

VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO
BIOMEDICINOS MOKSLŲ INSTITUTO
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS, MIKROBIOLOGIJOS IR LABORATORINĖS MEDICINOS
KATEDRA

MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

**LABORATORINIŲ TYRIMŲ KOKYBĖS GERINIMAS DIEGIANT SU IFCC
SUDERINTUS ALANINAMINOTRANSFERAZĖS,
ASPARTATAMINOTRANSFERAZĖS, FERITINO IR KREATININO METODUS**

Magistrantė **ROLANDA STEPONAITYTĖ**

(parašas)

Darbo vadovas

asist. dr. Valdas Banyš

(parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos

ir laboratorinės medicinos katedros vedėja

doc. dr. D. Karčiauskaitė

leidžiama ginti

(parašas)

Darbo įteikimo data _____

Registracijos Nr. _____

Vilnius, 2019

TURINYS

SANTRAUKA.....	4
SUMMARY.....	5
SANTRUMPOS.....	6
1. ĮVADAS	8
2. LITERATŪROS APŽVALGA.....	10
2.1 Serumo aminotransferazės	10
2.1.1 Aspartataminotransferazė	11
2.1.2 Alaninaminotransferazė	12
2.1.3 Piridoksolio 5'-fosfatas ir jo reikšmė aminotransferazių tyrime	16
2.1.4 Naudojami tyrimo metodai	18
2.2 Feritinas	19
2.2.1 Feritino dalyvavimas uždegiminiame procese.....	20
2.2.2 Feritinas kaip geležies transportavimo baltymas	22
2.2.3 Geležis	23
2.2.4 Feritino nustatymui taikomi metodai.....	24
2.3 Kreatininas	28
2.3.1 Glomerulų filtracijos greitis.....	30
2.3.2 Kreatinino nustatymo metodai.....	31
2.4 Metodų verifikavimas	35
3. TYRIMO METODAI IR APIMTIS	39
3.1 ALT nustatymo metodai	39
3.2 AST nustatymo metodai	40
3.3 Feritino nustatymo metodai	41
3.4 Kreatinino nustatymo metodai.....	43
4. TYRIMO REZULTATAI.....	45
4.1 Alaninaminotransferazės tyrimo rezultatai	45
4.2 Aspartataminotransferazės tyrimo rezultatai.....	49
4.3 Feritino tyrimo rezultatai.....	53
4.4 Kreatinino tyrimo rezultatai	58
4.5 Rezultatų neigiamumo įvertinimas.....	63
5. REZULTATŲ APTARIMAS.....	73

5.1	Alaninaminotransferazė	73
5.2	Aspartataminotransferazė.....	74
5.3	Feritinas.....	75
5.4	Kreatininas	77
6.	IŠVADOS	79
7.	REKOMENDACIJOS	80
8.	LITERATŪROS SAŽAŠAS	81

SANTRAUKA

Laboratorinių tyrimų kokybės gerinimas diegiant su IFCC suderintus alaninaminotransferazės, aspartataminotransferazės, feritino ir kreatinino metodus

Tyrimas atliktas 2018-2019 metais Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Laboratorinės medicinos centro Biochemijos laboratorijoje. **Darbo apimtis** – 88 puslapiai, jame yra 16 lentelių, 40 paveikslų ir 114 literatūros šaltinių.

Tyrimo tikslas – laboratorijos kokybės gerinimo tikslais įdiegti naujus su IFCC suderintus alaninaminotransferazės, aspartataminotransferazės, feritino ir kreatinino metodus bei įvertinti jų funkcionalumo charakteristikas.

Tyrimo metodika. 116 ALT ir 118 AST mėginių tirti be P5P ir su P5P metodais. 42 feritino mėginiai tirti turbidimetriniu ir mikrodalelių chemiliuminescencinės imunoanalizės metodais. 121 kreatinino mėginys tirtas modifikuotu Jaffe ir fermentiniu metodais, apskaičiuotas glomerulų filtracijos greitis. Metodų palyginimas ir poslinkio įvertinimas atlikti su pacientų mėginiais pagal CLSI rekomendacijas.

Svarbiausi rezultatai ir išvados. ALT rezultatų poslinkis tarp metodų buvo -27,5 proc., ALT metodo su P5P neglaudumo analizės duomenys atitinka žinomas biologinės variacijos modelio charakteristikas pagal Westgard duomenų bazę. AST rezultatų poslinkis tarp metodų buvo 24 proc., ALT metodo su P5P neglaudumo analizės duomenys atitinka žinomas biologinės variacijos modelio charakteristikas pagal Westgard duomenų bazę. Feritino rezultatų poslinkis tarp metodų buvo 14,8 proc., CMIA metodo neglaudumo analize nustatyta, kad metodo charakteristikos atitinka gamintojo deklaruojamas charakteristikas. Kreatinino rezultatų poslinkis tarp metodų buvo 8,1 proc., fermentinio metodo neglaudumo analize nustatyta, kad metodas charakteristikos atitinka gamintojo deklaruojamas charakteristikas. Naujai įdiegti ALT, AST, feritino ir kreatinino metodai yra tinkami naudoti rutininėje laboratorijos praktikoje.

Raktažodžiai: alaninaminotransferazė, aspartataminotransferazė, feritinas, kreatininas, kokybė, IFCC, piridoksolio 5'-fosfatas, turbidimetrija, CMIA, Jaffe, fermentinis metodas, CLSI

SUMMARY

Improving the Quality of Laboratory Tests by Implementing IFCC Compatible Methods for Alanine Aminotransferase, Aspartate Aminotransferase, Ferritin and Creatinine

The study was conducted in the year 2018–2019 at Biochemistry Laboratory, Center of Laboratory medicine, Vilnius University Hospital Santaros klinikos. **The volume of the paper** is 88 pages, it contains 16 tables, 40 images and 114 references were used.

Research objective: to implement new IFCC compatible alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, ferritin and creatinine methods for laboratory quality improvement and estimate their performance characteristics.

Research methods. 116 ALT and 118 AST samples were tested without P5P and with P5P methods. 42 ferritin samples were tested by turbidimetric and microparticle chemiluminescent immunoassay methods. 121 creatinine samples were tested by modified Jaffe and enzymatic methods, the glomerular filtration rate was calculated. The method comparison and bias estimation using patient samples according to CLSI guidelines were performed.

Results and conclusions. The bias of ALT results between methods was -27,5%, the data of the ALT method with P5P imprecision analysis correspond to the known characteristics of the biological variation model according to the Westgard database. The bias of AST results between methods was -24%, the data of the AST method with P5P imprecision analysis correspond to the known characteristics of the biological variation model according to the Westgard database. The bias of ferritin results between methods was 14,8%, the CMIA method imprecision analysis established that the characteristics of the method correspond to the characteristics declared by the manufacturer. The bias of creatinine results between methods was 8,1%, the enzymatic method imprecision analysis established that the characteristics of the method correspond to the characteristics declared by the manufacturer. The newly implemented ALT, AST, ferritin and creatinine methods are suitable for use in the routine laboratory practice.

Key words: alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, ferritin, creatinine, quality, IFCC, pyridoxal 5'-phosphate, turbidimetry, CMIA, Jaffe, enzymatic method, CLSI

SANTRUMPOS

ALT – alaninaminotransferazė

AST – aspartataminotransferazė

P5P – piridoksolio 5'-fosfatas

CMIA – chemiluminescencinė mikrodalelių imunoanalizė

IFCC – Tarptautinė klinikinės chemijos ir laboratorinės medicinos federacija

CLSI (angl. *Clinical and Laboratory Standards Institute*) – Klinikinių ir laboratorijų standartų institutas

LDH – laktatdehidrogenazė

PMP – piridoksamino 5'-fosfatas

HBV – hepatito B virusas

NADH – redukuotas nikotinamido adenino dinukleotidas

NO – azoto monoksidas

PSO (angl. *WHO*) – Pasaulio sveikatos organizacija

Ak – antikūnai

Ag - antigenai

sCr – serumo kreatininas

HbF – vaisiaus hemoglobinas

GFR – glomerulų filtracijos greitis

eGFR – apskaičiuotas glomerulų filtracijos greitis

HPLC – didelio našumo skysčių chromatografija

IDMS – izotopų praskiedimo masių spektrometrija

H₂O₂ – vandenilio peroksidas

NADPH – redukuotas nikotinamido adenino dinukleotido fosfatas

GCMS – dujų chromatografija masių spektrometrija

GC – dujų chromatografija

LCMS – skysčių chromatografija masių spektrometrija

SD – standartinis nuokrypis

CV – variacijos koeficientas

NAD⁺ – oksiduotas nikotinamido adenino dinukleotidas

MDH – malato dehidrogenazė

IgG – imunoglobulinas G

CKD-EPI – lėtinių inkstų ligų epidemiologinio bendradarbiavimo lygtis

FER – feritinas

CR – kreatininas

1. ĮVADAS

Laboratorinė diagnostika yra sparčiai auganti sritis, kuri reikšmingai lemia klinikinių sprendimų priėmimą, prisideda prie daugumos pacientų sveikatos sutrikimų prevencijos, diagnozės bei terapinės stebėsenos, todėl laboratorinių tyrimų kokybė ir saugumas yra būtini norint užtikrinti kokybišką ir saugią sveikatos priežiūrą. Siekiant pagerinti laboratorinių tyrimų kokybę yra diegiami tarptautinių standartizacijos programų patvirtinti metodai.

Matavimo metodai ir instrumentai, naudojami laboratorinėje medicinoje, ypač klinikinės chemijos laboratorijose, daugiausiai gaminami didelių tarptautinių kompanijų. Šios įmonės yra atsakingos už šių metodų patvirtinimą specifiniams diagnostikos ar stebėsenos tikslams [1], tačiau laboratorijos yra atsakingos už patikrinimą, ar metodo validavimo metu gautos charakteristikos gali būti atkartotos praktinėje klinikinėje situacijoje. Praktikoje metodo įsisavinimas paprastai apsiriboja metodų eksperimentų palyginimu, siekiant nustatyti netikslumą ir poslinkį, vykdomi pakartojimo eksperimentai siekiant nustatyti neglaudumą [2].

Tyrimo metodas gali turėti reikšmingos įtakos gautiems tiriamų analičių rezultatams, todėl siekiant kokybiškų ir tikslesnių rezultatų Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Laboratorinės medicinos centro Biochemijos laboratorijoje buvo diegiami nauji alaninaminotransferazės, aspartataminotransferazės, feritino ir kreatinino metodai, kurie yra suderinti su Tarptautine klinikinės chemijos ir laboratorinės medicinos federacija (IFCC). Magistro baigiamojo darbo tyrimas buvo atliekamas vadovaujantis ISO 15189 „Medicinos laboratorijos. Ypatingieji kokybės ir kompetencijos reikalavimai“ standartu, siekiant išsiaiškinti, ar naujai diegiami metodai yra priimtini taikymui.

Darbo tikslas: laboratorijos kokybės gerinimo tikslais įdiegti naujus su IFCC suderintus alaninaminotransferazės, aspartataminotransferazės, feritino ir kreatinino metodus bei įvertinti jų funkcionalumo charakteristikas.

Darbo tikslui įgyvendinti iškelti šie uždaviniai:

1. Įvertinti, ar naujai diegiamas ALT matavimo metodas su piridoksolio 5'-fosfatu atitinka keliamus kokybės reikalavimus ir yra tinkamas taikyti rutininėje laboratorijos praktikoje;

2. Įvertinti, ar naujai diegiamas AST matavimo metodas su piridoksolio 5'-fosfatu atitinka keliamus kokybės reikalavimus ir yra tinkamas taikyti rutininėje laboratorijos praktikoje;
3. Įvertinti, ar naujai diegiamas chemiluminescencinės mikrodalelių imunoanalizės metodas feritino nustatymui atitinka kokybės reikalavimus ir yra tinkamas taikyti rutininėje laboratorijos praktikoje;
4. Įvertinti, ar naujai diegiamas fermentinis metodas kreatinino nustatymui atitinka kokybės reikalavimus ir yra tinkamas taikyti rutininėje laboratorijos praktikoje.

