

Porovnání metod Elecsys PTH a Elecsys PTH (1-84)

na vzorcích z rutinní klinické praxe

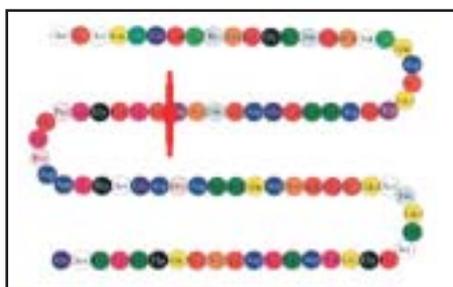
PTH je klíčový hormon pro udržování kalciové homeostázy. Patří mezi endogenní regulátory kalcium-fosfátového metabolismu, hraje významnou roli v regulaci kostních minerálů - vápníku, fosforu a hořčíku. U zdravých osob dochází již při malém poklesu koncentrace ionizovaného vápníku k sekreci PTH. Parathormon reguluje hladinu vápníku působením na metabolismus kostí stimulací procesu kostní remodelace. Při fyziologické sekreci PTH je udržována rovnováha mezi odbouráváním a novotvorbou kostí, při dlouhodobě zvýšené sekreci parathormonu začíná převládat katabolický účinek a tím dochází k destrukci kostní hmoty. Zvýšená hladina parathormonu stimuluje zpětnou resorpci vápníku v distálním tubulu a tlusté části vzestupného raménka Henleovy klíčky ledvin. Zároveň také zvyšuje vylučování fosfátů snížením zpětné resorpce v proximálním tubulu. PTH v ledvině také stimuluje činnost enzymu 1- α -hydroxylázy, která zvyšuje přeměnu 25-hydroxycholecalciferolu (kalcidiolu) na 1,25-dihydroxycholecalciferol (kalcitriol), a tím nepřímo ovlivňuje vstřebávání vápníku, fosforu a hořčíku v trávicím traktu.

Ribozomy buněk příštítných tělísek syntetizují Pre-pro-PTH o délce 115 aminokyselin. V endoplazmatickém retikulu a Golgiho aparátu je zkrácen na pro-PTH o délce 90 aminokyselin a následně o dalších 6 aminokyselin na molekulu PTH. Syntetizovaný PTH je skladován v sekrečních granulích v cytoplasmě, odkud může být v případě potřeby okamžitě

uvolňován. Vznik mRNA pro zahájení ribozomální syntézy PTH zvyšuje nejen hypokalcemie, ale také snížení hladiny fosfátu nebo vitamínu D.

Intaktní molekula PTH je tvořena řetězcem 84 aminokyselin s celkovou molekulovou hmotností přibližně 9,43 kDa. Po uvolnění z denzních granulí dochází velmi rychle (v minutách) k proteolýze a jsou vytvářeny cirkulující fragmenty.

Degradace začíná již v příštítných tělískách a pokračuje především v játrech a ledvinách. Vzniklé fragmenty jsou z krevního řečiště odstraňovány mimo jiné glomerulární filtrací. Nejčastěji dochází ke štěpení mezi 34. a 35. aminokyselinou, kdy vzniká biologicky aktivní N-fragment, vazající se na PTH receptory, s biologickým poločasem okolo 2 minut, a C-terminální fragment, který je vylučován glomerulární filtrací (obr. 1). Jeho biologický poločas



Obr. 1: Molekula PTH 1-84 s vyznačeným místem štěpení

v plazmě se u zdravých osob pohybuje mezi 30-40 minutami, u pacientů s renálním selháváním se může výrazně prodlužovat. V krvi zdravých osob je 5-25 % intaktního PTH, 75-95 % C-terminálního fragmentu

a pouze zlomek N-terminálního fragmentu. Během metabolismu PTH vzniká také část non 1-84 fragmentů, které mají neúplnou N-terminální část molekuly. Jedná se především o fragment 7-84 a dále pak fragmenty 5-84, 8-84, 10-84 nebo 15-84.

