

## Porównywalność oszacowanego i oznaczonego stężenia cholesterolu frakcji LDL u dzieci hospitalizowanych

### Comparability of estimated and determined LDL cholesterol in hospitalized children

Katarzyna Mamica-Pociecha, Jolanta Bugajska, Joanna Berska, Krystyna Sztefko

Zakład Biochemii Klinicznej Instytutu Pediatrii, Uniwersytet Jagielloński – Collegium Medicum w Krakowie

#### Streszczenie

**Wprowadzenie:** Uzyskanie wiarygodnego wyniku stężenia cholesterolu frakcji LDL (LDLC) jest niezwykle istotne, gdyż jest to główny parametr klasyfikujący pacjentów pod względem ryzyka rozwoju miażdżycy.

**Cel badań:** Porównanie wartości stężeń LDLC oszacowanych przy użyciu wzorów: Friedewalda (LDLC<sub>F</sub>), Cordova (LDLC<sub>C</sub>) i Planelli (LDLC<sub>P</sub>) z wartościami stężeń LDLC oznaczonymi metodą bezpośrednią (LDLC<sub>D</sub>) z uwzględnieniem wieku pacjenta i matrycy próbki.

**Materiał i Metody:** Zebrano 594 surowic dzieci (w wieku 1 dzień-18 lat) leczonych w Uniwersyteckim Szpitalu Dziecięcym w Krakowie, ze znanym stężeniem hemoglobiny A1c i/lub kreatyniny i oznaczono stężenia apolipoproteiny B, cholesterolu całkowitego, triglicerydów, cholesterolu frakcji HDL i LDL oraz oszacowano stężenie LDLC ze wzorów.

**Wyniki:** Średnie wartości stężeń LDLC<sub>F</sub> i LDLC<sub>C</sub> były istotnie statystycznie niższe w porównaniu do średniej wartości stężenia LDLC<sub>D</sub> dla wszystkich próbek oraz dla próbek od dzieci  $\geq 1$  r.ż. Metodą Blanda-Altmana wykazano, że stężenia LDLC<sub>C</sub> nie były porównywalne ze stężeniami LDLC<sub>D</sub> dla wszystkich zebranych próbek, niezależnie od stężenia LDLC<sub>D</sub>. Wykazano również większy rozrzut wartości różnic pomiędzy LDLC<sub>F</sub> i LDLC<sub>D</sub>, pomiędzy LDLC<sub>C</sub> i LDLC<sub>D</sub> oraz pomiędzy LDLC<sub>P</sub> i LDLC<sub>D</sub> dla próbek o stężeniu HbA1c  $\geq 6,0\%$ . Dla próbek o stężeniu kreatyniny  $< 74,0 \mu\text{mol/l}$  oraz dla próbek o stężeniu kreatyniny  $\geq 74,0 \mu\text{mol/l}$  różnice pomiędzy średnimi wartościami różnic pomiędzy LDLC<sub>F</sub> i LDLC<sub>D</sub>, pomiędzy LDLC<sub>C</sub> i LDLC<sub>D</sub> oraz pomiędzy LDLC<sub>P</sub> i LDLC<sub>D</sub> wynosiły odpowiednio 0,34mmol/l, 0,40mmol/l i 0,34 mmol/l (we wszystkich przypadkach  $p < 0,001$ ).

**Wnioski:** Różnice pomiędzy stężeniem LDLC<sub>D</sub> a stężeniem oszacowanym zależą w znacznym stopniu od składu matrycy próbki oraz zastosowanego wzoru, dlatego też monitorowanie terapii hipolipemizującej powinno prowadzić się w oparciu o ten sam sposób oceny stężenia LDLC.

#### Abstract

**Introduction:** The concentration of LDL cholesterol (LDLC) is the main parameter used in the stratification of risk and the management of atherosclerosis.

**Aim of study:** The aim of this study was to compare the LDLC concentration calculated by the Friedewald (LDLC<sub>F</sub>), the Cordova (LDLC<sub>C</sub>) and the Planelli (LDLC<sub>P</sub>) formulas with the LDLC concentration measured by direct method (LDLC<sub>D</sub>) with regard to age and sample matrix.

**Material and Methods:** 594 serum samples were collected from children (1 day to 18 years) hospitalized in University Children's Hospital in Krakow. Concentrations of hemoglobin A1c and/or creatinine were determined. In all serum samples total cholesterol, triglycerides, high-density lipoprotein cholesterol, apolipoprotein B and LDLC<sub>D</sub> were measured. In addition, the LDLC concentration was estimated.

**Results:** The means of the LDLC<sub>F</sub> and LDLC<sub>C</sub> concentrations were significantly lower compared to the mean of the LDLC<sub>D</sub> in all samples and in samples from children  $\geq 1$  years of age (in all cases  $p < 0,0001$ ). Bland-Altman analysis is showed, that the values LDLC<sub>C</sub> were not comparable to the values of LDLC<sub>D</sub> in samples from all children and regardless of the LDLC<sub>D</sub> concentration. In samples with HbA1c  $\geq 6,0\%$  mean values of differences between estimated LDLC and LDLC<sub>D</sub> were higher than in samples with HbA1c  $< 6,0\%$ , regardless of the used formula. The mean values of differences between estimated LDLC and LDLC<sub>D</sub> in samples with creatinine concentrations  $< 74,0 \mu\text{mol/l}$  and  $\geq 74,0 \mu\text{mol/l}$  differed significantly regardless of the used formula (in all cases  $p < 0,001$ ).

**Conclusion:** The differences between concentration of determined and estimated LDLC depend on composition of sample matrix and formula which is used in calculations.

**Słowa kluczowe:** apolipoproteina B, cholesterol frakcji LDL, dzieci, matryca próbki, wzór Cordova, wzór Friedewalda, wzór Planelli,  
**Keywords:** apolipoprotein B, Cordova formula, Friedewald formula, LDL-cholesterol, Planelli formula, sample matrix,

## Wstęp

Proces miażdżycowy może rozpocząć się już w dzieciństwie [1, 2, 3] a szybkość jego narastania w dużym stopniu zależy od nasilenia zaburzeń lipidowych [4, 5]. Według zaleceń National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Blood Cholesterol Levels in Children and Adolescence wartość stężenia cholesterolu frakcji LDL (LDLC) uważana jest za główny parametr klasyfikujący pacjentów pod względem ryzyka rozwoju miażdżycy [6]. Metodą referencyjną do oznaczania stężenia cholesterolu frakcji LDL w surowicy, zalecaną przez Central for Disease Control and Prevention (CDC), jest metoda ultrawirowania połączona z precypitacją (BQ; *beta quantification*). W metodzie tej wykorzystywana jest sekwencja flotacyjna umożliwiająca różnicowanie lipoprotein pod względem ich gęstości. Metoda BQ nie jest stosowana rutynowo w laboratoriach ze względu na wysokie koszty, dużą objętość surowicy wymaganą do oznaczenia oraz długi czas wykonywania oznaczenia [7]. Obecnie w laboratoriach do oznaczania stężenia LDLC stosowane są metody III generacji (metody homogenne/enzymatyczne) [8] rekomendowane przez NCEP i Cholesterol Reference Method Laboratory Network of Centre for Disease Control and Prevention [9]. Obecnie znanych jest siedem metod do bezpośredniego oznaczania LDLC, w których skład odczynników różni się w zależności od producenta [7, 10]. Każdy z produkowanych zestawów zawiera dwa odczynniki. Pierwszy odczynnik odpowiada za blokowanie lub rozpuszczanie cząsteczek nie-LDL. Natomiast drugi odczynnik umożliwia oznaczenie stężenia cholesterolu zawartego w cząsteczkach LDL. Chociaż wartości stężeń LDLC uzyskane metodami bezpośrednimi i metodą referencyjną są dobrze skorelowane [11, 12, 13] to jednak większość metod bezpośrednich jest podatnych na efekt matrycowy [14]. Wynika to z faktu, że stężenie LDLC oznacza się w surowicy, która zawiera heterogenne frakcje lipoproteinowe o zmiennych proporcjach zależnie od stanu klinicznego pacjenta. Bezpośrednie oznaczenie stężenia LDLC jest uważane za optymalne postępowanie przy poszukiwaniu zaburzeń lipidowych, jednak ze względu na ograniczenia metodyczne poszukuje się innych metod oceny jego stężenia. Pomimo szerokiej dostępności bezpośrednich metod oznaczania LDLC, stężenie tej frakcji cholesterolu jest znacznie częściej oszacowywane z różnych wzorów niż mierzone bezpośrednio. Najczęściej stosowany jest wzór Friedewalda [8]. Może być on 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). Wzór Friedewalda nie powinien być stosowany do wyliczania LDLC u pacjentów ze zdiagnozowaną hiperlipidemią typu III, dysbetalipoproteinemią (akumulacja remnantów lipoprotein) [7] czy chorobami nerek [15, 16], cukrzycą [17], chorobami wątroby [18] jak również u pacjentów stosujących zastępczą terapię hormonalną [19]. Mniej znany jest wzór Planelli i wsp. [20], którego główną zaletą jest możliwość wykorzystania u pacjentów z hipertriglicerydemią [16, 21] oraz z chorobami nerek [15]. Jednym z najnowszych wzorów jest wzór Cordova i wsp. [22], który umożliwia oszacowanie stężenia LDLC wykorzystując tylko wartości stężeń cholesterolu całkowitego i cholesterolu frakcji HDL. Wzór ten może być stosowany u osób z hiperlipidemią, cu-