2. LITERATŪROS APŽVALGA

2.1 Serumo aminotransferazės

Aspartataminotransferazė (AST) ir alaninaminotransferazė (ALT) yra fermentai, daugiausia randami kepenyse, bet jų galima rasti ir raumenų audiniuose, širdies ląstelėse, raudonuosiuose kraujo kūneliuose ir kituose organuose, pavyzdžiui, kasoje ir inkstuose. Nors šie fermentai nėra specifiniai rodikliai esant kepenų ligai, jie gali būti naudojami kartu su kitais fermentais, kad būtų galima stebėti įvairių kepenų sutrikimų eigą. Normalus AST ir ALT aktyvumas kraujyje yra nuo 5 iki 40 U/L. Šios vertės buvo pagrįstos populiacijų tyrimais, tačiau yra pasirodę teiginių ne tik apie ALT viršutinės ribos verčių sumažinimą, bet ir apie verčių skirtumus tarp lyčių. Kai audinys ar organas, pavyzdžiui, kepenys ar širdis, yra pažeidžiami, į kraujotaką patenka papildomi AST ir ALT kiekiai, todėl fermento koncentracija padidėja. Dėl šios priežasties AST ir ALT kiekis kraujyje yra tiesiogiai susijęs su audinių pažeidimo mastu. Po sunkių pažeidimų AST aktyvumas pakyla nuo 10 iki 20 kartų ir yra didesnė už normalią, tuo tarpu ALT aktyvumas gali siekti aukštesnį lygį (iki 50 kartų didesnė nei įprastai) [3].

Remiantis AST ir ALT aktyvumo matavimu galima diagnozuoti daugumą kepenų ligų. Klinikinėse laboratorijose AST ir ALT aktyvumas serume paprastai nustatomas fermentiniu tyrimu, kuriame transamininimo reakcija yra susieta su antrine reakcija, kuri mažina piruvatą į laktatą per laktatdehidrogenazę (LDH) [4]. Tačiau fermentinis metodas neparodo kepenų fibrozės būklės. Tai gali sąlygoti klaidingą diagnozę pacientams, sergantiems lėtinėmis kepenų ligomis, pavyzdžiui, suriebėjusių kepenų liga, ciroze ir hepatoceliuline karcinoma [5]. Tikslaus diagnostinio metodo sukūrimas yra labai svarbus ankstyvam kepenų ligos nustatymui ir tinkamam gydymui, nes pacientai dažnai yra asimptomi, kol jų kepenų būklė nėra labai pablogėjusi [6].

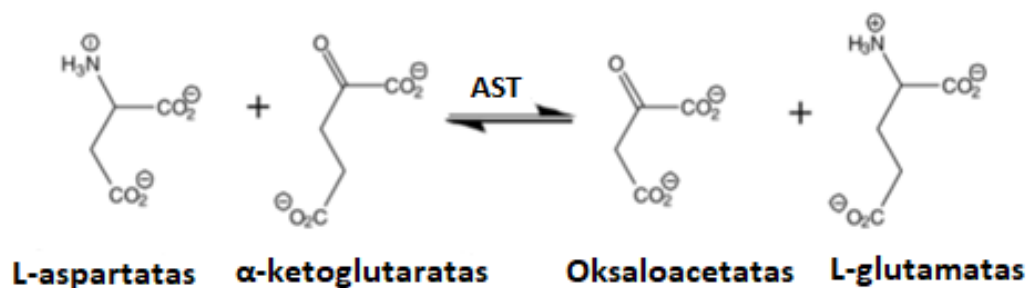
Esant daugeliui kepenų ligų serumo alaninaminotransferazės fermentinis aktyvumas yra didesnis nei aspartataminotransferazės, kadangi ALT patekimui į cirkuliaciją pakanka mažesnio kepenų pažeidimo. AST ir ALT santykis (AST / ALT) kartais gali padėti nustatyti, ar kepenys ar kitas organas buvo pažeisti. Šių fermentų aktyvumo santykis – tai de Ritis koeficientas. Normaliai jis lygus $1,33 \pm 0,42$. Santykiui esant < 1 būdingas vidutinis kepenų pažeidimo laipsnis, jei santykis > 1 ar dar blogiau, > 2 , tai rodo sunkų kepenų pažeidimą, dažnai su nekroze.

Daugeliu kepenų pažeidimo atvejų AST / ALT santykis yra ≤ 1 dėl ilgesnio ALT pusinės eliminacijos periodo. Tačiau hemolizinės anemijos, miokardo infarkto, skeleto raumenų pažeidimo, cirozės, lėtinio alkoholizmo ir makro-AST buvimo atvejais AST aktyvumas gali būti daugiau kaip 3 kartus didesnis už viršutinę pamatinių biologinių verčių ribą, kai ALT yra pamatinių biologinių verčių intervalo ribose. Tai gali būti nustatoma dėl daug didesnių AST aktyvumų, kurias išskiria kai kurios ląstelės, pavyzdžiui, raudonieji kraujo kūneliai, arba išsiskiriant fermentiškai neaktyviam ALT, lėtinio alkoholizmo ar cirozės atveju [4].

Ankstyvieji tyrimai parodė, kad didelis AST / ALT santykis gali būti naudojamas kaip biologinis žymuo uždegimo diagnozei [7]. Šiuo metu gydytojai naudoja AST / ALT santykį specifinėms kepenų ligoms diagnozuoti. Wong ir kiti [8] teigė, kad kombinuotasis AST ir trombocitų santykio indekso (APRI) ir AST / ALT algoritmas galėtų pagerinti tikslumą prognozuojant pažengusią kepenų fibrozę, todėl diagnozuojant kepenų ligą gali būti naudingi ALT ir AST fermentiniai matavimai pagal uždegimo laipsnį.

2.1.1 Aspartataminotransferazė

Aspartataminotransferazė arba glutamatoksaloacetattransaminazė (GOT) katalizuoja L-aspartato ir α -ketoglutarato reakciją pernešant amino grupes, kur grįžtamosios reakcijos metu susidaro L-glutamatas ir oksaloacetatas (1 pav.).



1 pav. AST katalizuojama reakcija [9]

Grįžtamoji transformacija vykdoma dviem pusinėmis reakcijomis, kurios pavaizduotos 2 pav. Pirmojoje piridoksaliao 5'-fosfatas (P5P) reaguoja su L-aspartatu, kad suformuotų laisvą piridoksamino 5'-fosfatą (PMP) ir oksalacetatą. Atvirkštinė pusinė reakcija su α -ketoglutaratu

atkuria P5P fermentą ir gaunamas aminorūgštis produktas L-glutamatas. P5P reakcijoje dalyvauja kaip katalizinis kofaktorius.



2 pav. AST katalizuota reakcija pasiekama dvigubo poslinkio kataliziniame cikle [9]

AST pusinės eliminacijos laikas yra 17 ± 10 valandos. Moksliniams tyrimams dažniausiai naudojama rekombinantinė kiaulių citozolinė AST, išgauta iš širdies.

Didžiausias aspartataminotransferazės aktyvumas nustatomas širdies ir griaučių raumenyse, kepenyse, eritrocituose, mažas aktyvumas – odoje, inkstuose ir kasoje. Egzistuoja dvi AST formos – mitochondrinė ir citoplazminė, mitochondrijoms tenka 70 proc. AST aktyvumo, o citoplazmai – 30 proc. Dėl šios priežasties ląstelė turi būti labai pažeista, kad AST patektų į tarpląstelinę erdvę.

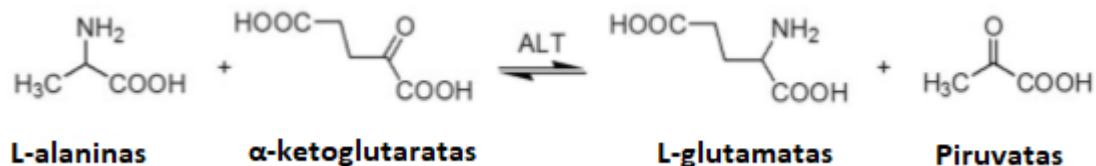
AST aktyvumas 5 ir daugiau kartų gali padidėti esant virusiniam hepatitui, miokardo infarktui, ūmiam pankreatitui ar šokui. 3–5 kartus padidėjęs aktyvumas nustatomas dėl lėtinio hepatito, nekrozės, raumenų distrofijos, traumos ar vaistų sukulto kepenų pažeidimo.

Nustatyta, kad makro-AST buvimas yra įtariamas asimptomiams pacientams, esant pastoviam ir nepaaiškinamam AST padidėjimui. Makrofermentų kompleksas suformuojamas, kai imunoglobulinai (Ig) prisijungia prie cirkuliuojančių fermentų arba kai fermentai savaime susijungia ir suformuoja didelius kompleksus. Tai pristabdo pašalinimą iš cirkuliacijos, todėl nustatomi gerybiniai fermentų aktyvumo padidėjimai. Makro-AST buvimą galima įvertinti matuojant polietilenglikoliu (PEG) nusodinto AST aktyvumo kiekį [10].

2.1.2 Alaninaminotransferazė

Alaninaminotransferazė arba glutamatpiruvattransaminazė (GPT) yra aminotransferazė, kuri katalizuoja amino grupių perkėlimą iš L-alanino į α -ketoglutaratą, o gauti produktai yra L-glutamatas ir piruvatas. ALT yra fermentas, kuris daugiausia yra agreguotas hepatocitų citozolyje.

ALT sudaro 496 aminorūgštys, jos pusinės eliminacijos laikas yra 47 ± 10 valandos. Šis fermentas koduojamas ALT geno, kuris yra 8 chromosomos ilgajame petyje [11]. ALT ląstelių daugiausia yra citoplazmoje, todėl pažeidus ląstelę šis fermentas greitai patenka į tarpląstelinę erdvę ir jo aktyvumas kraujo plazmoje padidėja. ALT dalyvauja daugelyje ląstelių procesų, įskaitant glikolizę, gliukoneogenezę, aminorūgščių apykaitą [12].



3 pav. Transaminimo reakcija, katalizuojama alaninaminotransferazės [13]

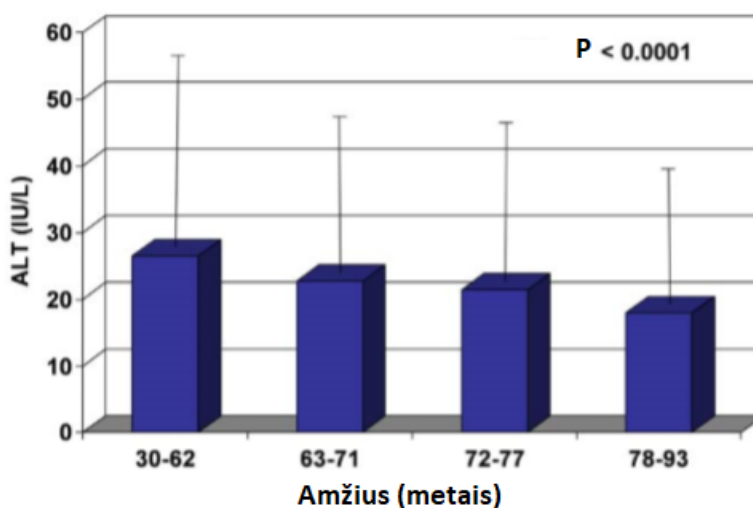
ALT randama inkstuose, širdies ir griaučių raumenyse, kasoje, blužnyje, riebaliniame audinyje, žarnyne, prostatoje ir smegenyse, tačiau ALT aktyvumas šiuose organuose yra daug mažesnė nei kepenyse [6]. ALT aktyvumas kepenų ląstelėse yra maždaug 3000 kartų didesnis už ALT aktyvumą serume. Eritrocituose ALT aktyvumas yra 6 kartus didesnis, lyginant su aktyvumu serume.

Šiuo metu ALT matavimas yra ne tik plačiai naudojamas nustatant kepenų ligų, turinčių akivaizdžių klinikinių simptomų, paplitimą, vystymąsi ir prognozę, bet ir nurodo bendrą sveikatos būklę [6]. Kepenų ląstelių pažeidimas pasireiškia padidėjusiu alaninaminotransferazės aktyvumu serume prieš atsirandant klinikiniams simptomams ir požymiams, pavyzdžiui, gelta ar esant begeltei hepatito formai. ALT aktyvumas iki 20 kartų gali padidėti esant bet kokios kilmės hepatocitų pažeidimui ar jų nekrozei. Šio fermento aktyvumas taip pat nežymiai gali padidėti esant griaučių raumenų traumoms, miokardo infarktui, pankreatitui ar hemolizinei anemijai. ALT aktyvumą taip pat gali padidinti hepatotoksiniai ar cholestazę sukiantys preparatai, tokie, kaip nikotino rūgštis, barbitūratai, penicilinas ar aspirinas.