U zdravých osob je množství těchto neúplných fragmentů celkem zanedbatelné, ale u pacientů s onemocněním ledvin může být v oběhu i několik desítek procent různých non 1-84 fragmentů. Samostatnou kapitolu tvoří molekula amino-PTH, která má modifikované aminokyseliny v oblasti 15-20. Zvýšená tvorba amino-PTH se může vyskytovat u nádorů příštítných tělísek.

Laboratorní stanovení PTH je využíváno při sledování pacientů s poruchami kalciového nebo kostního metabolismu, dále u pacientů při operacích příštítných tělísek (primární hyperparathyroidismus) a také u pacientů s chronickým renálním onemocněním (sekundární hyperparathyroidismus), kteří vyžadují pravidelné sledování koncentrace PTH.

Základním terapeutickým postupem u pacientů se selháním ledvin je pravidelná dialyzační léčba. Pro dosažení co nejlepších výsledků je snaha o „optimalizaci“ dialýzy, jejímž cílem je provedení co nejučinnějšího odstranění katabolitů a vody, a zároveň bezpečného procesu z hlediska eliminace komplikací v průběhu hemodialýzy. Mezi parametry, které mohou ovlivnit účinnost dialyzačního procesu patří nejen volba dialyzátoru a dialyzačního roztoku, ale také rychlost průtoku krve nebo délka

dialýzy. Clearance endogenního kreatininu zdravých ledvin je okolo 1 200 litrů za týden, při léčení hemodialýzou 3x týdně je clearance kreatininu asi 150 litrů. Pro odstranění přebytečné vody z organismu je limitující délka dialýzy, aby nedošlo k náhlému poklesu intravaskulárního objemu. Při nastavení všech parametrů dialyzačního procesu na co možná neoptimálnější hodnoty dokáže hemodialýza velmi úspěšně eliminovat vodu a nízkomolekulární katabolity, ale zároveň s tím také dochází v průběhu několika desítek hodin k výrazným změnám koncentrace vápníku a fosfátů, a to opakovaně (obr. 2). Úskalím

ní účinek. Ke specifickým uremickým toxinům patří například β -2-mikroglobulin, některé proteiny imunologických reakcí, homocystein a v neposlední řadě také parathormon.

Metody pro laboratorní stanovení hladiny PTH můžeme rozdělit do 3 generací podle toho, jakou část molekuly jsou schopny detekovat. I. generace, používaná především v prvních RIA metodách, nebyla zcela specifická pro celou molekulu PTH. Docházelo ke zkříženým reakcím s biologicky neúčinným C-fragmentem, chyběla standardizace metody. Tyto průkopnické metody byly využívány spíše

U těchto metod je snaha o posunutí vazebného místa protilátky co nejvíce k N-terminálnímu konci molekuly PTH, což by mělo vést ke stanovení celé molekuly PTH, tzv. biointaktního PTH (obr. 3).

Metoda Roche Cobas PTH intaktní se řadí mezi metody II. generace, která stanovuje molekulu PTH ještě před rozštěpením mezi aminokyselinami v pozicích 34 a 35. Protilátka značená rutheniovým komplexem se váže na C-terminální část molekuly v pozici 37-42, biotinylovaná protilátka reaguje s N-koncem v pozici 26-32.

Typickým zástupcem metod III. generace je souprava Roche Cobas PTH (1-84). Na C-konec molekuly se v pozicích 54-59 váže protilátka značená rutheniovým komplexem, druhá protilátka s navázaným biotinem je senzitivní k pozicím 1-5 N-konce molekuly parathormonu. Základní charakteristiky obou metod jsou uvedeny v tabulce 1.

Od letošního roku došlo v systému EHK SEKK u kontrolního vzorku pro kostní markery k rozlišení používaných metod mezi PTH intaktní a PTH (1-84). Podle uvedených údajů pro cyklus BM1/14 používá 23 českých a slovenských laboratoří stanovení PTH (1-84), což je při celkovém počtu 111 účastníků téměř 21% (obr. 4). V mezinárodním kontrolním systému RI-QAS uvedlo metodu měření některým ze systémů III. generace 48 účastníků, což je 7,5% ze všech 648 laboratoří (obr. 5).