krzycą czy innymi zaburzeniami metabolicznymi, a próbki krwi nie muszą być pobrane na czczo [22]. 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 wielkość błędu wzrasta przy niskich wartościach stężeń oznaczanych parametrów. Celem badań była ocena porównywalności stężenia LDLC oszacowanego przy pomocy wzorów Friedewalda, wzoru Cordova i wzoru Planelli z wartościami stężeń LDLC oznaczonymi metodą bezpośrednią u dzieci, z uwzględnieniem wieku, stężenia hemoglobiny A1c i kreatyniny.

## Materiał i metody

Zebrano 594 próbek surowic pozostałych po rutynowych oznaczeniach, w których było oznaczone stężenie hemoglobiny A1c (HbA1c) i/lub kreatyniny. Próbki pochodziły od dzieci z chorobami przewlekłymi, hospitalizowanych w Uniwersyteckim Szpitalu Dziecięcym w Krakowie w celu szczegółowej diagnostyki (w wieku od 1 dnia do 18 lat). We wszystkich surowicach oznaczono stężenie cholesterolu całkowitego (TC), triglicerydów (TG), cholesterolu frakcji HDL (HDL), LDLC i apolipoproteiny B (apo B). Oznaczenie stężenia TC, TG i HDL wykonano metodą enzymatyczną (Vitros 5.1 FS (Ortho-Clinical Diagnostics, United Kingdom), LDLC metodą enzymatyczną dwuetapową (LDLC<sub>D</sub> (firmy Johnson & Johnson Clinical Diagnostics, USA)) a apo B metodą immunochemiczną (firmy Johnson & Johnson Clinical Diagnostics, USA). Surowice, w których stężenie triglicerydów było powyżej 4,56 mmol/l nie były wykorzystywane do analizy statystycznej, stanowiły one poniżej 1% wszystkich zebranych próbek. Wszystkie oznaczenia przeprowadzono w Zakładzie Biochemii Klinicznej Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego w Krakowie. Na wykonanie pracy otrzymano zgodę Komisji Bioetycznej (KBET/125/B/2012). Laboratorium, w którym przeprowadzone zostały oznaczenia uczestniczy w międzynarodowym programie kontroli jakości RFB (Reference Institute for Bioanalytics, Niemcy). Do oszacowania stężenia LDLC wykorzystano wzory: Friedewalda (LDLC<sub>F</sub>) [8], Cordova (LDLC<sub>C</sub>) [22] i Planelli (LDLC<sub>P</sub>) [20].

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:

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

Dla wszystkich próbek porównano stężenia oszacowanych wartości LDLC z wartościami LDLC<sub>D</sub>. Analizę wykonano osobno w grupie dzieci poniżej i powyżej pierwszego roku życia, a także dla niskich (< 2.0 mmol/l) i wysokich (≥ 2,0 mmol/l) stężeń LDLC<sub>D</sub>. Zastosowany podział na grupy wiekowe wynikał z diety, do pierwszego roku życia w diecie dziecka dominujący udział stanowi mleko. Osobną analizę przeprowadzono dla próbek z niskimi i wysokimi wartościami HbA1c (< 6,0 % i ≥ 6,0 %) oraz dla próbek w których stężenie kreatyniny było poniżej 74,0 μmol/l (średnia ± SD:

34,6±15,5 μmol/l) oraz powyżej 74,0 μmol/l (średnia ± SD: 271,1 ± 166,9 μmol/l). Do oceny statystycznej wykorzystano statystyki opisowe (średnia arytmetyczna oraz odchylenie standardowe (SD)). W celu porównania wartości stężeń LDLC wyliczonych za pomocą wzorów: Friedewalda, Cordova i Planelli z wartościami stężeń LDLC<sub>D</sub>, wykorzystano współczynnik korelacji Pearsona oraz analizę Blanda-Altmana (B-A). Metoda B-A umożliwia ocenę porównywalności wartości stężeń LDLC oszacowanych za pomocą danego wzoru z wartościami stężeń LDLC oznaczonymi metodą bezpośrednią (metoda odniesienia). Na osi OX zaznaczone są średnie wartości stężeń LDLC uzyskane z danego wzoru i metody bezpośredniej ((LDLC oszacowane + LDLC<sub>D</sub>)/2) a na osi OY wartości różnicy pomiędzy stężeniami LDLC uzyskanymi z danego wzoru i metody bezpośredniej (LDLC oszacowane – LDLC<sub>D</sub>). Linia ciągła oznacza średnią wartość różnicy, linie przerywane oznaczają zakres zgodności (średnia różnica ± 1,96SD) a linia ukośna oznacza linie trendu (korelację). Do porównania średnich wartości stężeń zastosowano analizę wariancji z testem post-hoc Tukey'a dla tych równych N. Natomiast do porównania średnich wartości różnic zastosowano test t-studenta. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programów Statistica 7.0 (StatSoft), Microsoft Excel 2007, GraphPad Prism 5. Oceniono rozkład zmiennych ciągłych pod kątem ich zgodności z rozkładem normalnym przy zastosowaniu testu Shapiro-Wilk'a. Wartość p<0,05 przyjęto za znamienne statystycznie.