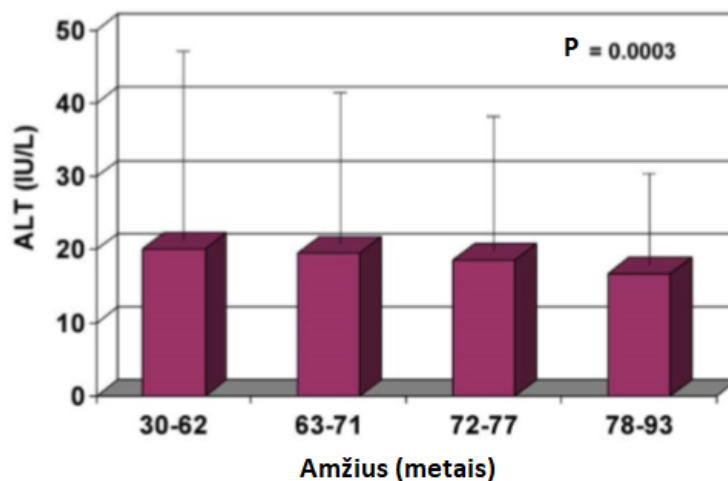
Virusinė hepatito infekcija yra pagrindinė arba antrinė priežastis, dėl kurios padidėja ALT aktyvumas. Liaw ir kiti [14] aprašė ALT aktyvumo svyravimus hepatito B viruso (HBV) infekcijos metu. ALT aktyvumas yra labai svarbus gydymo atrankos ir HBV infekuotų pacientų prognozės vertinimo rodiklis. Nepaisant to, egzistuoja ir įvairūs prieštaravimai. Lai ir kiti [15]

pranešė apie reikšmingą fibrozę ir uždegimą 37 proc. pacientų, užsikrėtusių HBV, esant normaliam ALT lygiui.

Kai kurie demografiniai veiksniai, tokie, kaip lytis ar amžius, gali keisti ALT lygius bendroje populiacijoje [16,17]. ALT aktyvumas vyrų mėginiuose nustatomas didesnis nei moterų. Kai kurie mokslininkai ALT lygių skirtumus lyties pagrindu priskiria vyrų ir moterų hormoniniams skirtumams [16]. Kitame tyrime, kuriame buvo siekiama įvertinti amžiaus įtaką ALT aktyvumo svyravimams, nustatyta, kad su amžiumi ALT aktyvumas mažėja. Šie pokyčiai grafiškai pavaizduoti 4 pav. ir 5 pav.



4 pav. Amžiaus poveikis ALT aktyvumui vyrų populiacijoje [17]



5 pav. Amžiaus poveikis ALT aktyvumui moterų populiacijoje [17]

Be to, dėl kepenų vaidmens reguliuojant sisteminį metabolizmą ir apsaugant organizmą nuo cirkuliuojančių endogeninių ir egzogeninių toksinų, bet koks su amžiumi susijęs kepenų funkcijos pokytis turi įtakos su amžiumi susijusioms būklėms ir ligoms, todėl mažas cirkuliuojančios ALT aktyvumas gali atspindėti kepenų senėjimą [18].

Taip pat nustatyta, kad kai kurių fiziologinių veiksnių poveikis yra susijęs su ALT aktyvumu serume. Ekstremalus fizinis krūvis gali sukelti trumpalaikį, grįžtamąjį ALT padidėjimą. Daugelis autorių alaninaminotransferazės padidėjimą po fizinio krūvio priskiria raumenų pažeidimo rodikliui [19,20].

Pernelyg didelis alkoholio vartojimas yra dar viena priežastis, dėl kurios ALT aktyvumas padidėja. Alkoholio vartojimas dideliais kiekiais yra antra, po hepatito C viruso infekcijos, priežastis, kodėl padidėja alaninaminotransferazės koncentracija [21]. Tačiau alkoholio įtaka ALT aktyvumui priklauso nuo vartojimo dozės ir laiko. Lengvas ir trumpalaikis alkoholio vartojimas neįrodo reikšmingo ALT padidėjimo suaugusiems [22]. Tačiau įdomu tai, kad kavos vartojimas gali būti kaip apsauginis veiksnys prieš ALT pakilimą. Lee ir kiti [23] kofeino apsauginį poveikį priskiria jo antioksidaciniam aktyvumui.

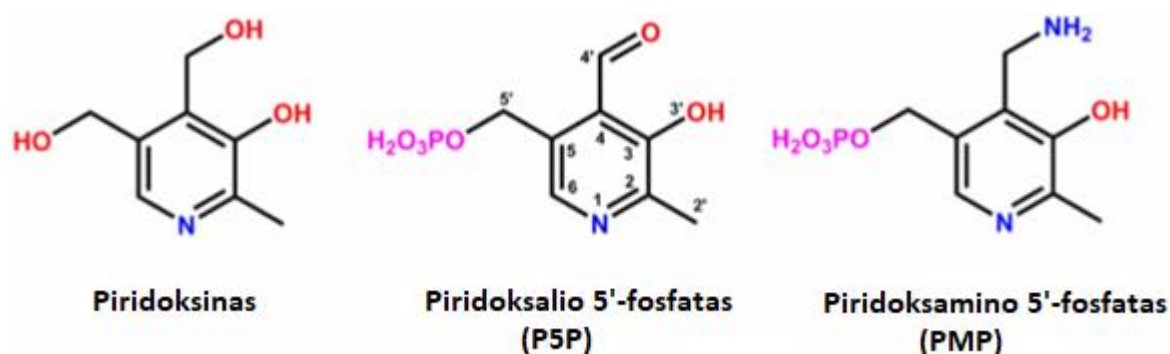
Net laboratorinis metodas ir paros svyravimai gali turėti įtakos ALT lygiams. Córdoba ir kiti [24] stebėjo ALT aktyvumo cirkadinį pokytį pacientų, sergančių lėtinėmis kepenų ligomis, ir nustatė, kad mažiausia reikšmė nustatoma 4 val. ryto, o didžiausia – 16 val. popiet.

Trumpai apžvelgus galimus veiksnius, kurie lemia ALT aktyvumą, kyla klausimas, kokių atitinkamų priemonių reikia imtis gydytojui, kai jis susiduria su pacientais, kuriems nustatomi ALT pakitimai? Buvo sukurta srauto diagrama, skirta padėti gydytojams gydyti suaugusiuosius, turinčius padidėjusį ALT aktyvumą. Kai ALT lygis sumažėja iki itin žemo, ypač vyresnio amžiaus žmonėms dėl pagreitėjusių senėjimo ir organizmo silpnėjimo procesų, po kurių sumažėja kepenų dydis ir susilpnėja kepenų kraujotaka, siūloma atlikti ultragarsinius ir kompiuterinės tomografijos (KT) tyrimus, kad būtų galima vizualiai įvertinti kepenų metabolinę funkciją. Kai ALT lygis yra padidėjęs ir viršija normalią pamatinę vertę, reikėtų tirti dažniausiai pasitaikančias ALT pakilimo priežastis, įskaitant virusinį hepatitą, piktnaudžiavimą alkoholiu, ilgalaikį vaistų vartojimą, metabolinio sindromo komponentus ir kitus kepenų funkcinius rodiklius. Mažiau paplitusios ALT padidėjimo priežastys, įskaitant hemochromatozę, autoimuninį hepatitą,

celiakiją ir raumenų sužalojimą, turėtų būti nustatytos tada, kai pirmiau nurodyti patikrinimo rezultatai yra neigiami [13].

2.1.3 Piridoksolio 5'-fosfatas ir jo reikšmė aminotransferazių tyrime

Piridoksolio 5'-fosfatas (P5P) – biologiškai aktyvus chromoforinis kofaktorius, gautas iš piridoksino, yra vienas labiausiai paplitusių gamtoje randamų kofaktorių, katalizuojančių apie 140 skirtingų tipų biocheminių transformacijų [9].



8 pav. **Vitamino B₆ grupė** [9]

Piridoksinas – labiausiai paplitusi vitamino B₆ forma ir vartojamas kaip maisto papildas. Piridoksolio 5'-fosfatas yra dažniausiai aptinkama forma vykstant metabolizmui, o piridoksamino 5'-fosfatas yra privalomas tarpinis produktas aminotransferazių dvigubo poslinkio reakcijoje [9]. Dabar gerai žinoma, kad piridoksolio 5'-fosfatas padidina katalizinę apoaminotransferazių aktyvumą. Šio kofermento dalyvavimas AST reakcijoje buvo pasiūlytas Kritzmano jau 1939 m. [25]. ALT ir AST reikalingas P5P kofaktorius (aktyvuotas vitaminas B₆), kad būtų pasiektas visiškas fermentinis aktyvumas.

Tyrimai, kuriuose buvo stebimas P5P panaudojimas *in vitro*, parodė, kad serumo aminotransferazės yra nepilnai prisotintos P5P. Šis skirtumas ypač išryškėja tiriant skirtingų šaltinių AST (kepenų lyginant su širdies; citoplazminę lyginant su mitochondrine). Į kraują atsipalaidavusios aminotransferazės susideda iš visiškai aktyvių formų, prisotintų P5P (holofermentų) ir neaktyvių formų be susieto P5P kofaktoriaus (apofermentų) [26]. Piridoksolio

5'-fosfatas pridedamas į reagento mišinį, siekiant užtikrinti apofermento prisotinimą šiuo kofermentu. Piridoksolio 5'-fosfato išskyrimas ir rekombinacija su alaninaminotransferazės apofermentu skiriasi nuo aspartataminotransferazės. Pašalinus piridoksolio 5'-fosfatą alaninaminotransferazė yra nestabili, priešingai nei aspartataminotransferazė, kuri išlieka gana stabili. Tačiau sunku atskirti piridoksolio 5'-fosfatą nuo fermento, pavyzdžiui, dializės būdu, nes surišimas yra stiprus [27]. Ši priklausomybė nuo P5P siekiant maksimalaus aktyvumo yra didesnė ALT, palyginus su AST, dėl to, kad žmogaus kraujo serume yra santykinai didesnis ALT apo- ir holofermentų santykis [26].

Tyrimai, kurių metu yra pridedama P5P, konvertuoja apofermentą serume į fermentiškai aktyvią formą, maksimaliai padidindami baltymo aptikimą, o tyrimai be P5P matuoja tik holofermento frakciją. Tyrimai be P5P reagento lemia neapibrėžtą apofermentą, todėl gali nepakankamai įvertinti aminotransferazės baltymų kiekį. Tarptautinė klinikinės chemijos ir laboratorinės medicinos federacija (IFCC) rekomenduoja įtraukti P5P į jų referentines procedūras, skirtas optimaliam ALT ir AST matavimui. Matuojant fermentų aktyvumą esant P5P pertekliui yra pašalinami trukdantys kintamieji [28]. Tačiau 2013 m. Amerikos patologų kolegijos atliktame tyrime nustatyta, kad maždaug 50 proc. apklausoje dalyvavusių laboratorijų buvo nesuderinamos su IFCC etaloninėmis procedūromis, susijusiomis su reakcijos mišinio sudėtimi (pridėjus P5P) ALT ir AST aktyvumui matuoti. Skirtumai buvo pastebėti ir tarp gamintojų: tik apie 5 proc. Roche analizatorių naudotojų atliko tyrimus su P5P papildomu kiekiu, tačiau didžioji dalis „Siemens“ gamintojo analizatorių naudotojų šį tyrimą atlikinėjo su P5P papildomu kiekiu.

Mills ir kiti [10] atliko tyrimą, kuriame buvo remiamasi dviem būdais norint patvirtinti, kad pacientų tyrimų rezultatų neatitikimai buvo gauti dėl P5P papildymo skirtumų. Pirmiausia, AST ir ALT buvo išmatuoti naudojant „Beckman AU5432“ analizatorių, kuris nėra papildytas P5P, su ir be egzogeninio P5P. Egzogeninis P5P padidino AST aktyvumą nuo 11 iki 186 U/L (1690 proc. padidėjimas). ATL aktyvumas padidėjo nežymiai, nuo 25 iki 300 U/L (20 proc. padidėjimas). Antrasis būdas – įvertinti pacientų vitamino B₆ būklę, naudojant skysčių chromatografiją-tandeminę masių spektrometriją (LC-MS/MS), norint apskaičiuoti du vitamino B₆ vitameras: P5P (4 µg/L; pamatinių biologinių verčių intervalas (RI) 5-50µg/L) ir piridoksino rūgštį (<2µg/L; RI 3-30µg/L). Šie rezultatai patvirtina, kad pacientų AST rezultatai buvo neįprastai maži, tyrimą atliekant be P5P papildymo ir esant vitamino B₆ deficitui.

Sąlygos, kurios, kaip žinoma, daro poveikį piridoksino kiekiui organizme, yra mitybos nepakankamumas, susilpnėjusi absorbcija, įgimti metabolizmo sutrikimai ir ilgalaikė hemodializė. Atliekant toksiškumo tyrimus nustatyta, jog ilgalaikė anoreksija, toksiškumas virškinimo trakte ir ksenobiotikai gali sukelti piridoksino trūkumą [29].

