsimihodimos, H, Filippatos, TM et al. LDL cholesterol estimation in patients with the metabolic syndrome. *Lipids Health Dis* 2006, 5:8.
19. Nagai, R, Kurabyashi, M, Daida, H et al. Rationale and design of a study to examine lower targets for Low-density Lipoprotein-cholesterol and blood pressure in coronary artery disease patients. The Japanese Coronary Artery Disease Study II (JCADII). *Circ J* 2008, 72 : 515-520.
20. Mayer, O, Šimon, J, Galovcová, M, a spol. Úroveň sekundární prevence ischemické choroby srdeční u českých pacientů ve studii EUROASPIRE III. *Cor Vasa* 2008, 50 : 156-162.
21. Nauck, M, Warnick, GR, Rifai, N. Methods for measurement of LDL-cholesterol: a critical assessment of direct measurement by homogeneous assays versus calculation. *Clin Chem* 2002, 48 : 236-254.
22. Wagner, AM, Zapico, E, Boner, R et al. The effect of VLDL particles on the accuracy of a direct LDL-cholesterol method in type 2 diabetic patients. *Clin Biochem* 2003, 36 : 177-183.
23. Yamashita, Z, Nakamura, M, Koizumi, H et al. Evaluation of a homogeneous assay for measuring LDL-cholesterol in hyperlipidemic serum specimens. *J Atheroscler Thromb* 2008, 15 : 82-86.
24. Cooper, A, Nherera, L, Calvert, N, et al. Clinical Guidelines and Evidence Review for Lipid Modification: cardiovascular risk assessment

and the primary and secondary prevention of cardiovascular disease London: National Collaborating Centre for Primary Care and Royal College of General Practitioners. Full Guideline, May 2008, p. 83.

25. Breinek, P, Dobrovolná, H. Srovnání přímého stanovení LDL-cholesterolu s výpočtem. Symposium FONS 2008, 15.-16.9.2008, Pardubice.
- 25a. Syrová, D., Blažíček, P., Mocák, J. Comparison of direct and indirect methods for LDL-cholesterol determination by regression analysis. In: Zborník abstraktov, Labkvalita '01, Poprad, 4.-6.6.2001 : 223-225.
- 25b. Islamčević, M., Mocák, J., Brodnjak-Vončina, D. Comparison of two methods used for determination of LDL-cholesterol. Proc. YISAC 2004. Karl-Franzens-University, Graz 2004 : 1-8.
26. Starr, B, Hadfield, SG, Hutten, BA et al. Development of sensitive and specific age- and gender-specific low-density lipoprotein cholesterol cutoffs for diagnosis of first-degree relatives with familial hypercholesterolaemia in cascade testing. Clin Chem Lab Med 2008, 46: 791-803.
27. Vachulová, A., Vohnout, B, Blažíček, P, a spol. Porovnanie alternatívnych metód pre výpočet LDL cholesterolu. Cardiol 2005, 14(Suppl. 1) : 36S-37S.
- 27a. Vohnout, B., Vachulová, A., Blažíček, P et al. Evaluation of alternative calculation methods for determining LDL cholesterol. Vnitr Lék 2008, 54 : 961-964.
28. Češka, R. Cílové hodnoty LDL cholesterolu: Prání, realita a cesty ke zlepšení. Cardiol 2006, 15 : 191-193.
29. Barter, PJ, Ballantyne, CM, Carmena, R, et al. Apo B versus cholesterol in estimating cardiovascular risk and in guiding therapy: report of the thirty-person/ten-country panel. J Int Med 2006, 259: 247-258.
30. Sniderman, AD. Differential response of cholesterol and particle measures of atherogenic lipoproteins to LDL-lowering therapy: implications for clinical practice. J Clin Lipidol 2008, 2: 36-42.
31. Benn, M, Nordestgaard, BG, Jensen, GB, Tybjaerg-Hansen, A. Improving prediction of ischemic cardiovascular disease in the general population using apolipoprotein B. The Copenhagen City Heart Study. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2007, 27: 661-670.
32. Brunzell, JD, Davidson, M, Furberg, CD et al. Lipoprotein management in patients with cardiometabolic risk. Consensus conference report from the American Diabetes Association and the American College of Cardiology Foundation. J Am Coll Cardiol 2008, 51: 1512-1524.
33. Vaverková, H, Frohlich, J, Jackuliakova, D, Novotny, D. Comparison of apo lipoprotein B and plasma lipids as targets for lipid lowering treatment. Clin Biochem 2005, 38 : 509-513.
34. Hsia, SH. Alternate approaches to managing lipid-associated cardiovascular risk. Future Lipidol 2007, 2 : 157-163.
35. McQueen MJ, Hawken, S, Wang, X et al. Lipids, lipoproteins, and apolipoproteins as risk markers of myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): a case-control study. Lancet 2008, 372 : 224-233.
36. Gaško, R, Barlová, J, Raffač, Š, Geletková, S. Apolipoprotein B v terapeutických guidelineoch členských štátov EÚ (systematický prehľad) a realita jeho indikovania v jednej fakultnej nemocnici. Lab Diagnostika 2008, 13 : 50-54.