## Wyniki

W tabeli I przedstawiono średnie wartości LDLC<sub>D</sub> i oszacowanych LDLC dla próbek pobranych od dzieci poniżej i powyżej pierwszego roku życia, dla próbek z niskimi i wysokimi stężeniami HbA1c oraz dla próbek ze stężeniem kreatyniny poniżej oraz powyżej 74 μmol/l. Biorąc pod uwagę wszystkie próbki stwierdzono, że

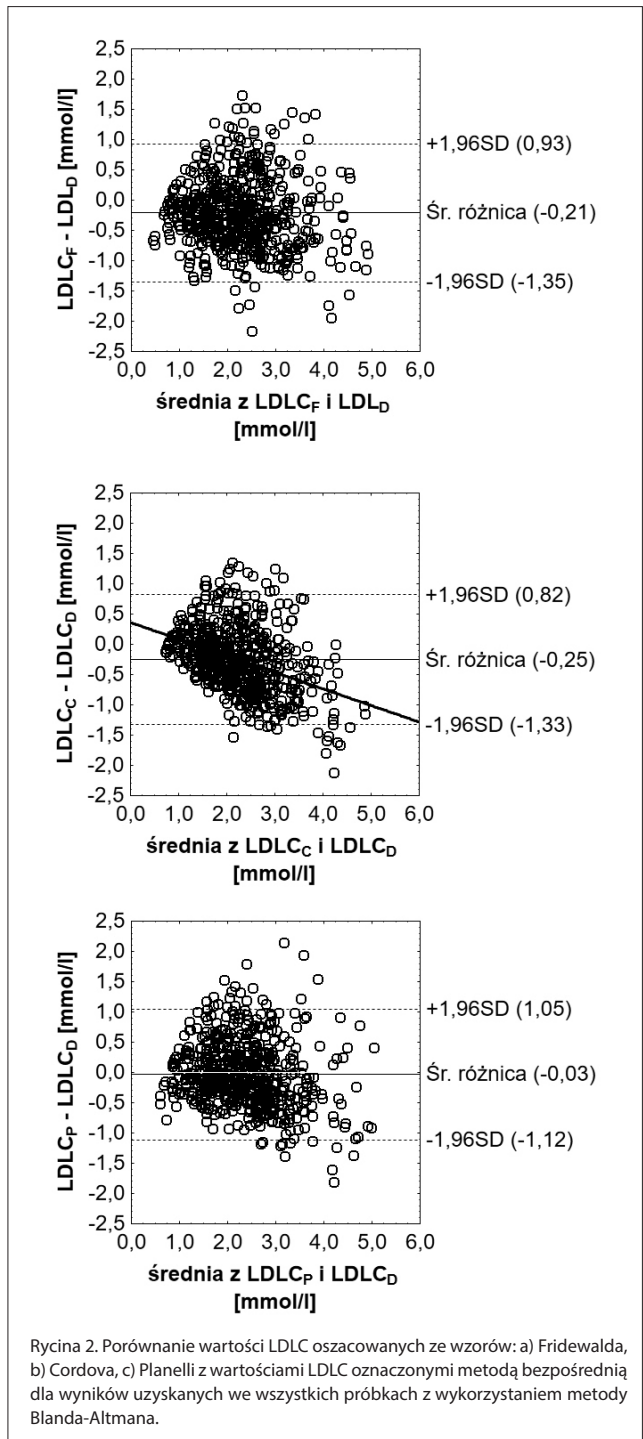
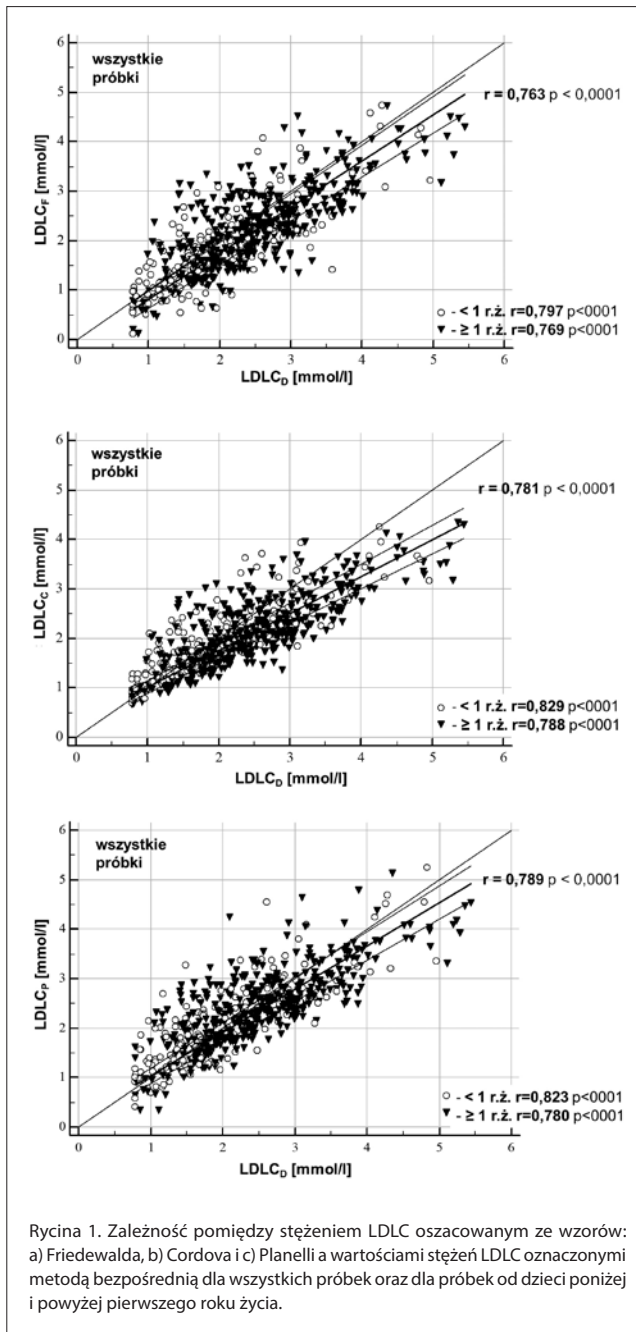
średnie wartości stężenia LDLC<sub>F</sub> i LDLC<sub>C</sub> były istotnie statystycznie niższe w porównaniu do średniej wartości stężenia LDLC<sub>D</sub> (w obu przypadkach p<0,0001) (tab. I). Podobne różnice stwierdzono również dla próbek pobranych od dzieci powyżej pierwszego roku życia (tab. I). Natomiast nie wykazano istotnych statystycznie różnic pomiędzy LDLC<sub>F</sub> a LDLC<sub>D</sub> dla wszystkich zebranych próbek oraz dla próbek pochodzących od dzieci powyżej 1 r.ż. (tab. I). Istotnych różnic nie stwierdzono również pomiędzy wartościami LDLC oszacowanymi ze wzorów a LDLC<sub>D</sub> u dzieci poniżej pierwszego roku życia (tab. I). Dla próbek o stężeniu LDLC<sub>D</sub> poniżej 2,0 mmol/l stwierdzono, że średnia wartość stężenia LDLC<sub>F</sub> była istotnie statystycznie wyższa od średniej wartości LDLC<sub>D</sub> (p<0,0001) (tab. I). Natomiast dla stężeń LDLC<sub>D</sub> powyżej 2,0 mmol/l średnie wartości stężeń LDLC<sub>F</sub>, LDLC<sub>C</sub> i LDLC<sub>P</sub> były istotnie statystycznie niższe od średniej wartości stężenia LDLC<sub>D</sub> (we wszystkich przypadkach p<0,0001) (tab. I). Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w średnich wartościach LDLC oszacowanych za pomocą analizowanych wzorów a LDLC<sub>D</sub> zarówno dla próbek o stężeniu HbA1c poniżej 6,0% jak i powyżej 6,0% (tab. I). Istotne statystycznie różnice w średnich wartościach stężeń LDLC wykazano pomiędzy LDLC<sub>F</sub> i LDLC<sub>D</sub> oraz pomiędzy LDLC<sub>C</sub> i LDLC<sub>D</sub> tylko dla próbek o stężeniu kreatyniny poniżej 74,0 μmol/l (tab. I). Analizując wyniki uzyskane we wszystkich próbkach stwierdzono silne korelacje pomiędzy stężeniem LDLC<sub>F</sub>, LDLC<sub>C</sub>, LDLC<sub>P</sub> a stężeniem LDLC<sub>D</sub> dla wszystkich próbek oraz dla próbek od dzieci poniżej i powyżej pierwszego roku życia (r=0,763-0,829, we wszystkich przypadkach p<0,0001) (ryc. 1). Natomiast porównując wartości współczynników korelacji pomiędzy oszacowanymi wartościami LDLC a LDLC<sub>D</sub> dla próbek o stężeniu LDLC<sub>D</sub> <2,0 mmol/l oraz ≥2,0 mmol/l, wykazano niższe wartości współczynników korelacji dla próbek o stężeniu LDLC<sub>D</sub> <2,0 mmol/l (r=0,484-0,496, we wszystkich przypadkach p<0,001) w porównaniu do próbek o stężeniu

Tabela I. Średnie (±SD) wartości i zakres stężenia cholesterolu frakcji LDL oznaczonego metodą bezpośrednią i oszacowanego za pomocą wzoru Friedewalda, wzoru Cordova i wzoru Planelli.