Be to, yra daug veiksnių, darančių įtaką kofermento susijungimui su abiem apofermentais. Tarp šių veiksnių yra buferinė sistema, pirminio inkubavimo trukmė, kofermento koncentracija ir temperatūra. Tiriant temperatūrą konvertuojančią faktorius fermentams, sužinota apie skirtumus tarp AST ir ALT temperatūros santykio, nustatyto nesant arba esant piridoksaliao 5'-fosfatui. Jung ir kiti [30,31] nustatė piridoksaliao 5'-fosfato įtaką AST ir ALT temperatūros santykiams. 25°C temperatūroje pastebėtas mažesnis katalizinio aktyvumo padidėjimas nei esant 45 °C, kai reakcija buvo vykdoma dalyvaujant piridoksaliao 5'-fosfatui.

2.1.4 Naudojami tyrimo metodai

Automatizuoti cheminiai analizatoriai, naudojantys spektrofotometrinius metodus, įvertina šių fermentų aktyvumą. Kolorimetrinė analizė buvo palaiptai pakeista spektrofotometriniu analize nuo 1950 m. dėl jos ribotumo. Tuo tarpu spektrofotometriniai matavimai turi akivaizdžių privalumų, pavyzdžiui, nepertraukiamas tyrimas ir platus matavimo diapazonas [32]. Yagi ir kiti [32] pristatė fermentinį AST tyrimą. Jie nustatė α -oksooglutaratą, susidarantį transamininimo tarp L-glutamato ir oksalacetato sistemoje, susietoje su hidroksiglutarato dehidrogenaze ir nikotinamido adenino dinukleotidu (NADH), po absorbcijos sumažėjimo esant 340 nm bangos ilgiui. Šis metodas leido tiksliai nustatyti pradinį reakcijos greitį, kuris buvo proporcingas fermento koncentracijai. Phillip ir Graham [34] stebėjo spektrofotetrinį AST aktyvumą, matuodami NADH oksidaciją esant 340 nm bangos ilgiui. Tačiau spektrofotetrinė analizė nesuteikia patikimų rezultatų, kai serumas yra lipeminis arba ikterinis, arba yra hemolizės produktų, kurie yra dažni klinikiniuose mėginiuose [35]. Aminotransferazėms reikalingi visi analizės aspektai tinkamose sąlygose, kad baltymai veiktų optimaliu lygiu. AST ir ALT matuojamas 340 / 410 nm bangos ilgyje.

Komerciniai pardavėjai skiriasi tuo, ar jie siūlo P5P papildytus ar nepapildytus reagentus AST ir ALT matavimams. Piridoksaliao 5-fosfato kofaktorius reikalingas pilnam

aminotransferazių fermentiniam aktyvumui. Kadangi individualūs asmenys gali turėti skirtingą endogeninio P5P lygį, optimizuotuose aminotransferazių tyrimuose su automatiniu analizatoriumi į reagentą pridedama P5P, kad būtų išvengta šių serumo baltymų nepakankamumo. Aminotransferazių tyrimas nėra standartizuotas, o diagnostinės laboratorijos turi *a priori* galimybę pasirinkti, kaip atlikti aminotransferazių rutininius tyrimus – su P5P kofaktoriumi arba be jo [36].

IFCC rekomenduoja, kad laboratorijos papildytų AST ir ALT tyrimus P5P, taip užtikrinant, jog pacientų mėginiuose būtų matuojamas didžiausias galimas katalizinis aktyvumas. Reagentas papildomas kofermentu padidina ALT aktyvumą normaliame serume 20 proc., o AST aktyvumas padidėja net 50 proc. Pacientų serumo mėginiuose gali būti pastebimi didesni pokyčiai tarp P5P papildytų ir nepapildytų tyrimo rezultatų, kai piridoksolio 5'-fosfato kiekis yra mažas dėl vitamino B₆ trūkumo organizme [10].

2.2 Feritinas

Feritinas – baltymas, kurį 1937 m. identifikavo prancūzų mokslininkas Vil'én Laufberger, iš arklio blužnies išskyres naują baltymą, kuriame buvo iki 23 proc. sausosios geležies svorio [37]. Jis yra geležies saugojimo baltymas, kuris pasižymi gebėjimu kaupti ir saugoti iki 4500 geležies atomų. Tai daugiafunkcinis baltymas, kuris vaidina svarbų vaidmenį geležies saugojime ir metabolizme. Mažas kiekis yra susijęs su geležies trūkumu, o didelė koncentracija nustatoma esant hemosiderozei, hemochromatozei ir lėtiniais uždegiminiams sutrikimams [38]. Pamatinis biologinių verčių intervalas moterims yra 13 – 150 µg/l, o vyrams – 30 – 400 µg/l.

Feritinas pats savaime yra apvalkalo baltymas, kuris savo šerdyje sekvestruoja geležį. Apvalkalas susideda iš 24 subvienetų su skirtingu santykiu sunkiųjų (H) ir lengvųjų (L) grandinių feritinų, koduojamų atitinkamai FTH ir FTL genų, kurie yra 11 ir 19 chromosomose ilguosiuose pečiuose [39].

Svarbu tai, kad skirtingi subvienetai turi skirtingas funkcijas – H-feritinas turi feroksidazinį aktyvumą, kuris reikalingas oksiduoti divalentę geležį (Fe²⁺) į trivalentę (Fe³⁺), o L-feritinas turi rūgščių likučių ant baltymo paviršiaus ertmių, kurios palengvina feroksidazės veikimą ir yra labai svarbios trivalentės geležies formavimuisi visiškai suformuoto baltymo

šerdyje. Pirminė šių 24 aminorūgščių funkcija buvo apriboti ekstraląstelinės ir citozolinės geležies naudojimą ir saugoti šią geležį baltymo šerdyje, kad ląstelė galėtų ją panaudoti ateityje. Tai funkciškai apsaugo nuo kenksmingų reaktyviojo deguonies rūšių (ROS) susidarymo vykstant Fentono reakcijai. Daugelis pastarųjų dešimtmečių peržiūrų sutelkė dėmesį į įvairius normalios feritino biologinės funkcijos aspektus ir jos reguliavimą, susijusį su geležies homeostaze [40,41].

FTH / FTL santykis yra audiniui ir situacijai specifinis bei dinamiškai reguliuojamas. FTH padaugėja uždegimo metu. Nors šis procesas yra neišsamiai suprantamas, tai greičiausiai susiję su FTH / FTL diferencine veikla; abu tipai saugo geležį, bet FTL tai daro lengviau ir yra gausnis audiniuose, tokiuose, kaip kepenų ar blužnies. Jo sunkiosios grandinės dublikatas, daugiausia randamas širdyje ir inkstuose, padidino feroksidazės aktyvumą, konvertuodamas divalentę geležį į inertinę trivalentę geležies formą, sustabdydamas oksidacinį stresą. Nors FTL efektyviau saugo geležį, reikalingas bent vienas FTH subvienetas geležies įkrovimui į feritino apvaskalą, ir tikėtina, kad visi feritino multimerai turi dalį kiekvienos formos [39].

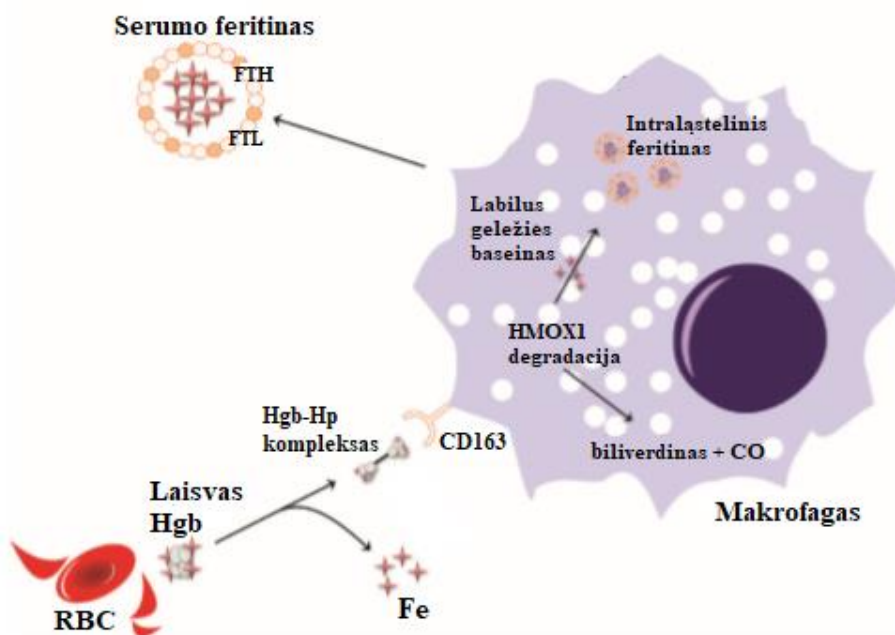
2.2.1 Feritino dalyvavimas uždegiminiame procese

Santykinei FTH ir FTL subvienetų santykių ekspresijai turi įtakos uždegiminė aplinka. Citokinai ir parakrininės signalinės molekulės, tokios kaip azoto monoksidas (NO), padidina santykinį FTH kiekį [42], todėl padidėjęs feritino kiekis serume klinikiškai jau seniai laikomas ūmios fazės uždegimo žymeniu. Padidėjęs feritino kiekis serume taip pat koreliuoja su padidėjusiu priešuždegiminiu citokinų lygiu [43].

Ląsteliniu lygmeniu makrofagai veikia kaip pagrindiniai geležies surinkėjai, fagocituodami pasenusius raudonuosius kraujo kūnelius [44]. Ši homeostazės funkcija yra ypač aktuali esant užsitęsusiam uždegimui, kai raudonųjų kraujo kūnelių pusinės eliminacijos laikas yra ribotas, o fragmentai yra gausni.

Kai žmogaus makrofagai yra veikiami laisvu hemoglobinu, jie perneša hemoglobino-haptoglobino (Hb-Hp) kompleksus per CD163 receptorių sukeltą vėlesnę endocitozę, taip sukeldami transkripcinį antioksidacinį atsaką, kuris padidina feritino kiekį [45]. 9 pav. vaizduojama, kaip makrofagai tiesiogiai fagocituoja pasenusius raudonuosius kraujo kūnelius (RBC), taip pat prisijungia Hb-Hp kompleksus per CD163 receptorių sukeltą endocitozę. Tai

leidžia makrofagui perdirbti geležį veikiant fermentui hemo oksigenazei 1 (HMOX1). Hemoglobinas yra suskaidomas į biliverdiną, anglies monoksidą (CO) ir laisvą geležį, esančią labiliame geležies baseine. Tuomet ši geležis gali būti įtraukta į intraląstelinį feritiną, neleidžiant susidaryti toksiškiems laisviems radikalams. Susidarius geležies ir feritino kompleksui, jis yra stabilus ir gali būti transportuojamas į plazmos cirkuliaciją arba būti saugomas [46].



9 pav. Feritino dalyvavimas RBC geležies homeostazėje [46]

Feritino sintezę reguliuoja įvairūs oksidantai ir antioksidantai, tokie, kaip glutationas, NO ir kitos reaktyvios deguonies rūšys. Šios homeostazės funkcijos sutrikimas yra siejamas su kraujagyslių ligų patologija, tokia kaip cukrinis diabetas [47] ar aterosklerozė [48].

Serumo feritinas yra gerai žinomas ūminio fazės baltymas, kurio kiekis atspindi ūminio ir lėtinio uždegimo laipsnį infekcinių, reumatologinių, hematologinių ir piktybinių ligų metu. Hiperferitinemija, nepaisant pagrindinės patologijos, susijusi su dideliu mirtingumu [49]. Kaip reikšmingos makrofagų aktyvacijos žymuo, žmonėms su hiperferitinemijos fenotipu, matyti retikuloendotelinės sistemos (RES) suaktyvėjimas ir daugelio organų disfunkcija [50]. Feritinas apsaugo organizmą aktyvios infekcijos metu, apribodamas geležies prieinamumą patogenams [46].

Nors feritinas tradiciškai apibūdinamas kaip citozolinis baltymas, jis taip pat aptinkamas mitochondrijose, augalų plastidėse, branduolyje, smegenų skystyje bei kaip ekstraląstelinis feritinas serume. Skirtingos feritino lokalizacijos rodo jo unikalią funkciją įvairiuose ląstelių tipuose. Pavyzdžiui, žinoma, kad branduolinis feritinas prisijungia prie DNR ir apsaugo ją nuo ultravioletinių (UV) spindulių sukeltos žalos [51], taip pat ir nuo geležies sukeltos žalos [52]. Feritino buvimas branduoliuose leido atlikti tyrimus, susijusius su feritino vaidmeniu vėžinėse ląstelėse, kurie atskleidė, kad feritino pašalinimas padidina vėžinių ląstelių jautrumą radiacijai ir chemoterapijai [53].