V naší práci jsme změřili hladinu parathormonu u 85 pacientů, převážně s chronickým poškozením ledvin. Převažující diagnóza u pacientů byla N289 (onemocnění ledvin a močovodu NS), 42 vzorků bylo od pacientů z nefrologické ambulance a 43 vzorků z dialyzačního střediska. Pro měření jsme použili soupravu Roche Cobas PTH intaktní (II. generace) a Roche Cobas PTH (1-84) - „biointaktní PTH“ (III. generace). Vyšetření bylo provedeno zároveň z jednoho odběru na imunanalytickém systému Cobas e 601. Výsledky měření

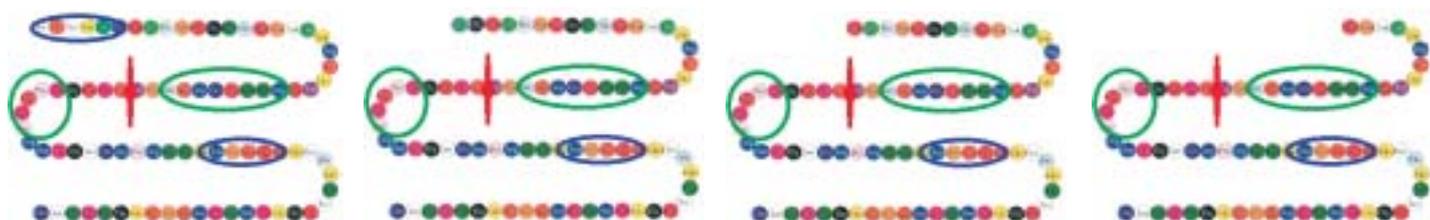
Zkratka	Jednotka	23.04.14 10:43	09.04.14 09:45	07.04.14 14:01	07.04.14 10:17
Biochemie - sérum					
S_UREA	mmol/l		13,9	2,9	12,9
S_KREA	mmol/l		747	240	762
VVP_gGF (MDRD)	mla		0,12	0,45	0,12
S_KMOC	mmol/l		413	83	487
S_Na	mmol/l		130	136	137
S_K	mmol/l		4,4	4,0	
S_Cl	mmol/l		103	98	105
S_Ca	mmol/l		2,10	2,40	2,05
S_Cal	mmol/l				1,02
S_P	mmol/l		2,82	0,77	2,30

Zkratka	Jednotka	22.04.14 10:34	08.04.14 10:45	05.04.14 13:20	05.04.14 09:27
Biochemie - sérum					
S_UREA	mmol/l		18,8	3,8	18,4
S_KREA	mmol/l		431	112	434
VVP_gGF (MDRD)	mla		0,16	0,75	0,16
S_KMOC	mmol/l		332	66	326
S_Na	mmol/l		138	136	138
S_K	mmol/l		4,0	3,8	3,9
S_Cl	mmol/l		104	102	105
S_Ca	mmol/l		1,80	2,36	1,68
S_Cal	mmol/l				0,90
S_P	mmol/l		1,93	0,48	1,56
S_Mg	mmol/l				1,01

Obr. 2: Změny vybraných parametrů v průběhu hemodialýzy

při hemodialýze je odstranění látek s vyšší molekulovou hmotností nebo i nízkomolekulárních látek vázaných na proteiny. Základní dialyzační technika nedokáže téměř vůbec eliminovat látky s molekulovou hmotností nad 12 kD a vyšší. Proto jsou u pacientů sledovány látky, které jsou touto technikou obtížně odstraňovány. Jedná se buď o retinované netoxické látky nebo o uremické toxiny, které jsou přímo zodpovědné za určitý biologicky negativ-

jako doplňkové testy při vyšetřování funkce příštítných tělísk. Metody II. generace byly vyvinuty se snahou o změření celé molekuly - intaktního PTH. Vazebná místa pro protilátky byla orientována i na biologicky aktivní část molekuly. Problémem však zůstávají non 1-84 fragmenty, které mohou vést k falešně vyšším výsledkům u některých skupin pacientů. K eliminaci falešných reakcí non 1-84 fragmentů jsou vyvíjeny metody III. generace.