	Wszystkie próbki		Wiek [lata]		LDLC <sub>D</sub> [mmol/l]		Hemoglobina A1c [%]		Kreatynina [μmol/l]	
			< 1	≥ 1	< 2,0	≥ 2,0	< 6,0	≥ 6,0	< 74,0	≥ 74,0
	N=594	N=175	N=419	N=227	N=367	N=44	N=90	N=317	N=100	
LDLC <sub>D</sub> [mmol/l]	2,63±0,91 0,78–5,44	2,05±0,92 0,78–4,96	2,45±0,88 0,78–5,44	1,48±0,35 0,78–1,99	2,90±0,71 2,00–5,44	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	
LDLC <sub>F</sub> [mmol/l]	2,15±0,86* 0,11–4,74	1,99±0,86 0,11–4,79	2,25±0,83* 0,11–4,72	1,48±0,61 0,11–3,34	2,56±0,73* 0,90–4,74	2,32±0,76 1,00–4,26	2,22±0,85 0,50–4,52	2,17±0,88* 0,11–4,72	2,12±0,86 0,54–4,31	
LDLC <sub>C</sub> [mmol/l]	2,11±0,71* 0,67–4,34	1,99±0,74 0,70–4,26	2,15±0,69* 0,67–4,34	1,55±0,47 0,67–3,11	2,45±0,61* 1,21–4,34	2,14±0,65 0,90–4,06	2,02±0,69 0,67–3,96	2,03±0,73* 0,67–4,34	2,23±0,69 0,80–4,30	
LDLC <sub>P</sub> [mmol/l]	2,32±0,82 0,33–5,25	2,11±0,87 0,40–5,25	2,41±0,77 0,33–5,14	1,67±0,56 0,33–3,28	2,75±0,67* 1,22–5,25	2,43±0,69 1,18–4,08	2,45±0,87 0,66–4,79	2,33±0,84 0,33–5,25	2,28±0,77 0,57–4,53	

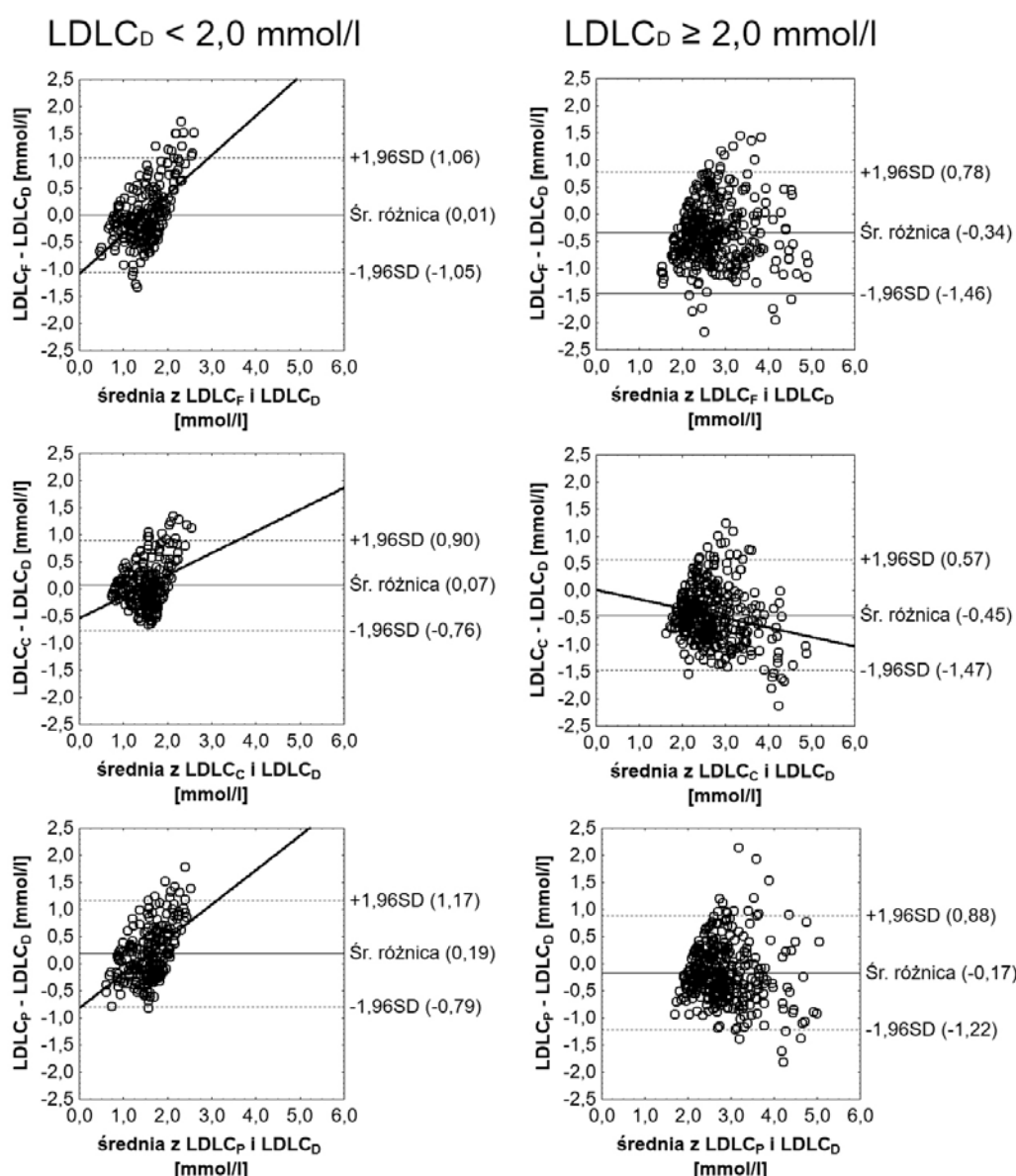
LDLC<sub>C</sub> – stężenie cholesterolu frakcji LDL oszacowanego za pomocą wzoru Cordova; LDLC<sub>D</sub> – stężenie cholesterolu frakcji LDL oznaczonego metodą bezpośrednią; LDLC<sub>F</sub> – stężenie cholesterolu frakcji LDL oszacowanego za pomocą wzoru Friedewalda; LDLC<sub>P</sub> – stężenie cholesterolu frakcji LDL oszacowanego za pomocą wzoru Planelli;

Porównanie średniego stężenia LDLC oszacowanego za pomocą wzorów z LDLC<sub>D</sub> \*p<0,0001