2.2.2 Feritinas kaip geležies transportavimo baltymas

Klinikoje feritino koncentracija interpretuojama kaip geležies atsargų organizme rodiklis. Geležies pristatymas visame kūne yra gyvybiškai svarbus procesas, kuris yra labai griežtai reguliuojamas. Geležies trūkumas gali sukelti daugelį įvairių ligų, tokių kaip anemija [54]. Panašiai geležies perteklius, vadinamas hemochromatoze, gali sukelti organų nepakankamumą arba reikšmingus uždegiminius sutrikimus [55]. Be to, geležies dishomeostazė smegenyse gali sukelti reikšmingą neurodegeneraciją [56]. Perteklinis organų ir ląstelių geležies kaupimas įvairiose ligų būklėse atsiranda dėl to, kad keičiasi geležies įsisavinimo reguliavimas. Manoma, kad pirminis geležies pernešimo mechanizmas siejamas su transferinu, kuris perneša geležį per transferino receptorius. Tačiau šis teiginys apie transferiną gali neatitikti ypatingo geležies poreikio vystymosi ir augimo metu. Transferinas paprastai perneša du geležies atomus, feritinas vienu metu gali pernešti daug didesnę geležies kiekį, taip užtikrinamas greitas augimas ir geležies panaudojimas [57].

Feritino prisotinimas geležimi yra labai svarbus, nes maždaug 90 proc. pacientų, kurių klinikoje pasireiškia hiperferitinemija, nėra geležies perkrovos [58]. Žinoma, kad serumo feritinas yra mažiau prisotintas geležimi lyginant su kepenų feritinu, tačiau geležis, esanti serumo feritine, yra santykinai didesnė negu transferino geležis. Cohen ir kiti [39] nustatė, kad kepenų feritino sudėtyje yra 2074 geležies atomai vienai molekulei feritino, tuo tarpu serumo feritinui tenka 689 geležies atomai vienai feritino molekulei.

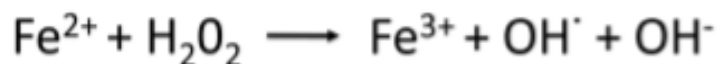
Kad feritinas taptų geležies tiekimo baltymu, jis turi būti išlaisvintas iš ląstelių. Įrodyta, kad feritino sekreciją atlieka daugelis ląstelių, tokių kaip makrofagai [55], hepatocitai ir Kupferio kepenų ląstelės [59]. Nors tikslus feritino sekrecijos mechanizmas vis dar nėra iki galo aiškus,

ekstraląstelinio feritino glikozilinimo nebuvimas rodo, kad sekrecija vyksta ne klasikiniu keliu. Cohen ir kiti [39] pademonstravo feritino sekreciją per lizosominį sekrecijos kelią, ląstelei specifinį tiesioginį kelią, kuris nėra pažeistų ląstelių produktas.

Svarbus feritino įsisavinimo aspektas yra tas, kad feritinas gali transportuoti nuo 100 iki 1000 kartų daugiau geležies nei transferinas, todėl netinkamas transportavimas ir proceso reguliavimas gali turėti ląstelę žalojančių pasekmių. Feritinas labai svarbus ląstelių variabilumui, kad būtų galima išlaisvinti geležį po egzogeninio feritino įsisavinimo. Pavyzdžiui, ar feritinas po įsisavinimo patenka į endosomą ir / ar lizosomą? Jei taip, kas atsitinka su geležimi, esančia feritino sudėtyje po feritino skaidymo? Li ir kiti anksčiau pademonstravo H-feritino patekimą į žmogaus T limfoblastų ląstelių liniją (MOLT-4), parodydami H-feritino keliavimą į endosomas taip pat kaip ir į lizosomas [60]. Feritinas taip pat gali palikti endosomą ir nebūti transportuojamas į lizosomą; feritino skersmuo yra tik 12 nm, o tai iškelia hipotezę, kad feritinas gali palikti endosomą per poras, susidariusias esant ląsteliniam stresui [61]. Vis dėl to yra teigiama, kad tiek lizosominiu, tiek proteosominiu būdu medijuota feritino degradacija yra svarbi feritino homeostazės dalis [62].

2.2.3 Geležis

Geležis yra esminė hemoproteinų sudedamoji dalis, pagrindinė deguonies transportavimo baltymų elektronų transportavimo grandinės citochromo sistemoje, kepenų metabolizmo citochromo p450s, taip pat mioglobino ir hemoglobino. Būtina išlaikyti fiziologinius geležies lygius, nes trūkumas sukelia oksidacinio fosforilinimo sutrikimą, sutrikusį deguonies tiekimą ir vėlesnį metabolinį nepakankamumą. Tačiau toksiškumas irgi galimas. Pernelyg daug geležies gali generuoti toksiškus laisvuosius radikalus per Fentono reakciją, kuri tiesiogiai kenkia ląstelių baltymams, lipidams ir nukleino rūgštims [46].



11 pav. Fentono redokso reakcija [46]

Paveiksle pavaizduota reakcija, kai esant vandenilio peroksidui (H_2O_2), potencialiai žalingam aerobinio metabolizmo šalutiniam produktui, divalentė geležis (Fe^{2+}) oksiduojama į trivalentę geležį (Fe^{3+}), susidarant hidroksilo radikalui ($OH\cdot$) ir hidroksido jonui (OH^-). Šie laisvieji radikalai tampa ląstelių oksidacinio streso priežastimi, kenkia DNR, lipidams ir baltymams. Feritino molekulės padeda suskaidyti šią laisvąją geležį, užkirsdamos kelią jos dalyvavimui šioje reakcijoje ir vėlesniame laisvųjų radikalų sukeltame ląstelių pažeidime. Be šio apsauginio vaidmens redokso reakcijose ir geležies homeostazėje laisvo serumo feritino koncentracija didėja esant užsitęsusiame uždegimui. Įrodytas feritino vaidmuo imuninio atsako moduliavime, indukuojant priešuždegiminius citokinus ir ribojant laisvųjų radikalų sukeltą žalą [46].

Žmonių mityboje geležis yra pasisavinama dvejomis formomis: organinis hemas iš mėsos produktų, pernešamas hemą transportuojančio baltymo 1 (HCP1), ir neorganinė geležis, pernešama divalenčio metalo nešiklio 1 (DMT1). Kai jie yra absorbuojami į kraujotaką, transferinas jungiasi su dviem geležies molekulėmis, turinčiomis labai aukštą afinitetą, ir yra transportuojamas kraujyje. Komplekse su transferino receptoriais (TFR1 ar TFR2) geležis gali pereiti plazminę membraną receptorių sąlygota endocitoze [63]. Citozolyje nedidelė dalis ląstelinės geležies yra laikoma labiliame geležies baseine, o didžioji dalis yra sunaudojama fermentų arba išskiriama su feritinu, kad būtų išvengiama geležies sukeltų oksidacinių pažeidimų.

2.2.4 Feritino nustatymui taikomi metodai

Specifinis baltymų matavimas tapo svarbia rutininės klinikinės chemijos laboratorijos dalimi. Serumo feritino koncentracijos matavimo paklausa labai padidėjo, nes tai labai naudinga procedūra išmatuojant geležies atsargų kiekį organizme [64].

1972 m. naudojant imunoradiometrinį tyrimą, Addison ir kiti įtikinamai įrodė, kad feritinas gali būti patikimai aptinkamas žmogaus serume [65]. Feritino koncentracija serume ir toliau matuojama iki šios dienos, nors dabar yra žinoma, kad daugelis kitų veiksnių, įskaitant uždegimą, infekciją ir piktybinę ligą, kurios visos gali padidinti feritino koncentraciją serume, apsunkina šios vertės aiškinimą [66].

Kadangi feritino koncentracija yra plačiai naudojama kaip geležies atsargų ir būklės žymuo, svarbu nustatyti, ar visi metodai, dažniausiai naudojami vertinant feritino koncentraciją, gali aptikti visas galimas geležies būsenas (trūkumą, normalią būklę ir perkrovą) ir įvertinti metodų palyginamumą visose matavimo sistemose. Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) Biologinės standartizacijos ekspertų komitetas sukūrė tarptautines etalonines medžiagas, skirtas tyrimams plėtoti arba laboratorijų veiklos rezultatams vertinti. Šios feritino etaloninės medžiagos buvo sukurtos darbo / antrinių standartų kalibravimui rutiniuose laboratorijos atliekamuose tyrimuose bei naujų feritino kiekio nustatymo bandymų įvertinimui ir standartizavimui. Buvo sukurtos trys tarptautinės etaloninės medžiagos: 1-a (kepenų), 2-a (blūznies) ir 3-a (rekombinantinė) [67].

Nors šiuo metu PSO pripažįsta, kad feritinas paprastai nustatomas serume arba plazmoje, naudojant fermentų imuninius tyrimus po veninio kraujo surinkimo, nėra specifinių rekomendacijų dėl analizės metodų ir kintamumo [68].

Tyrimas, atspindintis tikrąją feritino koncentraciją ir patvirtintas naudojant etalonines medžiagas, turi reikšmingą poveikį asmens ir visuomenės sveikatos perspektyvai. Pacientų rezultatų palyginamumas diferencinei geležies trūkumo diagnozei arba geležies perkrovos rizikai yra reikšmingas klinikiškiems sprendimams. Svarbu nustatyti, ar terapinis sprendimas ir gydymas turi tikėtiną poveikį ir nesukelia žalos, neatsižvelgiant į naudojamą laboratorinį metodą. Jei skirtingi laboratoriniai metodai duoda skirtingus rezultatus, tai gali lemti klaidingą poveikio vertinimą ir lemti neteisingus su visuomenės sveikata susijusius sprendimus. Be to, turėtų būti įmanoma palyginti skirtingu metu atliktų tyrimų ir tyrimų, atliktų skirtingais metodais, duomenis [69].

Turbidimetrinis metodas

Šiais laikais yra tendencinga integruoti dažniausiai pasitaikančius testus į keletą didelės apimties klinikinių laboratorinių analizatorių. Taip turbidimetrinės procedūros leidžia įtraukti daugelį homogeninių imunologinių tyrimų į pagrindinius analizatorius, naudojamus rutininėse klinikinės chemijos laboratorijose [64].

Atsižvelgiant į klinikinių laboratorijų konsolidavimą, latekso turbidimetrinis feritino tyrimas gali būti įgyvendinamas visuose klinikinės chemijos analizatoriuose, todėl feritino tyrimas gali būti atliekamas bet kurioje platformoje, leidžiant įtraukti daugiau geležies tyrimų naudojant tą patį analizatorių ir taip patvirtinant klinikinę diagnozę. Tai tokie tyrimai, kaip: feritino koncentracijos matavimas serume, geležies kiekio matavimas serume, bendras geležies surišimo pajėgumo matavimas, tirpių transferino receptorių matavimas ir transferino įsotinimo indeksas. Šiuo atveju galima naudoti vieną serumo mėgintuvėlį, kiek įmanoma sumažinant laiko sąnaudas [70].

Latekso turbidimetrinis feritino tyrimas yra pagrįstas feritino agliutinacija serume ant latekso dalelių, padengtų antikūnais (Ak) prieš žmogaus feritiną: ši agliutinacija yra proporcinga feritino koncentracijai ir matuojama turbidimetru esant 530 nm bangos ilgiui, o bendras analizės laikas yra 10 minučių [70].

Imunoturbidimetrinis tyrimas reikalauja mažiau matavimo laiko nei kiti imuniniai tyrimai ir leidžia patikimai bei tiksliai išmatuoti feritino koncentraciją nuo 4 µg/L, o tai yra pakankama įprastinei diagnostikai ir palyginama su kitomis imuninės analizės sistemomis. Be to, latekso turbidimetrinis feritino tyrimas didina produktyvumą, mažina išlaidas bei pagerina kokybę ir tyrimo pajėgumą [70].

Vis dėlto reakcijai būdingi tam tikri dėsningumai, kurie labai svarbūs siekiant užtikrinti, kad turbidimetriniai matavimai būtų tikslūs. Į antikūnų tirpalą nuolatos pridedant antigeno, didėja reakcijos mišinio drumstumas, dėl to didėja ir matuojamojo signalo stipris. Tačiau pasiekus tam tikrą antigeno koncentraciją, kai antikūnai nebegali surišti daugiau antigeno, drumstumas ir matuojamasis signalas ima mažėti.