Kritériá analytickej presnosti a správnosti aplikované na LDL-cholesterol:

- | | | |
|---------------------------------|---------------------|--|
| a) Presná a správna metóda. | Bias < 4%, VK < 4%. | <u>Spĺňa referenčnú metódu.</u> |
| b) Nepresná a správna metóda. | Bias > 4%, VK < 4%. | <u>Spĺňajú niektoré priame metódy.</u> |
| c) Presná a nesprávna metóda. | Bias < 4%, VK > 4%. | <u>Charakteristika nepriamych metód.</u> |
| d) Nepresná a nesprávna metóda. | Bias > 4%, VK > 4%. | <u>Charakteristika nepriamych metód.</u> |

VK = variačný koeficient, Požiadavka na bias a VK podľa NCEP ATP III, 2001.

Obrázok 1. - Čiastočne prevzaté z publikácie „Klinická biochemie“ (Galén, Praha, 2006)

VLASTNÝ PROJEKT

Formulácia cieľov výskumu a hypotéz

Hladina cholesterolu v lipoproteínoch s nízkou hustotou (LDL-cholesterol, LDL-C) predikuje riziko aterosklerózy. LDL-C sa stal jedným z parametrov, podľa cieľových hodnôt, ktorých sa v zmysle medzinárodných aj národných guidelineov zameraných na prevenciu a liečbu srdcovo-cievnych ochorení (KVCH) sleduje účinnosť nefarmakologickej aj farmakologickej hypolipidemickej liečby. Problémom je nedostatočná analytická spoľahlivosť (presnosť a správnosť) rôznych metód používaných rutinne k stanoveniu LDL-C. Nízka analytická spoľahlivosť môže spôsobovať nesprávne zaradenie konkrétnych pacientov do stratifikačných a liečebných schém, a to rovnako v zmysle poddiagnostikovania ako aj naddiagnostikovania. Cieľom projektu je zdokumentovať pre rozhodovací proces v diagnostike, prevencii a liečbe významné informácie o hodnotách neistoty merania LDL-C.

V 1. kroku sa získa východiskový materiál metaanalýzou doteraz publikovaných porovnaní rôznych metód stanovenia LDL-C. V 2. kroku bude podľa jednotnej metodiky usporiadaná prospektívna multicentrická medzinárodná štúdia porovnania rôznych metód.

Očakávané výsledky prinesú nové informácie v oblasti aplikovaného výskumu o variabilite stanovenia LDL-C. Sú dôležité z celospoločenského hľadiska a potrebné pre diagnostiku a prognózu zdravotného stavu, ako aj posudzovanie úspešnosti liečebného postupu KVCH v medicínskej praxi. Predpokladá sa potvrdenie a kvantifikácia vysokého rizika poskytnutia nesprávnej informácie pre klinickú diagnostiku pri používaní LDL-C v praxi. Získané výsledky budú mať platnosť v rámci celoeurópskeho priestoru.

Plán výskumu (skrátaná verzia)

1. Metaanalýza všetkých dostupných publikovaných porovnaní priamych a nepriamych metód stanovenia LDL-C, včítane šedej literatúry. November 2008 – Jún 2009
2. Porovnanie použitých štatistických postupov v týchto publikáciách. Do júna 2009
3. Vypracovanie jednotnej metodiky prospektívnej štúdie. Január – Jún 2009
4. Vykonalenie multicentrickej prospektívnej štúdie. Júl – December 2009
5. Vyhodnotenie a publikovanie. Vedecká váha publikovanej štúdie – kategória B II b. Január – December 2010