LDL<sub>C<sub>D</sub></sub>  $\geq 2,0$  mmol/l ( $r=0,620-0,645$ , we wszystkich przypadkach  $p < 0,001$ ). Biorąc pod uwagę wszystkie próbki, w oparciu o analizę B-A stwierdzono, że szacowane stężenia LDLC były niższe od stężeń LDL<sub>C<sub>D</sub></sub> 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 (ryc. 2). Ponadto istotna ujemna korelacja pomiędzy (LDL<sub>C<sub>C</sub></sub> - LDL<sub>C<sub>D</sub></sub>) a ((LDL<sub>C<sub>D</sub></sub> + LDL<sub>C<sub>C</sub></sub>)/2) ( $r=-0,386$ ;  $p < 0,0001$ ) (ryc. 2b) wskazuje, że stężenia LDL<sub>C<sub>C</sub></sub> nie były porównywalne ze stężeniami LDL<sub>C<sub>D</sub></sub>. Dla próbek o stężeniu LDL<sub>C<sub>D</sub></sub> poniżej 2,0 mmol/l wykazano dodatnią korelację pomiędzy (LDL<sub>C<sub>F</sub></sub> - LDL<sub>C<sub>D</sub></sub>) a ((LDL<sub>C<sub>F</sub></sub> + LDL<sub>C<sub>D</sub></sub>)/2), pomiędzy (LDL<sub>C<sub>C</sub></sub> - LDL<sub>C<sub>D</sub></sub>) a ((LDL<sub>C<sub>C</sub></sub> + LDL<sub>C<sub>D</sub></sub>)/2) oraz pomiędzy (LDL<sub>C<sub>P</sub></sub> - LDL<sub>C<sub>D</sub></sub>) a ((LDL<sub>C<sub>P</sub></sub> + LDL<sub>C<sub>D</sub></sub>)/2) (odpowiednio  $r=0,566$ ;  $r=0,336$ ;  $r=0,504$  we wszystkich przypadkach  $p < 0,001$ ) (ryc. 3a, 3c, 3e). 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

LDL<sub>C<sub>D</sub></sub> poniżej 2,0 mmol/l. Natomiast dla próbek o stężeniu LDL<sub>C<sub>D</sub></sub> 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 0,34 mmol/l (95% CI: -1,46; 0,78), średnio 0,45 mmol/l (95% CI: -1,47; 0,57) i średnio 0,17 mmol/l (95% CI: -1,23; 0,88) (ryc. 3b, 3d, 3f). Dodatkowo, wykazano słabą ujemną korelację pomiędzy różnicą (LDL<sub>C<sub>C</sub></sub> - LDL<sub>C<sub>D</sub></sub>) a średnim stężeniem LDLC ((LDL<sub>C<sub>C</sub></sub> + LDL<sub>C<sub>D</sub></sub>)/2) ( $r=-0,386$ ;  $p < 0,0001$ ) (ryc. 3d). 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. Także w oparciu o metodę B-A nie stwierdzono porównywalności wartości stężeń LDL<sub>C<sub>C</sub></sub> oraz LDL<sub>C<sub>P</sub></sub> z LDL<sub>C<sub>D</sub></sub> dla próbek o stężeniu HbA1c poniżej 6,0%

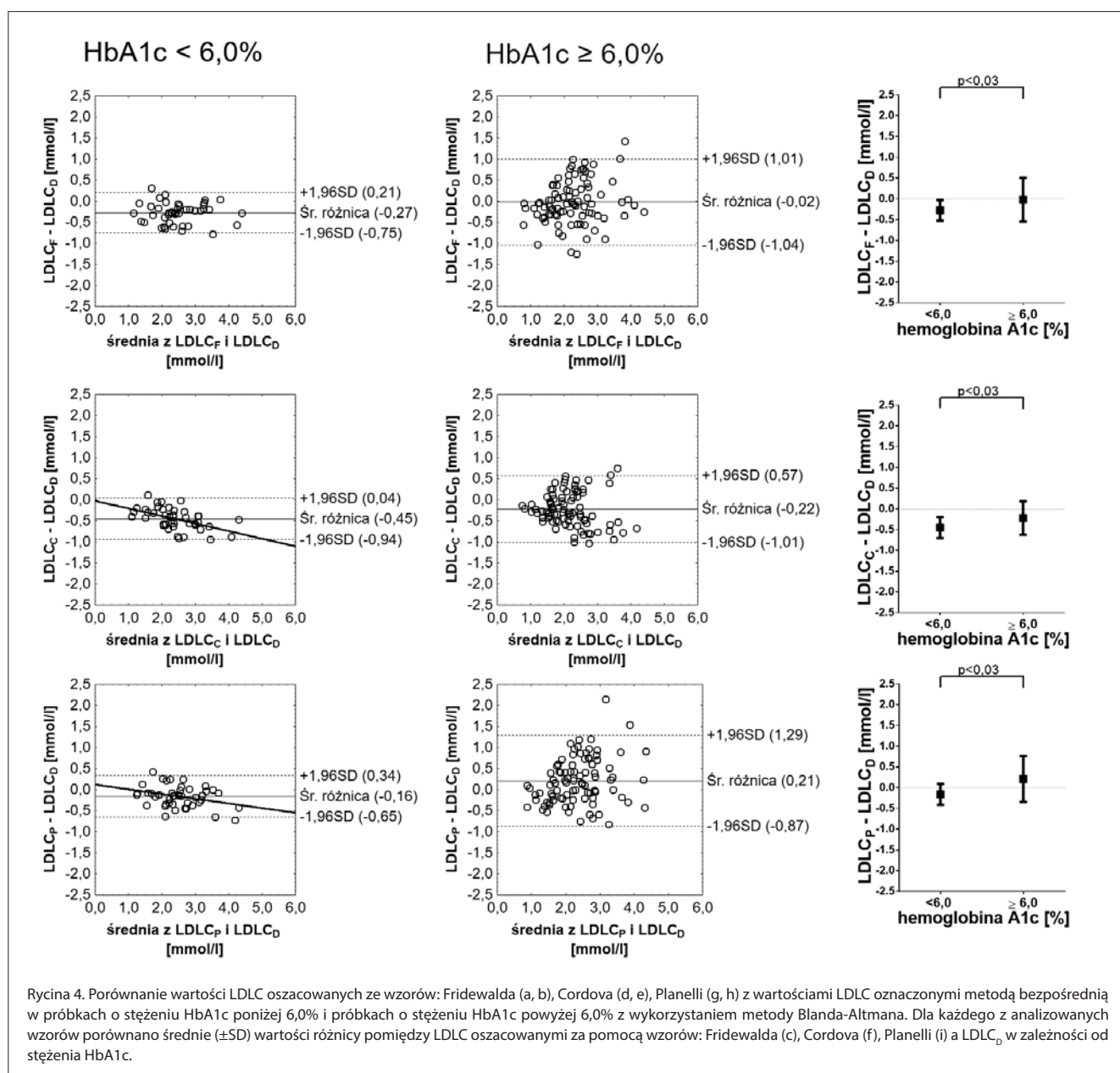


Rycina 3. Porównanie wartości LDLC oszacowanych ze wzorów: Fridewalda (a, b), Cordova (c, d), Planelli (e, f) z wartościami LDLC oznaczonymi metodą bezpośrednią w próbkach o stężeniu LDLc<sub>D</sub> poniżej 2,0 mmol/l i w próbkach o stężeniu LDLc<sub>D</sub> powyżej 2,0 mmol/l z wykorzystaniem metody Blanda-Altmana.