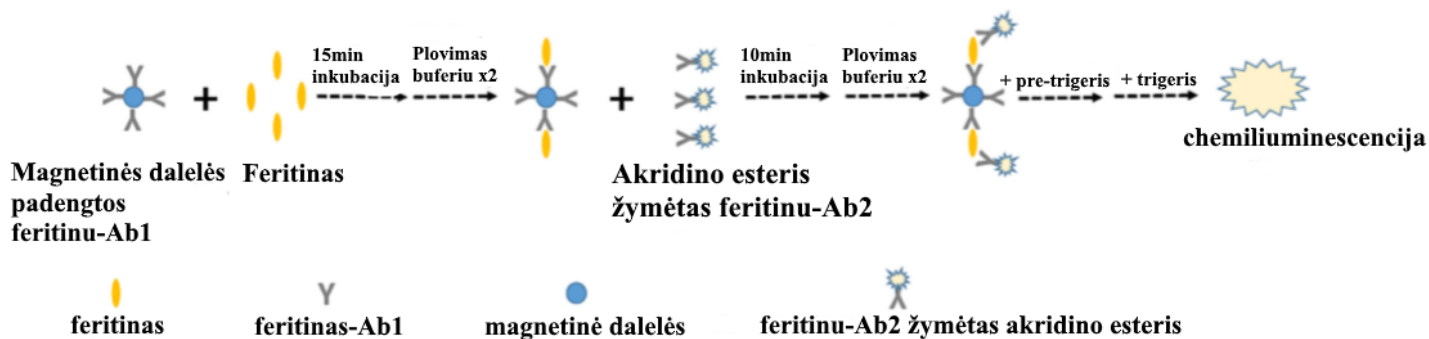
Mikrodalelių chemiliuminescencinės imunoanalizės metodas

Imunologinis aptikimo metodas dažniausiai naudoja specifinę antigeno ir antikūno reakciją, kad aptiktų medžiagas, tokias kaip baltymai, hormonai ir panašiai, o chemiliuminescencinio imunologinio tyrimo metodas yra naujas metodas, pagrįstas atsparumo spinduliuotei analizės metodu ir imunologiniu tyrimu, kuris nėra radioaktyvus ir neturi kancerogeninių medžiagų, nekenkia aplinkai ir žmogui. Šis metodas su paprasto veikimo

ypatumais, aukštu jautrumu ir stabiliais rezultatais, o tai labai svarbu ankstyvai daugelio ligų diagnozei [71]. Cheminės liuminescencijos tyrimas yra labai jautrus, todėl visų naudojamų reagentų, substratų, tirpiklių grynumas turi būti griežtai kontroliuojamas.

Taigi kitas metodas, naudojamas feritino koncentracijai nustatyti, yra chemiliuminescencijos mikrodalelių imunoanalizės (CMIA). Chemiliuminescencija – tai cheminė reakcija, kai fermento veikiamas substratas yra sužadinamas ir jam grįžtant į įprastinę nesužadintą būseną, susidaro galutinis reakcijos produktas ir išsiskiria šviesos fotonai. Naudojami įvairiomis medžiagomis žymėti antikūnai (Ak) ir antigenai (Ag). Ak markeriai reakcijos substratą (Ak-Ag kompleksą) paverčia produktu, kuris išskiria šviesos fotonus. Luminescencija (švytėjimas) reiškia, jog iš tarpinio produkto yra susidaręs galutinis produktas [71].

Cheminės liuminescencijos metodo esmė yra susidariusių Ak-Ag kompleksų atpažinimas ir nustatymas, naudojant žymėtus Ak. Po inkubacijos susidarius Ak-Ag kompleksui, į mišinį yra pridamas konjugatas, dažniausiai naudojamas akridino esteris. Švytėjimo aktų skaičius ir intensyvumas yra tiesiogiai proporcingi susidariusių Ak-Ag kompleksų skaičiui.



12 pav. Chemiliuminescencijos mikrodalelių imunoanalizės, skirtos feritino aptikimui, schema [71]

CMIA metodu feritino nustatymo metu (12 pav.) magnetinės dalelės, kurios padengtos feritino-Ab1 monokloniniais antikūnais pridėjus feritino, yra inkubuojamos 15 min. Po to mišinys yra du kartus plaunamas plovimo buferiu. Į reakcijos mišinį pridamas akridino esteris, žymėtas feritino-Ab2 antikūnais, ir 10 min vykdoma inkubacija. Po inkubacijos mišinys dar du kartus plaunamas plovimo buferiu. Galiausiai į reakcijos mišinį pridama chemiliuminescencinį

švytėjimą skatinančių medžiagų (pre-trigeris, trigeris) ir vyksta chemiluminescencinio signalo matavimas [71].

2.3 Kreatininas

Kreatininas yra kreatinfosfato skilimo produktas raumenyse ir paprastai organizme jis yra gana pastovus. Kreatininas taip pat sintetinamas inkstuose, kepenyse ir kasoje [72]. Nuo savo atradimo XIX amžiuje serumo ir šlapimo kreatinino kiekio įvertinimas ir neseniai seilių kreatinino tyrimai buvo veiksmingai naudojami vertinant inkstų būklę [73]. Šis raumenų metabolitas yra svarbus inkstų funkcijos rodiklis, nes jis iš esmės per inkstus išsiskiria nepakitęs [74]. Individuali kreatinino gamyba yra palyginti stabili ir daugiausia priklauso nuo raumenų masės [75], todėl bet kokie fiziologiniai raumenų masės pokyčiai sukels kreatinino koncentracijos kitimą. Štai kodėl serumo kreatininas (sCr) turi būti interpretuojamas atsargiai vaikams ir pagyvenusiems žmonėms [76]. Normalus kreatinino išsiskyrimas vyrams yra nuo 14 iki 26 mg / kg per parą ir 11 iki 20 mg / kg per parą moterims. Kraujo serume kreatinino koncentracija yra gana nedidelė: moterų 53-88 $\mu\text{mol/l}$, o vyrų ji didesnė – 71-115 $\mu\text{mol/l}$. Rekomenduojama kreatinino norma šlapime vyrams yra 8,8-17,7 mmol/l, o moterims – 7,1-15,9 mmol/l.

Kreatinino eliminacija iš esmės yra reninė. Kreatininas laisvai filtruojamas glomerulo, esant pastoviam greičiui, bet taip pat sekretuojamas tubulių (nuo 10 proc. iki 40 proc.). Kreatinino išsiskyrimas per inkstus yra labai nedidelis palyginus su išsiskyrimu su šlapimu pacientams, kuriems yra normalus ir vidutinio sunkumo inkstų funkcijos sutrikimas [77]. Sveikuose inkstuose kreatininas nėra nei sekretuojamas, nei reabsorbuojamas, išskyrus egzogeninį kreatiną, kuris yra sekretuojamas.

Padidėjusi kreatinino koncentracija yra vėlyviausias inkstų funkcijos pažeidimo žymuo (po šlapimo rūgšties ir šlapalo). Koncentracijos padidėjimas gali pasireikšti tiek dėl ūminio, tiek dėl lėtinio nepakankamumo. Reikšmingas koncentracijos padidėjimas fiksuojamas, kai nefunkcionuoja apie 50 proc. nefronų. sCr gali padidėti ir esant kai kurioms raumenų ligoms, tokioms, kaip polimiozitas ar progresuojanti raumenų distrofija.

Ekstremalus raumenų masės netekimas [78] arba raumenų masės padidėjimas [79] apsunkina sCr naudojimą kaip inkstų funkcijos žymenį. Sportininkų populiacijoje nenormalūs padidėję kreatinino kiekiai kartais gali būti nustatomi regbio žaidėjams, kurie pasižymėjo aukščiausiomis sCr vertėmis, kai kuriems triatlonininkams, dviratininkams ir futbolo žaidėjams taip pat nustatomas padidėjęs sCr. Banfi ir kiti [80] rekomendavo individualiai stebėti sportininkus atliekant serijinius sCr matavimus, kad būtų galima įvertinti bet kokius pokyčius, naudojant sCr vertes prieš treniruotes ir varžybas kaip referentines vertes, skiriant ypatingą dėmesį sporto rūšiai ir kūno masės indeksui (KMI).

Mitybai suvartojama mėsa irgi yra kreatinino šaltinis. Trumpalaikis (20 g per parą 5 dienas) ir ilgalaikis (3 g per parą 56 dienas) kreatino papildomas suvartojimas padidino kreatinino koncentraciją serume, nes padidėja kreatinino reabsorbcija iš virškinamojo trakto (egzogeninis kreatininas). Tačiau pokyčiai pastebimi vartojant daug virtos, bet ne keptos mėsos [81]. Pakeitus mitybą, kreatinino koncentracija normalizuojasi.

Kitas dažnai nepastebėtas poveikis yra matomas hemolizuotuose mėginiuose, kuriuose yra vaisiaus hemoglobino (HbF), pavyzdžiui, naujagimiams, kurie yra jaunesni nei 6 mėnesių amžiaus. Jei yra pakankamai HbF, gali būti matuojamas klaidingai mažas kreatinino kiekis. Skirtingai nuo suaugusiųjų hemoglobino, kuris, esant natrio hidroksidui, iš karto tampa rudos spalvos, HbF yra atsparus šarmams, o *Jaffe* reakcijos metu lėtai keičia spalvą [82]. Tačiau tai galioja ne tik naujagimių mėginiuose. Nerekomenduojama tirti hemolizuotą kraujo plazmą arba serumą. Kreatinino eritrocituose yra tiek pat, kiek ir plazmoje, tačiau, jei mėginyje yra hemoglobino, galimas netikslus tyrimo rezultatas dėl didesnio kreatinino kiekio eritrocituose, kas gali lemti reakcijos trukdžius.

sCr panaudojimą naujagimių glomerulų filtracijos greičio (GFR) įvertinimui apsunkina fiziologiniai svyravimai ir analitiniai aspektai [83]. Be perinatalinių fiziologinių svyravimų, matavimai priklauso ir nuo kiekybinio nustatymo metodo [84]. Iš pradžių sCr pamatinės vertės buvo pagrįstos nekompensuotu *Jaffe* metodu, kolorimetrine reakcija naudojant šarminį pikratą. Tačiau *Jaffe* tyrimai yra susiję su endogeninių ir egzogeninių medžiagų, kurios paprastai gaunamos naujagimių mėginiuose, trikdžiais. Neseniai buvo įvesti fermentiniai metodai, kurie yra mažiau linkę į tokius trukdžius, todėl labiau tinka naujagimiams [85].

Kreatinino kiekio sumažėjimas diagnostinės reikšmės neturi, tačiau esant ženkliam sumažėjimui, tai gali byloti apie kepenų funkcijos sutrikimus. Be to, kreatinino ekskrecija mažėja su amžiumi, nes atsirandant raumenų atrofijai mažėja kreatinfosfato susidarymas. Sumažėjusi koncentracija būdinga žmonėms, kurių maža raumenų masė, vaikams ir nėščiosioms.

Apibendrinant galima pasakyti, kad nėra jokios prielaidos, jog tikslus kreatinino kiekio įvertinimas atlieka pagrindinį vaidmenį vertinant inkstų sutrikimus. Sąlygos kurti naujesnius ir specifiškesnius metodus, skirtus kreatinino tyrimams keliuose kūno skysčiuose, leido lengviau naudoti sudėtingus analizatorius kreatinino įvertinimui, todėl šiandien automatinė analitinių platformų sCr matavimas tapo lengvas, greitas ir palyginti nebrangus.

2.3.1 Glomerulų filtracijos greitis

Klinikinėje praktikoje egzogeninių žymenų naudojimas glomerulų filtracijos greičiui (GFR) įvertinti yra techniškai sudėtingas ir brangus, todėl GFR yra nustatomas pagal serumo kreatinino lygį [86]. Glomerulų filtracijos greitis yra geriausias inkstų funkcijų rodiklis. Plazma filtruojama glomeruluose apie 140 ml / min greičiu. GFR priklauso nuo kraujo spaudimo, kūno masės ir amžiaus, su amžiumi GFR mažėja. GFR nustatymui naudojami serumo ir šlapimo kreatinino kiekiai. Pastaruoju metu nefrologai siūlo naudoti apskaičiuotą glomerulų filtracijos greitį (eGFR), o ne 24 valandų kreatinino klirensą arba tik serumo kreatinino kiekį. GFR pamatinių biologinių verčių intervalas yra 90-120 ml / min, o rezultatai, mažesni nei 60 ml / min, rodo inkstų pažeidimą.

Vis dėlto nėra realaus laiko matavimo GFR, kad būtų galima laiku nustatyti diagnozę. Praktikoje diagnozė priklauso nuo kreatinino (pCr) padidėjimo plazmoje; pagal kreatinino kinetiką, tai gali pasireikšti tik 24–72 val. po GFR sumažėjimo [87]. Glomerulų filtracijos greitis sumažėja beveik perpus esant ryškiam kreatinino kiekio padidėjimui serume. Tarp serumo kreatinino ir glomerulų filtracijos greičio įverčio (eGFR) yra eksponentinis ryšys, todėl sCr matavimų klaidos gali labai paveikti eGFR rezultatus, ypač esant mažoms sCr reikšmėms, atitinkančioms aukštus GFR įverčius [88].