Obr. 3: Vazebná místa pro protilátky kompletní molekuly PTH 1-84 a non 1-84 fragmentů 5-84, 7-84 a 15-84
Zeleně - vazebná místa pro PTH intaktní; modře - vazebná místa pro PTH (1-84); červeně - místo štěpení v pozici 34-35

Metoda	Roche Cobas PTH intaktní	Roche Cobas PTH (1-84)
Generace metody	II.	III.
Princip	Elektrochemiluminiscence (ECLIA) Sendvičový princip	Elektrochemiluminiscence (ECLIA) Sendvičový princip
Doba stanovení	18 minut	18 minut
Očekávané hodnoty	1,6-6,9 pmol/l	1,58-6,03 pmol/l
Spodní detekční limit	0,127 pmol/l	0,583 pmol/l
Rozsah měření	Do 530 pmol/l	Do 244 pmol/l
Protilátka "C-fragment"	Vazebné místo v pozici 37-42	Vazebné místo v pozici 54-59
Protilátka "N-fragment"	Vazebné místo v pozici 26-42	Vazebné místo v pozici 1-5

Tab. 1: Základní charakteristiky metod pro stanovení parathormonu

Skupina (jednotka)	Typ AV	Vzorek	AV	Typ	Mean	SD	CV	U _m	CV	U _m	Max #
[431] Parathyryin intaktní (PTH) (pmol/l)	A	Škrapiny			0	20,72	3,88	18,9			88
	B	Škrapiny			0	8,287	1,18	14,3			88
[11] Imunochemické metody:	A	17,80	2,2	23%	13,47	21,53	0	17,48	2,30	13,2	7
	B	5,200	0,72	23%	4,804	4,394	0	5,200	0,741	14,3	
[12] Beckman Coulter:	A	8,890	1,3	23%	8,889	4,232	0	8,088	1,76	24,9	8
	B	8,890	0,40	23%	7,860	1,228	0	8,890	0,828	32,9	
[13] Imunochemické metody:	A	20,20	2,48	23%	18,95	24,85	0	20,24	3,28	8,18	46
	B	4,110	0,14	23%	4,704	7,214	0	4,108	0,374	4,12	
[14] Imunochemické metody:	A	28,10	1,3	23%	19,32	38,60	0	28,11	2,28	8,93	18
	B	7,470	0,41	23%	5,721	8,189	0	7,466	0,761	10,5	
[179] Siemens (Bayer):	A	28,00	3,8	23%	18,29	38,78	0	24,88	4,82	18,1	9
	B	7,800	2,2	23%	6,882	9,717	0	7,300	1,08	23,0	
[436] Parathyryin biointaktní (PTH 1-84) (pmol/l)	A	Škrapiny			0	13,07	1,18	9,88			23
	B	Škrapiny			0	4,229	0,221	5,82			23
[11] Imunochemické metody:	A	12,70	0,33	23%	9,778	10,63	0	12,67	0,543	4,40	18
	B	4,300	0,12	23%	3,211	5,288	0	4,289	0,288	4,81	
[14] Imunochemické metody:	A	18,00	2,8	23%	11,88	18,48	0	18,00	0,890	9,93	8
	B	4,000	0,77	23%	3,141	5,019	0	4,075	0,274	6,72	

Obr. 4: Výsledky EHK SEKK, cyklus BM 1/14

Method	N	Mean	CV%	U _m
Roche Cobas 6000/8000 PTH/PTH STAT	117	10.169	20.0	0.24
Siemens/Bayer ADVIA Centaur	82	16.810	19.5	0.45
Roche Cobas 4000/e411 PTH/PTH STAT	65	10.054	34.9	0.54
Beckman Dxl 600 / 800	52	10.929	16.9	0.32
Siemens/DPC Immulite 2000	47	13.362	34.2	0.83
Roche Elecsys PTH/PTH STAT	46	10.984	25.8	0.52
Abbott Architect	40	19.166	42.3	1.60
Roche Modular E170 PTH/PTH STAT	27	9.938	22.9	0.55
Siemens/DPC Immulite 1000	21	13.292	19.1	0.69
Tosoh	18	13.719	22.0	0.89
DiaSorin, Liaison 1-84 PTH	15	6.041	39.8	0.78
Roche Cobas 6000/8000 PTH (1-84)	16	8.154	37.2	0.95
Beckman, Access/LXi725	13	9.617	28.3	0.94
Roche Cobas 4000/e411 PTH (1-84)	8	10.203	15.5	0.70
Ortho Vitros 3600/5600/ECi	7	15.751	14.0	1.04
DiaSorin, Liaison N-TACT PTH II	7	11.086	18.9	0.99
CIS IRMA	6	12.503	20.7	1.32
Roche Elecsys PTH (1-84)	5	10.186	16.9	0.96
Scantibodies, RIA	5	9.368	32.1	1.68
Roche Modular E170 PTH (1-84)	4	10.786	23.9	1.61
DiaSorin (RIA)	2	9.090	3.6	0.29