(ryc. 4d, 4g). Jedynie wartości stężeń LDLc<sub>F</sub> były porównywalne z LDLc<sub>D</sub> w analizowanym zakresie stężeń dla LDLc (ryc. 4a). Dla próbek o stężeniu HbA1c powyżej 6,0% wartości stężeń LDLc<sub>F</sub>, LDLc<sub>C</sub> oraz LDLc<sub>P</sub> były porównywalne z LDLc<sub>D</sub> (ryc. 4b, 4e, 4h). Mimo to dla tej grupy próbek stwierdzono znacznie większy rozrzut wartości różnic: (LDLc<sub>F</sub>-LDLc<sub>D</sub>), (LDLc<sub>C</sub>-LDLc<sub>D</sub>) i (LDLc<sub>P</sub>-LDLc<sub>D</sub>) w porównaniu do odpowiadającym im wartościom różnic dla próbek o stężeniu HbA1c poniżej 6,0% (ryc. 4c, 4f, 4i). Dla próbek, w których było oznaczone stężenie kreatyniny, brak porównywalności wykazano tylko pomiędzy LDLc<sub>C</sub> i LDLc<sub>D</sub> dla próbek o stężeniu kreatyniny poniżej 74,0 μmol/l (ryc. 5d). Różnice pomiędzy średnimi wartościami różnic pomiędzy LDLc<sub>F</sub> i LDLc<sub>D</sub>, pomiędzy LDLc<sub>C</sub> i LDLc<sub>D</sub> oraz pomiędzy LDLc<sub>P</sub> i LDLc<sub>D</sub> dla próbek o stężeniu kreatyniny poniżej 74,0 μmol/l oraz dla próbek o stężeniu kreatyniny powyżej 74,0 μmol/l wynosiły odpowiednio 0,34 mmol/l, 0,40 mmol/l i 0,34 mmol/l (we wszystkich przypadkach p<0,001) (ryc. 5c, 5f, 5i).

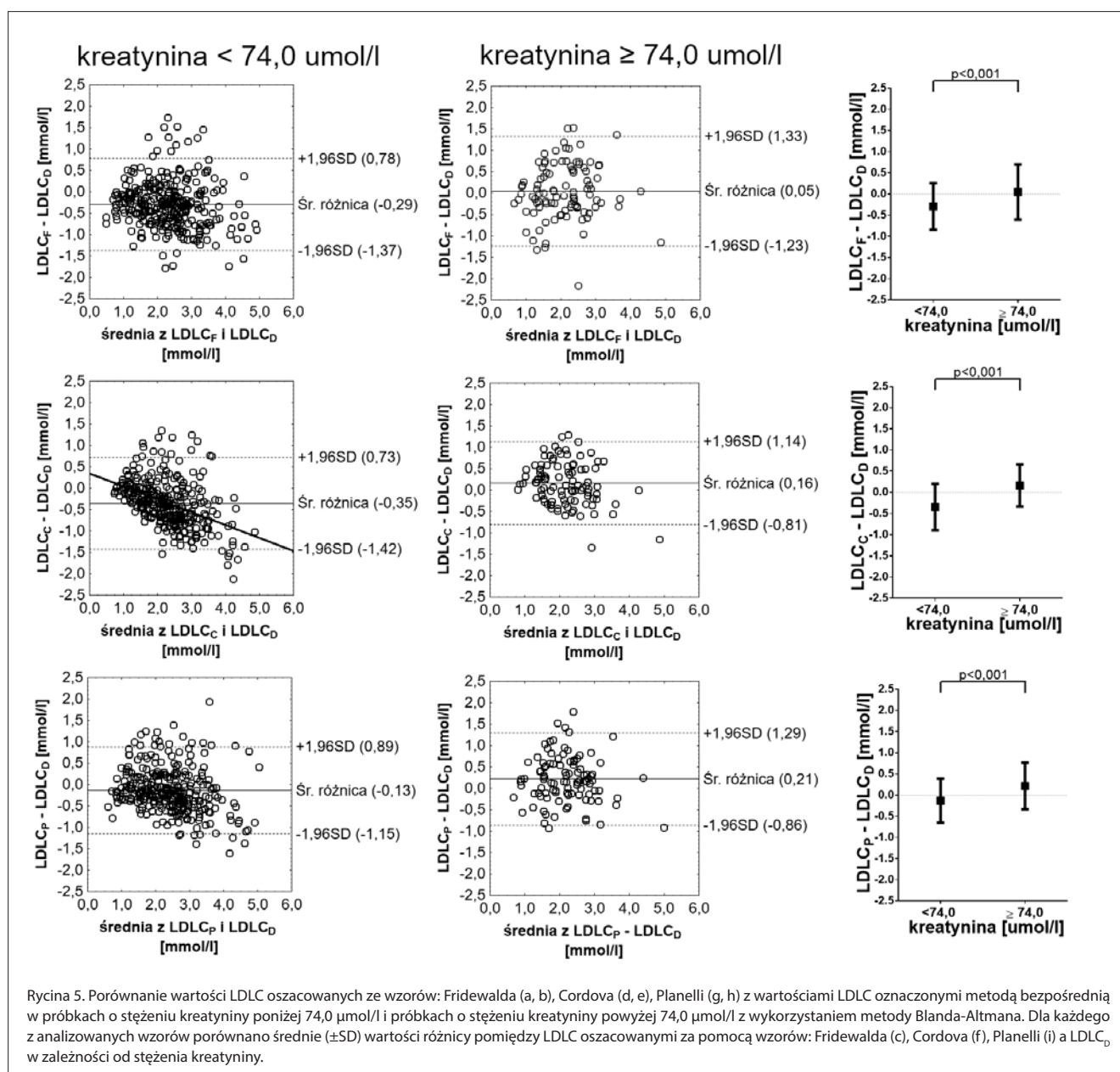
## Dyskusja

Każda metoda analityczna wykorzystywana do oznaczeń w materiale biologicznym może być podatna nie tylko na interferencje takie jak np. hemoliza czy lipemia, ale także na interferencje spowodowane obecnością substancji egzogennych lub podwyższonego stężenia substancji endogennych. Bardzo trudno jest oceniać wpływ zmienionej matrycy próbki surowicy krwi na oznaczenia biochemiczne. Inna matryca próbki surowicy będzie u chorych z cukrzycą (podwyższone HbA1c) lub chorobami nerek (podwyższone stężenie kreatyniny) w porównaniu do matrycy surowic zdrowych dzieci. Zmieniony skład matrycy próbki może powodować zmniejszenie swoistości zarówno metod do bezpośredniego oznaczania stężenia LDLc jak i metod stosowanych do oznaczania parametrów wykorzystywanych we wzorach do szacowania stężenia LDLc, co przekłada się na większe różnice w wynikach uzyskanych różnymi sposobami [23]. Uzyskane współczynniki korelacji pomiędzy LDLc<sub>F</sub> a LDLc<sub>D</sub> były znacznie



niższe ( $r=0,763$ ;  $p<0,0001$ ) niż opublikowane przez Garoufi i wsp. ( $r=0,910$ ;  $p<0,001$ ) [24] oraz Kubo i wsp. ( $r=0,977$ ;  $p<0,001$ ) [25]. Różnice te mogą wynikać nie tylko z wykorzystania do badań próbek pochodzących od innej populacji pediatrycznej ale też z zastosowanej metody bezpośredniej do oznaczenia stężenia LDLC. Garoufi i wsp. [24] porównywali wyniki LDLC<sub>F</sub> i LDLC<sub>D</sub> uzyskane w próbkach pobranych na czczo od dzieci w wieku od 2 do 18 lat, które nie były hospitalizowane w przeciągu ostatniego miesiąca i nie występowała u nich ostra infekcja w przeciągu ostatnich 10 dni [24]. W przeciwieństwie do obecnej pracy, 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 [24]. Z kolei Kubo i wsp. [25] wykonali oznaczenia w próbkach pobranych na czczo od dzieci zdrowych w wieku od 3 do 14 lat, przed okresem pokwitania z badanej grupy wykluczyli dzieci z cukrzycą, niedoczynnością tarczycy i otyłością. W większości badań przeprowadzonych w populacji osób dorosłych, wartości współczynnika korelacji dla zależności pomiędzy