Buvo sukurtos kelios sCr pagrindu pagrįstos lygtys, atsižvelgiant į šiuos fiziologinius veiksnius (amžių, lytį ir etninę kilmę), kad būtų galima įvertinti GFR [89]. Visai neseniai buvo

sukurta pilno amžiaus spektro (FAS) lygtis, pagrįsta amžiaus / lyties sveikų populiacijų normalizuoto serumo kreatinino samprata, kad būtų pašalintas eGFR pokytis, kai žmonės pereina nuo vienos lygties, rekomenduojamos jų amžiui, į kitą [90].

sCr yra plačiai prieinamas ir patikimas inkstų funkcijos rodiklis, integruotas į GFR nuspėjamąją formulę. Taigi gydytojai ir laboratorijos darbuotojai turėtų žinoti, kokių sunkumų atsiranda matuojant kreatinimą, kad būtų išvengta klaidingo inkstų funkcijos interpretavimo.

2.3.2 Kreatinino nustatymo metodai

Kreatinino matavimo metodai yra cheminiai ir fermentiniai metodai automatizuotais analizatoriais, didelio našumo skysčių chromatografija (HPLC) ir izotopų praskiedimo masių spektrometrija (IDMS). IDMS yra etaloninis kreatinino matavimo metodas, tačiau jis nėra praktiškas rutiniam naudojimui. Klinikinėse laboratorijose naudojami kreatinino metodai paprastai remiasi automatizuotais cheminiais arba fermentiniais metodais. Dažniausias metodas yra *Jaffe* pagrindu sukurtas kreatinino-pikrato, susidarančio šarminėje terpėje [91].

Nustatant kreatinimą svarbus yra tyrimų tikslumas. Atsitiktinė klaida yra susijusi, pavyzdžiui, su skirtumais tos dienos kalibravimo metu, analizatorių vidinėmis charakteristikomis. Lyginant abu metodus, analitinis tikslumas yra sistemingai geresnis fermentiniams tyrimams [81]. Prancūzijos daugiacentriniame vertinime fermentinio metodo netikslumas tarp laboratorijų svyruoja nuo 1,2 proc. iki 3,4 proc., o kompensuotų *Jaffe* metodų netikslumai tarp laboratorijų svyruoja nuo 2,5 proc. iki 5,8 proc. [92].

sCr rezultatų kintamumas sietinas su standartizacijos stoka bei dėl netikslumo ir nespecifiškumo dėl trukdančių veiksnių kiekvienoje matavimo sistemoje.

***Jaffe* metodas**

Dauguma cheminių kreatinino matavimo metodų pirmiausia yra pagrįsti jo reakcija su šarminiu pikratu. Šioje reakcijoje, kurią pirmą kartą aprašė *Jaffe* XIX a. pabaigoje, kreatininas reaguoja su pikrato jonu šarminėje terpėje, kada gaunamas oranžiniai raudonos spalvos

kompleksas. Susidariusio dažiklio koncentracija yra proporcinga kreatinino koncentracijai [91]. Absorbcijos padidėjimo greitis esant 500 nm dėl šio komplekso susidarymo yra tiesiogiai proporcingas kreatino koncentracijai mėginyje [93].

Jaffe metodas priklauso nuo pikro rūgšties koncentracijos, pH, bangos ilgio, temperatūros ir trukdžių. *Jaffe* reakcija nėra specifinė kreatininui, nes žinoma, kad daugelis junginių pagamina į *Jaffe* panašų chromogeną, įskaitant baltymus, gliukozę, askorbo rūgštį, bilirubina, piruvatą ir cefalosporiną [94]. Taigi yra išmatuojama 15–25 proc. didesnė už faktinę vertę [95]. Be to, šis metodas yra užimantis daug laiko ir nėra lengvai automatizuojamas.

Ankstyvieji metodai naudojo deproteinizuotą kraują. Siekiant pagerinti specifiškumą, kreatininas buvo izoliuojamas nuo įprastų trukdančių medžiagų adsorbuojant ant aliuminio silikato, pavyzdžiui, Lloyd's reagento, po to sekant eliucijai ant šarminio pikrato, po centrifugavimo ir dekantavimo. Šiam tikslui buvo naudojamos ir katijonų mainų dervos. Kitos strategijos, skirtos specifiškumui gerinti, buvo susijusios su *Jaffe* tyrimu tiek labai šarminiu pH, tiek po parūgštinimo iki neutraliesnio pH [96]. Tik trukdančios medžiagos reaguoja neutraliame pH, o skirtumas gali būti tikslesnis [97].

Buvo atlikta įvairių techninių patobulinimų siekiant sumažinti endogeninių medžiagų trikdžius ir pagerinti tikslumą. Kompensuotam *Jaffe* tyrimui sCr rezultatai koreguojami sistemingai atimant pastovų faktorių (nuo 15 iki 25 μM), atitinkantį vidutinį nuo ne kreatinino priklausomą signalą, siekiant panaikinti reakcijas su ne kreatinino chromogenais [77].

Nustatyti du tipai ne kreatinino chromogenų, kurie veikia reakcijas: pirmieji dalyvauja labai greitoje reakcijoje, sumaišius reagentus ir mėginius per pirmas 20 sekundžių formuoja aduktus (pavyzdžiui, acetoacetatas), antrieji, kurie dalyvauja praėjus 80-100 sekundžių (pavyzdžiui, baltymas). „Langas“ tarp 20 ir 80 sekundžių - tai laikotarpis, kai signalo pokytis labiausiai leidžia įvertinti kreatinino-pikrato reakciją. Šis „langas“ leido pagerinti metodo specifiškumą.

Centrifuginiai analizatoriai su keliais skaitymo taškais buvo idealūs kruopščiai ištiriant kreatinino ir trukdančių medžiagų reakcijos su šarminiu pikratu kinetiką. Tokie tyrėjai kaip Cook [97], nustatė, kad kreatinino reakcija su šarminiu pikratu progresavo tiek greitai, tiek lėtai reaguojančių trukdančių medžiagų. Acetoacetatas, susidaręs ketogenezės metu tokiomis

sąlygomis kaip cukrinis diabetas, yra svarbi medžiaga, greitai reaguojanti su šarminiu pikratu. Problema buvo išspręsta „Beckman Synchron CX3“, padidinant kreatinino reakcijos temperatūrą nuo 37°C iki 42°C, kad acetoacetato įsikišimas būtų minimalus tuo metu, kai pagrindinė kreatinino reakcija buvo stebima 25,6 sekundės. Kreatinino pervertinimas sumažėjo nuo 33 iki 6 $\mu\text{mol} / 1 / \text{mmol} / 1$ acetoacetato. Šią „Beckman“ sistemą naudojo Levey ir kolegės, siekdami peržiūrėtą IDMS atsekamąją lygtį, pastaroji naudojo kalibravimą pagal „Roche“ fermentinį tyrimą, kuris parodė, kad suteikia su IDMS suderinamus rezultatus [98].

Bilirubinas kelia didelių problemų tiesioginiuose *Jaffe* tyrimuose. *Jaffe* tyrimo sistema yra labai šarminė, ir bilirubinas oksiduojasi į biliverdiną tyrimo metu, o tai kompensuoja spalvos padidėjimą, kurį sukelia kreatininas, reaguojantis su šarminiu pikratu. Buvo imtasi skirtingų metodų šiam trikdymui sumažinti su įvairiais sėkmės laipsniais [99]. Alternatyvus būdas valdyti bilirubino interferenciją yra bilirubino oksidavimas į biliverdiną naudojant kalio fericianidą prieš *Jaffe* reakciją. Šiam tikslui taip pat buvo naudojama bilirubino oksidazė. Tačiau buvo pranešta, kad, jei reagentas turi natrio dodecilo sulfatą, laikui bėgant sunaikinamas fericianidas. Taigi, siekiant užtikrinti apsaugą nuo bilirubino trukdžių, fericianidas turi būti atskirtas nuo ploviklio. Kitas būdas sumažinti trikdžius buvo naudoti „greičio atmetimą“, kai spalvos pokyčio sparta mėginyje tik su natrio šarmu (NaOH) yra naudojama kaip korekcijos koeficientas, nustatytas po pikro rūgšties pridėjimo. Ši strategija suteikia tik dalinę korekciją bilirubino trikdžiams dėl oksidacijos kreivės pobūdžio [100].

Standartizacija nekoreguoja analitinių nespecifinių problemų. Specifiškumo stoka yra pagrindinė *Jaffe* metodo problema [82], nes nespecifiniai chromogenai, tokie kaip ketonai, gliukozė ir baltymai, trukdo reakcijai. Šių medžiagų poveikio mastas priklauso nuo to, kaip tiksliai pasirinktos reakcijos sąlygos. Labai svarbu atminti, kad skirtingos *Jaffe* reakcijos, naudojamos skirtingų gamintojų, skirtingai reaguos į trukdžius.

Fermentinis metodas

Kitas kreatinino metodas yra pagrįstas fermentiniu principu. Fermentiniai metodai paprastai yra konkretesni nei cheminiai metodai. Fermentiniai kreatinino metodai paremti

skirtingų metabolinių kelių fermentų tyrimais. Visi metodai sudaryti iš kelių etapų, o svarbiausias etapas – galinio taško fotometriniu matavimas.

Kreatininas mėginyje hidrolizuojamas kreatininazės į kreatiną. Kreatinas savo ruožtu hidrolizuoja kreatinazę į sarkoziną ir karbamidą. Sarkozinas iš šios reakcijos oksiduojamas sarkozino oksidazės į gliciną ir formaldehidą, kartu susidarant vandenilio peroksidui. Vandenilio peroksidas reaguoja su 4-aminoantipirinu ir N-etil-N-sulfopropil-m-toluidinu, dalyvaujant peroksidazei. Gautas absorbcijos pokytis esant 548 nm yra proporcingas kreatinino koncentracijai mėginyje [93].

Dauguma fermentinių tyrimų atlieka reakcijos schemą kreatinino konversijai į vandenilio peroksidą, naudodami kreatininazę, kreatinazę ir sarkozino oksidazę. Katalizuotas peroksidazės, išlaisvintas H_2O_2 , reaguoja su leuko dažais, kad susidarytų spalvotas junginys. Kai kurie fermentiniai metodai naudoja kreatinino deiminazę, kad kreatiną paverstų amoniaku ir N-metilhidantoinu. Amoniakas reaguoja su α -okso glutaratu, esant glutamato dehidrogenazei ir oksiduojant koenzimą NADPH. NADPH sumažėjimas yra proporcingas kreatinino koncentracijai ir matuojamas esant 340 nm bangos ilgiui [77].

Fermentiniai tyrimai, pagrįsti nuosekliomis fermentinėmis reakcijomis, yra konkretesni nei *Jaffe* metodas. Pranešta, kad bilirubinas gali neigiamai paveikti fermentinius metodus, ypač metodus, pagrįstus kreatinino amidohidrolaze (kreatininaze) [101]. Šis trikdymas gali būti siejamas su konkurencija tarp bilirubino ir tyrimo substrato susidarantiems H_2O_2 reakcijos metu.

Dažniausiai naudojami fermentiniai metodai:

1. Kreatininazės. Ji katalizuoja kreatinino vartimą į kreatiną. Taip pagamintas kreatinas aptinkamas su serijomis fermentų katalizuotų reakcijų, apimančių kreatinkinazę, piruvatkinazę ir laktatdehidrogenazę, stebint absorbcijos sumažėjimą esant 340 nm. Reakcijos su kreatininaze pradžia leidžia pašalinti endogeninį kreatiną ir piruvatą priešinkubacinėje reakcijoje [102]. Reakcijos kinetika yra prasta, ir reikia 30 minučių inkubacijos periodo, kad reakcija pasiektų pusiausvyrą. Šis trūkumas gali būti pašalintas kinetiniu požiūriu, tačiau dar labiau sumažinant jautrumą. Kreatininazės fermentinis metodas nėra labai

populiarus iš dalies dėl blogo jautrumo, tikslumo ir santykinai didelių reagentų kainų [103].