Obr. 5: Výsledky EHK RIQAS, vzorek 4/14

jsou zhodnoceny pomocí programu Med-Calc a uvedeny v příložených tabulkách a grafech.

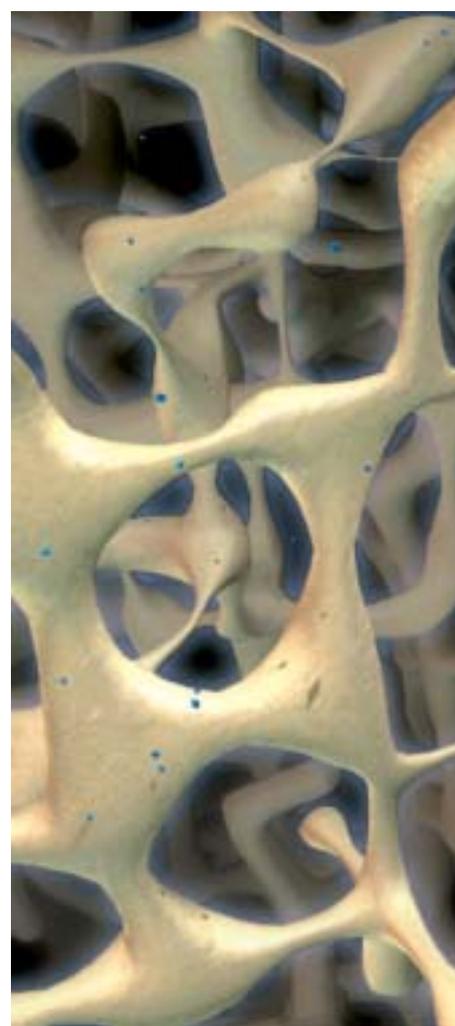
Z našich výsledků vyplývá, že hodnoty naměřené metodou Roche PTH (1-84) u pacientů s chronickým renálním onemocněním jsou v průměru o 40 % nižší než hodnoty získané metodou Roche PTH in-

taktní. Odchylka měření vzrůstá s hladinou PTH, u vysokých koncentrací parathormonu jsme metodou PTH intaktní naměřili i dvojnásobné hodnoty ve srovnání s PTH (1-84).

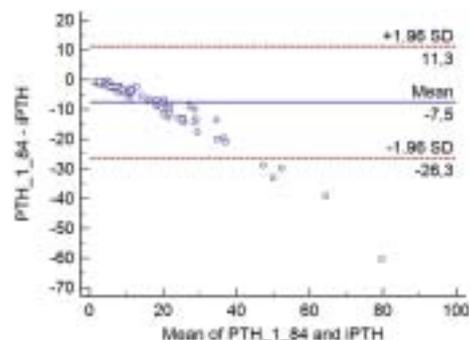
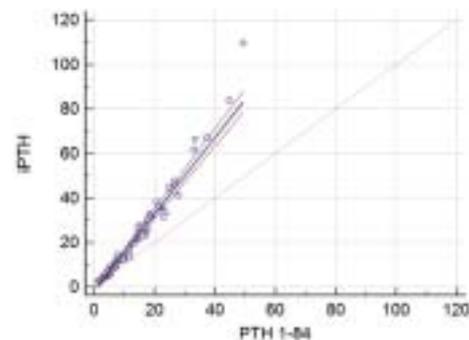
Pokud jsou u zdravých jedinců uváděny obdobné očekávané hodnoty:

PTH (1-84): (1,58-6,03 pmol/l) a PTH in-

taktní: (1,6-6,9 pmol/l), je velmi důležité u zvýšených hodnot získaných metodou PTH intaktní zvažovat možnost ovlivnění získaných výsledků renálním selháváním. Pokud laboratoř vyšetřuje PTH především u dialyzovaných pacientů, měla by posoudit možnost měřit PTH některou z metod třetí generace, u kterých nedochází k ovlivnění stanovení nespecifickými reakcemi a dokážou měřit koncentraci kompletní molekuly biointaktního PTH. Také na výsledkových listech bychom měli uvádět, zda se jedná o hodnotu získanou metodou PTH intaktní nebo PTH 1-84.

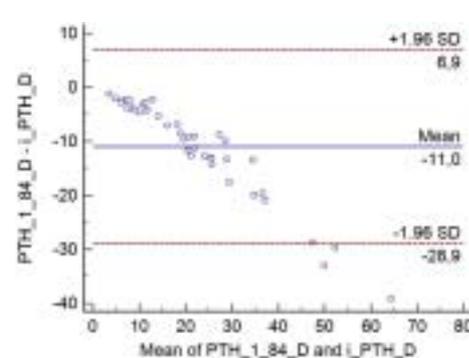
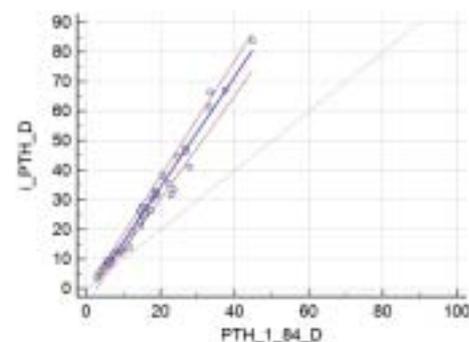


Passing-Bablokova regrese; celá skupina		
Proměnná X: Roche PTH 1-84	Počet vzorků: 85	
Proměnná Y: Roche iPTH		
	X	Y
Nejnižší hodnota	1.2	1.6
Nejvyšší hodnota	44.9	83.9
Aritmetický průměr	11.8376	19.3600
Medián	8.0000	12.4000
Směrodatná odchylka	9.8870	19.1854
Směrodatná odchylka průměru	1.0724	2.0810
Regresní rovnice		
$y = -1,261393 + 1,707674 x$		
<i>Systematická diference</i>		
Posun A	-1,261393	
95% konfidenční interval (CI)	-1,7907 až -0,7572	
<i>Proporcionální diference</i>		
Směrnice B	1,7077	
95% konfidenční interval (CI)	1,6237 až 1,7933	
<i>Náhodná diference</i>		
Směrodatná odchylka reziduí (RSD)	1,9618	
± 1.96 RSD Interval	-3,8450 až 3,8450	
Cusumův test linearity	Není signifikantní odchylka od linearity (P = 0,10)	
Pořadová korelace		
Spearmanův koeficient pořadové korelace (ρ)	0,991	
Úroveň významnosti	P < 0,0001	
95% CI pro ρ	0,986 až 0,994	



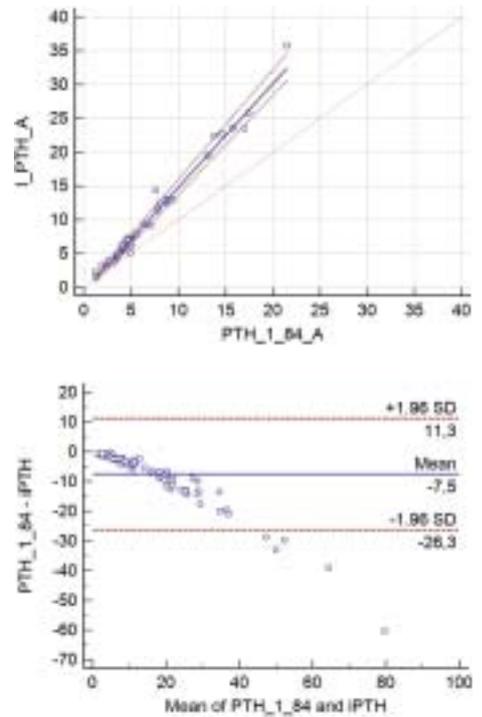
Graf 1: Statistické zhodnocení všech vzorků