LDLC<sub>F</sub> a LDLC<sub>D</sub> [26 – 33] oraz między LDLC<sub>C</sub> a LDLC<sub>D</sub> [22, 26, 27, 28], były wyższe (od  $r=0,881$  do  $r=0,980$ ) niż uzyskane w niniejszej pracy. Wyjątek stanowiły wyniki analiz korelacji przedstawione przez Badrakiya i wsp. [33] oraz Kamal i wsp. [34] dla zależności pomiędzy LDLC<sub>F</sub> a LDLC<sub>D</sub> oraz przez Dansethakul i wsp. [32] dla zależności pomiędzy LDLC<sub>C</sub> a LDLC<sub>D</sub>. Cytowani autorzy wykazali porównywalne wartości współczynników korelacji z wartościami uzyskanymi w niniejszej pracy. Analiza Blanda-Altmana wykazała, że średnie wartości różnic między stężeniem LDLC<sub>F</sub> a LDLC<sub>D</sub> (-0,21 mmol/l) oraz między LDLC<sub>C</sub> a LDLC<sub>D</sub> (-0,25 mmol/l) były większe w porównaniu do średniej wartości różnicy pomiędzy LDLC<sub>P</sub> a LDLC<sub>D</sub> (-0,03 mmol/l) dla wszystkich zebranych próbek. Uzyskana średnia wartość różnicy pomiędzy LDLC<sub>F</sub> a LDLC<sub>D</sub> była porównywalna z danymi opublikowanymi przez Kubo i wsp. [25] 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. [24] 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. [24] uzyskali różnicę pomiędzy LDLC<sub>F</sub> a LDLC<sub>D</sub> równą -0,14 mmol/l. Podobną wartość różnicy otrzymali Yu i wsp. [35]. Większość opublikowanych badań, na podstawie których można było uzyskać dane dotyczące średnich wartości różnic w stężeniach LDLC uzyskanych różnymi metodami było przeprowadzonych na próbkach pobranych na czczo, od osób dorosłych należących do różnych populacji [27, 28, 29, 30, 36]. Uzyskana w obecnej pracy średnia wartość różnicy pomiędzy LDLC<sub>F</sub> a LDLC<sub>D</sub> była porównywalna z wynikami przedstawionymi przez większość autorów [27, 29, 30, 36] i nieco wyższa od średniej wykazanej przez Martins i wsp. [28]. Z kolei Choi i wsp. [37] i Sridevi i wsp. [38] wykazali pięć razy niższe średnie wartości różnic. Mimo, że badania były prowadzone [37, 38] różnych populacjach nie uzyskano różnic w średnich wartościach różnic pomiędzy LDLC<sub>F</sub> a LDLC<sub>D</sub> [37, 38]. Badrakiya i wsp. [33] i Kamal i wsp. [34] otrzymali prawie dwukrotnie większe średnie wartości różnic. Średnia wartość różnicy pomiędzy LDLC<sub>C</sub> a LDLC<sub>D</sub> (-0,25 mmol/l), uzyskana w niniejszej pracy, była większa

od średnich wartości różnic podanych przez Onyenekwu i wsp. [27], Martins i wsp. [28] oraz przez Choi i wsp. [37]. Choi i wsp. [37] wykazali, że średnia wartość różnicy dla próbek od pacjentów hospitalizowanych była niższa (-0,10 mmol/l) [37] w porównaniu do średniej wartości dla próbek pochodzących od osób niehospitalizowanych (-0,31 mmol/l). Potwierdza to przydatność stosowania wzoru LDLC<sub>C</sub> w populacji szpitalnej. Do oszacowania stężenia LDLC<sub>C</sub> wymagane jest jedynie oznaczenie stężenia TC i HDLC. Ważne jest to szczególnie dla dzieci bo umożliwia pobranie mniejszej objętości krwi. Jednakże analiza Blanda-Altmana przeprowadzona w niniejszej pracy sugeruje, że wyniki stężenia LDLC<sub>C</sub> nie są porównywalne z wynikami stężenia LDLC<sub>D</sub> w analizowanym zakresie stężeń dla LDLC dla wszystkich zebranych próbek. Jednak dla próbek o stężeniu LDLC<sub>D</sub> poniżej 2,0 mmol/l oszacowane wartości LDLC nie były porównywalne z LDLC<sub>D</sub>, niezależnie od zastosowanego wzoru. Dodatkowo dla próbek o stężeniu LDLC<sub>D</sub> powyżej 2,0 mmol/l brak porównywalności stwierdzono pomiędzy wartościami stężeń LDLC<sub>C</sub> a LDLC<sub>D</sub>. Dlatego też wzór Cordova nie powinien być stosowany w populacji pediatrycznej.

W obecnej pracy wykazano znacznie większe różnice pomiędzy LDLC oszacowanym a oznaczonym dla próbek, w których stężenie HbA1c było powyżej 6,0% w porównaniu do próbek o stężeniu HbA1c poniżej 6,0%. Zmodyfikowane pod wpływem procesu glikacji lipoproteiny czy białka mogą przyczyniać się do niższej swoistości metod enzymatycznych. Zmiany w składzie ilościowym i jakościowym białek w ostrych stanach zapalnych czy w chorobie przewlekłej mogą wpływać na różnice pomiędzy stężeniami LDLC oszacowanymi a LDLC<sub>p</sub>. Wykazano również, że dla próbek surowic o stężeniu kreatyniny <74,0 μmol/l średnie wartości różnic pomiędzy LDLC<sub>f</sub> a LDLC<sub>p</sub>, pomiędzy LDLC<sub>c</sub> a LDLC<sub>p</sub> oraz pomiędzy LDLC<sub>p</sub> a LDLC<sub>d</sub> różniły się istotnie statystycznie w porównaniu do odpowiadającym im średnim wartościom różnic dla próbek o stężeniu kreatyniny ≥ 74,0 μmol/l. Nie jest to dowodem wprost, że wysokie stężenie kreatyniny odpowiada za obserwowane różnice ale wskazuje, że w surowicach z nieprawidłowym jej stężeniem można spodziewać się różnic pomiędzy oszacowanym a oznaczonym stężeniem cholesterolu frakcji LDL. Brak jest doniesień literaturowych, w których autorzy porównywaliby stężenia LDLC wyliczone za pomocą wzorów ze stężeniami LDLC oznaczonymi metodą bezpośrednią z równoczesnym uwzględnieniem stężenia HbA1 czy kreatyniny. Pomimo coraz lepszych metod oznaczania stężenia LDLC nadal publikowane są prace oceniające przydatność oszacowanych wartości stężeń LDLC [39]. Pokazuje to, że ani metoda bezpośrednia, ani wzory stosowane do oszacowania stężenia LDLC nie są wolne od ograniczeń. Chociaż w wielu wypadkach różnice pomiędzy stężeniami LDLC uzyskanymi w oparciu o dany wzór a otrzymanymi metodą bezpośrednią nie są istotne statystycznie, to u niektórych pacjentów może się zdarzyć, że przy charakterystycznym obrazie klinicznym i dodatnim wywiadzie rodzinnym różnice te będą decydować o włączeniu leczenia hipolipemizującego. 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, zwłaszcza u dzieci. Podsumowując, różnice pomiędzy stężeniem LDLC mierzonym metodą bezpośrednią a stężeniem oszacowanym zależą w znacznym stopniu od składu matrycy próbki oraz zastosowanego wzoru. Ze względu na 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. Na wydruku wynikowym powinna być umieszczona informacja jaką metodą zostało wykonane oznaczenie cholesterolu LDL.

### Informacje o źródłach finansowania:

Badania były finansowane w ramach Działalności Statutowej K/ZDS/002914

### Piśmiennictwo

- Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. World Health Organization 2015, [www.who.int/cardiovascular\\_diseases/publications/atlas\\_cvd/en/](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/publications/atlas_cvd/en/)
- Daniels SR, Greer FR. Lipid screening and cardiovascular health in childhood. *Pediatrics*. 2008; 122(1): 198–208.
- McCordle BW, Kwiterovich PO, McBride PE, Daniels SR, et al. Guidelines for lipid screening in children and adolescents: bringing evidence to the debate. *Pediatrics*. 2012; 130(2): 353–356.
- Uznańska B, Plewka M. Rewizja wytycznych dotyczących leczenia zaburzeń lipidowych wysokiego ryzyka u dzieci i młodzieży — najnowsze stanowisko The American Heart Association. 2007; 12(1–2): 32–38.
- Berenson GS, Srinivasan SR, Bao W, Newman WP 3rd, et al. Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. The Bogalusa Heart Study. *N Engl J Med*. 1998; 338(23): 1650–1656.
- Expert panel on integrated guidelines for cardiovascular health and risk reduction in children and adolescents: Summary Report. *Pediatrics*. 2011; 128(Suppl): 213–256.
- 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(2): 236–254.
- 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(6): 499–502.
- CDC – Laboratory Quality Assurance and Standardization Programs – Manufacturer Certification Program. 2018, [www.cdc.gov/labstandards/crmln\\_manufacturers.html](http://www.cdc.gov/labstandards/crmln_manufacturers.html)
- Miller WG, Myers GL, Sakurabayashi I, et al. Seven direct methods for measuring HDL and LDL cholesterol compared with ultracentrifugation reference measurement procedures. *Clin Chem*. 2010; 56(6): 977–986.
- Nauck M, Graziani MS, Bruton D, Cobbaert C, et al. Analytical and clinical performance of a detergent-based homogeneous LDL-cholesterol assay: a multicenter evaluation. *Clin Chem*. 2000; 46(4): 506–514.
- Esteban-Salan M, Guimon-Bardesi A, de La Viuda-Unzueta JM, Azcarate-Ania MN, et al. Analytical and clinical evaluation of two homogeneous assays for LDL-cholesterol in hyperlipidemic patients. *Clin Chem*. 2000; 46(8 Pt 1): 1121–1131.
- Kakuyama T, Ochiai K, Kishi K, Ohta Y, et al. New homogeneous assays for estimation of serum HDL and LDL-cholesterol levels. *Clin Chem*. 2001; 47(S6): 55–56.
- Miller WG. Matrix effects in the measurement and standardization of lipids and apolipoproteins. *Curr Opin Lipidol*. 1992; 3(6): 361–364.
- Bairaktari ET, Tzallas C, Kalientzidou M, Tselepis AD, et al. Evaluation of alternative calculation methods for determining low-density lipoprotein cholesterol in hemodialysis patients. *Clin Biochem*. 2004; 37(10): 937–940.
- Bairaktari E, Elisaf M, Tzallas C, Karabina SA, et al. Evaluation of five methods for determining low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) in hemodialysis patients(1). *Clin Biochem*. 2001; 34(8): 593–602.
- Rubies-Prat J, Reverter JL, Senti M, Pedro-Botet J, et al. Calculated low-density lipoprotein cholesterol should not be used for management of lipoprotein abnormalities in patients with diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 1993; 16(8): 1081–1086.
- Matas C, Cabre M, La Ville A, Prats E, et al. Limitations of the Friedewald formula for estimating low-density lipoprotein cholesterol in alcoholics with liver disease. *Clin Chem*. 1994; 40(3): 404–406.
- Warnick GR. Lipoprotein(a) is included in low-density lipoprotein by NCEP definition. *Clin Chem*. 1994; 40(11 Pt 1): 2115–2116.
- Planella T, Cortes M, Martinez-Bru C, Gonzalez-Sastre F, et al. Calculation of LDL-cholesterol by using apolipoprotein B for classification of nonchylomicronemic dyslipemia. *Clin Chem*. 1997; 43(5): 808–815.
- Bairaktari E, Hatzidimou K, Tzallas C, Vini M, et al. Estimation of LDL cholesterol based on the Friedewald formula and on apo B levels. *Clin Biochem*. 2000; 33(7): 549–555.



22. de Cordova CMM, de Cordova MM. A new accurate, simple formula for LDL-cholesterol estimation based on directly measured blood lipids from a large cohort. *Ann Clin Biochem.* 2013; 50(Pt 1): 13–19.
23. Ciach E, Bobilewicz D, Kmin E. Porównanie stężeń cholesterolu frakcji LDL wyliczonych z równania Friedewalda i oznaczonych metodą bezpośrednią. *Diagn Lab.* 2011; 47(4): 419–423.
24. Garoufi A, Drakatos A, Tsentidis C, Klinaki E, et al. Comparing calculated LDL-C with directly measured LDL-C in healthy and in dyslipidemic children. *Clin Biochem.* 2017; 50(1–2): 16–22.
25. Kubo T, Takahashi K, Furujo M, Hyodo Y, et al. Usefulness of non-fasting lipid parameters in children. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2017; 30(1): 77–83.
26. Siddique A, Saiedullah M, Chowdhury N, Khan A. 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.* 2014; 4(1): 10–14.
27. Onyenekwu CP, Hoffmann M, Smit F, Matsha TE, et al. 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.* 2014; 51(Pt 6): 672–679.
28. Martins J, Olorunju SAS, Murray LM, Pillay TS. Comparison of equations for the calculation of LDL-cholesterol in hospitalized patients. *Clin Chim Acta.* 2015; 444: 137–142.
29. Kapoor R, Chakraborty M, Singh N. A Leap above Friedewald Formula for Calculation of Low-Density Lipoprotein-Cholesterol. *J Lab Physicians.* 2015; 7(1): 11–16.
30. Gupta S, Verma M, Singh K. 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.* 2012; 27(2): 127–133.
31. Warade JP, Dahake H, Kavitha R. Comparison between direct estimation of LDL and Friedewald's formula. *Int Arch Integr Med.* 2016; 3(2): 10–17.
32. Dansethakul P, Thapanathamchai L, Saichanma S, Worachartcheewan A, et al. Determining a new formula for calculating low-density lipoprotein cholesterol: data mining approach. *EXCLI J.* 2015; 14: 478–483.
33. Badrakiya KM, Shah AD, Makadia MG, Patel VI, et al. Comparison of LDL – cholesterol estimated by direct method and by calculation. *Int J Biomed Adv Res.* 2016; 7(8): 353–358.
34. Kamal A, Hossain M, Chowdhury S. A comparison of calculated with direct measurement of low density lipoprotein cholesterol level. *J Chittagong Med Coll Teach Assoc.* 2009; 20(2): 19–23.
35. Yu HH, Markowitz R, De Ferranti SD, Neufeld EJ, et al. Direct measurement of LDL-C in children: performance of two surfactant-based methods in a general pediatric population. *Clin Biochem.* 2000; 33(2): 89–95.
36. Jun KR, Park H-I, Chun S, Park H, 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(3): 371–375.
37. Choi H, Shim J-S, Lee MH, Yoon YM, et al. Comparison of Formulas for Calculating Low-density Lipoprotein Cholesterol in General Population and High-risk Patients with Cardiovascular Disease. *Korean Circ J.* 2016; 46(5): 688–698.
38. Sridevi V, Anand V, Mahendrappa S. Comparison of Friedewald's and Anandaraja's formula with direct estimation of low-density lipoprotein cholesterol in Shivamogga population. *IAIM.* 2016; 3(7): 120–131.
39. Quispe R, Hendrani A, Elshazly MB, Michos ED, et al. Accuracy of low-density lipoprotein cholesterol estimation at very low levels. *BMC Med.* 2017; 15(1): 83.

**Autor do korespondencji:**

dr n. med. Katarzyna Mamica-Pociecha  
 Zakład Biochemii Klinicznej IP UJ-CM w Krakowie  
 30-663 Kraków, ul. Wielicka 265  
 tel. +48 12 6582011 wew. 1451; 669121805  
 e-mail: k.mamica@interia.pl

Otrzymano: 4.11.2018

Akceptacja do druku: 12.02.2019

Nie zgłoszono sprzeczności interesów