Passing-Bablokova regrese; dialýza		
Proměnná X: Roche PTH 1-84	Počet vzorků: 43	
Proměnná Y: Roche iPTH		
	X	Y
Nejnižší hodnota	2.8	4.0
Nejvyšší hodnota	44.8	83.9
Aritmetický průměr	16.5	27.54
Medián	14.9	25.56
Směrodatná odchylka	9.8581	18.7352
Směrodatná odchylka průměru	1.5587	2.9623
Regresní rovnice		
$y = -1,261393 + 1,707674 x$		
<i>Systematická diference</i>		
Posun A	-2,802196	
95% konfidenční interval (CI)	-4,4161 až -1,0889	
<i>Proporcionální diference</i>		
Směrnice B	1,860524	
95% konfidenční interval (CI)	1,74077 až 1,9541	
<i>Náhodná diference</i>		
Směrodatná odchylka reziduí (RSD)	1,4755	
± 1.96 RSD Interval	-2,8920 až 2,8920	
Cusumův test linearity	Není signifikantní odchylka od linearity (P = 0,30)	
Pořadová korelace		
Spearmanův koeficient pořadové korelace (ρ)	0,989	
Úroveň významnosti	P < 0,0001	
95% CI pro ρ	0,980 až 0,994	



Graf 2: Statistické zhodnocení skupiny dialyzovaných pacientů

Passing-Bablokova regrese; nefrologická ambulance		
Proměnná X: Roche PTH 1-84	Počet vzorků: 42	
Proměnná Y: Roche iPTH		
	X	Y
Nejnižší hodnota	1,2	1.6
Nejvyšší hodnota	21.5	35.8
Aritmetický průměr	6.8	10.0214
Medián	4.8	7.1000
Směrodatná odchylka	4.8094	7.6182
Směrodatná odchylka průměru	0.7421	1.1755
Regresní rovnice		
$y = -0,557226 + 1535260 x$		
<i>Systematická diference</i>		
Posun A	-0,557226	
95% konfidenční interval (CI)	-0,9897 až -0,1471	
<i>Proporcionální diference</i>		
Směrnice B	1,5353	
95% konfidenční interval (CI)	1,4706 až 1,6176	
<i>Náhodná diference</i>		
Směrodatná odchylka reziduí (RSD)	0,5630	
± 1.96 RSD Interval	-1,1035 až 1,1035	
Cusumův test linearity	Není signifikantní odchylka od linearity (P = 0,56)	
Pořadová korelace		
Spearmanův koeficient pořadové korelace (ρ)	0,973	
Úroveň významnosti	P < 0,0001	
95% CI pro ρ	0,951 až 0,986	



Graf 3: Statistické zhodnocení skupiny pacientů z nefrologické ambulance



Literatura:

- 1) Broulík P., Dvojitý účinek parathormonu na kostní tkáň, *Interní med.* 10(5), 2008
- 2) Cobas Roche PTH (1-84) – originální návod diagnostické soupravy, Roche, 2014
- 3) Cobas Roche PTH intaktní – originální návod diagnostické soupravy, Roche, 2013
- 4) Ďurovcová E. a kol., Stanovení parathormonu u pacientů s chronickou obličkovou chorobou, *Labor Aktuell* 03/12
- 5) D'Amour P., Brosaard J.H., Rousseau L., et al.: Amino-terminal form of parathyroid hormone (PTH) with immunologic similarities to hPTH (1-84) is overproduced in primary and secondary hyperparathyroidism. *Clin. Chem* 2003; 49
- 6) Kreze A., *Praktická endokrinologie, SAP*, 1993
- 7) Racek, J. a kol., *Klinická biochemie, Galén*, 1999
- 8) RIQAS Randox Laboratories, www.riqas.com
- 9) SEKK s.r.o. Pardubice, www.SEKK.cz
- 10) Silbernagl S. - Despopoulos A., *Atlas fyziologie člověka, Avicenum*, 1981
- 11) Sluková S., *Možnosti a limity dialýzy, Postgraduální medicína, PM* 1/2006