2. Kreatininazė ir kreatinazė. Populiariesnis metodas, kada susidaro sarkozinas ir karbamidas (šlapalas), o susidarę junginiai yra matuojami pridėjus fermento sarkozinoksidazės ir peroksidazės. Susidaręs vandenilio peroksidas gali būti nustatytas keliais skirtingais metodais [104]. Galimus askorbo rūgšties sukeltus trukdžius galima įveikti įtraukiant askorbato oksidazę kaip veikiančio reagento komponentą [72].
3. Kreatinindeaminazė. Deaminazės fermentinės sistemos, kurios naudoja kreatinindeaminazę [105], yra plačiai paplitusios kaip tiksliausi rutininiai metodai, kurie duoda rezultatų, glaudžiai sutampančių su izotopų skiedimo masių spektrometrija (IDMS) [98]. Kreatinindeaminazė katalizuoja kreatinino vartimą į N-metilhidantoiną ir amoniaką. Tada šie produktai gali būti apskaičiuoti matuojant NADH esant 340 nm, po kreatinkinazės reakcijų sekos [106]. Ankstyvieji metodai buvo sutelkti į amoniako aptikimą naudojant glutamato dehidrogenazę arba Berteloto reakciją. Alternatyvus metodas yra su fermentu N-metilhidantoinamidohidrolaze [72].
4. Dujų chromatografijos masių spektrometrijos (GCMS) ir skysčių chromatografijos masių spektrometrijos metodai (LCMS) laikomi pamatiniais nustatant kreatiną serume ir šlapime. Kreatininas turi būti derivatizuojamas prieš GC analizę dėl savo poliškumo. Be to, reikia atlikti katijonų mainų valymo etapą prieš GC analizę, nes kreatininas derivatizuojamas į tas pačias chemines medžiagas kaip ir kreatininas [103].

Naudojant fermentų reakcijomis pagrįstus metodus, būtų galima pagerinti matavimo specifiškumą, nes šiuo atveju jis apsaugo nuo ne kreatinino junginių. Tačiau kaina yra šio metodo trūkumas [93].

2.4 Metodų verifikavimas

Metodo įsisavinimas (angl. *verification*) – tai charakteristikų palyginimas su aprašytais, gamintojo nurodytais charakteristikomis. Jis apima gautų įsisavinimo įrašų ir rezultatų

dokumentavimą bei nuolatinę patikrą. Tyrimo metodų įsisavinimo esmė – įsitikinti, kad gamintojo nurodytos tyrimo metodų charakteristikos gali būti pasiekiamos realiomis laboratorijos sąlygomis. Tyrimo metodų įsisavinimui būtina suprasti metodo reikalavimus, įvertinti, ar yra galimybė užtikrinti bei palaikyti reikiamas aplinkos sąlygas, įvertinti, ar laboratorija turi visas reikalingas priemones ir etalonus, yra aiškios ėminių ir reagentų laikymo sąlygos. Svarbu užtikrinti vidaus kokybės kontrolę bei dalyvavimą išorinio kokybės vertinimo programose. Vykdamas metodo įsisavinimo procesą atliekami eksperimentai, kuriais tikrinamas metodo tiesiškumas, įvertinamos arba nustatomos rekomenduojamos pamatinių verčių ribos, palyginami įsisavinamu metodu ir anksčiau naudotu metodu gauti pacientų rezultatai. Kontrolės etape patikrinama, ar charakteristikos buvo pasiektos realiomis laboratorijos sąlygomis, lyginant su gamintojo nurodytomis tyrimo metodo charakteristikomis [1].

Praktikoje metodo įsisavinimas paprastai apsiriboja metodų palyginimu, siekiant nustatyti netikslumą ir poslinkį. Vykdomi eksperimento pakartojimai, siekiant nustatyti neglaudumą ir tiesiškumą. Klinikinės laboratorijos dažniausiai matuoja 20-200 pacientų mėginių, turinčių kuo platesnį koncentracijos intervalą, naudojant senąjį (keičiamą) ir naująjį (diegiamą) metodą. Tinkamos stabilios vidinės kokybės kontrolės medžiagos yra matuojamos dviem lygiais mažiausiai 5 kartus 5 dienas iš eilės, siekiant įvertinti neglaudumą ir nustatyti pradines vidaus kokybės kontrolės procedūrų ribas. Tiesinė regresija, poslinkio diagramos ir dispersinės analizės metodai naudojami poslinkiui, neglaudumui, matricos efektams ir kitiems veiksniams nustatyti [2].

Medicinos laboratorijoms taikomas ISO 15189 „Medicinos laboratorijos. Ypatingieji kokybės ir kompetencijos reikalavimai“ standartas yra neišvengiamas įrankis, užtikrinantis biochemijos laboratorijos kompetencijos ir kokybės reikalavimus. Kiekvienoje laboratorijoje svarbu užtikrinti vidinę kokybės kontrolę, dalyvauti išorinės kokybės užtikrinimo programose. Jei pagal ISO 15189 standartą akredituotos laboratorijos turi du ar daugiau skirtingų analizatorių ar tyrimo procedūrų, jos turi nusistatyti šių rezultatų palyginimo funkcines charakteristikas. ISO 15189 standartas skirtas naudoti medicinos laboratorijoms, tobulinant jų kokybės valdymo sistemas ir vertinant jų kompetenciją, ir akreditavimo įstaigoms, kad jos patvirtintų ar pripažintų medicinos laboratorijų kompetenciją [107].

Skirtingų analitinių sistemų palyginamumas sumažina poslinkį ir leidžia palyginti atskirus bandymų rezultatus su populiacijos vertėmis, pagrįstomis pamatinių biologinių verčių intervalu arba ribine verte [108]. Tai užtikrina geriausią pacientų priežiūrą ir yra svarbiausias dalykas nuolatiniam laboratorijos, akredituotos pagal ISO 15189 standartą, tobulinimui [109].

Metodo įsisavinimas – tai procesas, skirtas nustatyti veikimo charakteristikas prieš pradėdant naudoti bandymo sistemą pacientų tyrimams atlikti. Vidinė kokybės kontrolė atliekama kasdien, sprendžiant priimti ar atmesti pacientų mėginių rezultatus bei sudaryti sąlygas laboratorijai stebėti ir dokumentuoti savo darbo kokybę. Paprastai kokybės kontrolė susideda iš dviejų lygių (kartais ir trijų), atitinkančių normalų ir patloginį analitės lygį [1].

Verifikuojant tyrimą reikia įvertinti analitinį specifiškumą, analitinį jautrumą, tiesiškumą, glaudumą, tikslumą bei referencinį intervalą.

- Specifiškumas – analitinio metodo gebėjimas aptikti tik dominančią analitę. Naudojamas validuotas metodas, žinant, kad jame nėra trukdančių medžiagų (hemolizė, ikterija, lipemija). Mėginių, kuriuose yra padidėjusi trukdančių medžiagų koncentracija, serija analizuojama naudojant metodą, kuris yra tiriamas, tada abiejų metodų rezultatai yra lyginami [110].
- Jautrumas – analitinio metodo gebėjimas nustatyti mažą tam tikros medžiagos koncentraciją biologiniame mėginyje. Kuo mažesnė aptinkama koncentracija, tuo didesnis analitinis jautrumas. Jautrumas gali būti apibūdinamas kaip analitinio metodo gebėjimas nustatyti analitės koncentracijos pokyčius. Kuo mažesnis pokytis aptinkamas, tuo didesnis yra analitinis jautrumas. Tai įvertinama kalibracinės kreivės nuolydžiu [110].
- Tiesiškumas apibūdinamas kaip analitinio matavimo intervalas, tai skaitinių rezultatų intervalas, kurį metodas gali pateikti be specialaus mėginio paruošimo, pavyzdžiui, praskiedimo [110].
- Glaudumas – atitikimo tarp kiekybinių verčių, gautų pakartotinais kiekybiniais matavimais, artumas nustatytomis sąlygomis. Glaudumas turėtų būti įvertinamas naudojant kokybės kontrolės medžiagą (mažiausiai dviejų lygių). Kiekvienas kokybės kontrolės medžiagos lygis matuojamas 5 kartus per dieną 5 dienas iš eilės. Glaudumo tyrimo metu gauti matavimai yra išanalizuojami, apskaičiuojamas

parametrų vidurkis, standartinis nuokrypis (SD) ir variacijos koeficientas (CV) kiekvienam naudotam kokybės kontrolės lygiui. Gauti variacijos koeficientai yra lyginami su gamintojo deklaruojamais variacijos koeficientais, naudojant ANOVA statistinę analizę, siekiant nustatyti, ar yra reikšmingų skirtumų tarp gautų CV ir gamintojo nurodomų CV tam tikrame pasikliovimo intervale (CI), kuris dažniausiai yra 95 proc. [110].

- Tikslumas - matavimo rezultato ir tikrosios matuojamosios (pamatinės) vertės artumas arba matavimo rezultatų atkartojamumas ir tikrosios matuojamosios vertės artumas. Skirtumas tarp matavimų rezultatų vidurkio ir sutartinės pamatinės vertės vadinamas poslinkiu [110].
- Referencinio intervalo įvertinimas – tai gamintojo nurodytų ar literatūroje skelbiamų pamatinių verčių verifikavimas, pritaikant juos laboratorijoje, tiriančioje metodą [110].

Metodų palyginimui, pagal Klinikinių ir laboratorijų standartų institutą (CLSI), bent 40 mėginių turi būti ištirta abiem lyginamais metodais arba tarp vieno bandymo metodo ir pamatinio metodo. Mėginiai paprastai turi būti analizuojami dviejų valandų intervale, t.y. tarp jau taikomo metodo ir naujai diegiamo metodo tyrimų neturėtų praeiti daugiau nei dvi valandos, nebent žinoma, kad mėginių stabilumas yra trumpesnis ir tyrimą reikia atlikti greičiau. Gali būti naudojami keli statistiniai metodai, vienas iš jų – koreliacijos koeficiento r apskaičiavimas, r turėtų būti daugiau arba lygus 0,95 [110].

ISO 15189 standarte nurodoma, kad validuotos tyrimo procedūros, kurios yra naudojamos be jokio pakeitimo, turi būti laboratorijos nepriklausomai patikrintos prieš pradėdant jas naudoti rutiniame darbe. Laboratorija turi gauti informaciją iš gamintojo siekiant patvirtinti procedūros funkcionalumo charakteristikas. Laboratorijos nepriklausomas patikrinimas, gaunant objektyvius įrodymus, turi patvirtinti, kad tyrimo procedūra atitinka deklaruojamas funkcionalumo charakteristikas. Patikrinimo metu patvirtintos tyrimo procedūros funkcionalumo charakteristikos turi atitikti numatomą tyrimų rezultatų naudojimą [109].

3. TYRIMO METODAI IR APIMTIS

Tyrimo metu buvo analizuojamos alaninaminotransferazės, aspartataminotransferazės, feritino ir kreatinino koncentracijos atsitiktinai parinktuose žmogaus kraujo serumo mėginiuose. Iš viso buvo atrinkta 116 mėginių alaninaminotransferazės koncentracijos nustatymui, 118 mėginių aspartataminotransferazės koncentracijos nustatymui, 42 mėginiai feritino koncentracijos nustatymui ir 121 mėginys kreatinino koncentracijos nustatymui. Mėginiai buvo tiriami Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Laboratorinės medicinos centro Biochemijos laboratorijoje. Visų analizių koncentracijos tyrimai žmogaus kraujo serume buvo atliekami dviem metodais: ALT ir AST tyrimas – su piridoksaliao 5'-fosfatu ir be piridoksaliao 5'-fosfato; feritino tyrimas – turbidimetriniu metodu ir mikrodalelių chemiluminescencinės imun analizės metodu (CMIA); kreatininas – *Jaffe* ir fermentiniu metodu.

1 lentelė. Mėginių skaičiaus pokytis pritaikius išskirčių pašalinimo metodikas

Tiriamoji analizė	Lyginami metodai	Mėginių skaičius tyrimo pradžioje	Mėginių skaičius po išskirčių koregavimo
ALT	Be P5P / su P5P	116	96
AST	Be P5P / su P5P	118	99
Feritinas	Turbidimetrinis / CMIA	42	30
Kreatininas	<i>Jaffe</i> / fermentinis	121	95

3.1 ALT nustatymo metodai

Metodo be piridoksaliao 5'-fosfato principas

ALT, esantis mėginyje, katalizuoja amino grupės perdavimą nuo L-alanino į α -ketoglutaratą, susidarant piruvatui ir L-glutamalui. Piruvatas, dalyvaujant NADH ir laktatdehidrogenazei, yra redukuojamas iki L-laktato. Šioje reakcijoje NADH yra oksiduojamas į NAD^+ . Reakcija yra stebima matuojant absorbcijos greičio sumažėjimą 340 nm bangos ilgyje dėl NADH oksidacijos į NAD^+ .

Metodo su piridoksolio 5'-fosfatu principas

ALT, esantis mėginyje, katalizuoja amino grupės perdavimą nuo L-alanino į 2-oksoglutaratą, dalyvaujant piridoksolio 5'-fosfatui. Reakcijos metu susidaro piruvatas ir L-glutamatas. Piruvatas, dalyvaujant NADH ir LDH, redukuojamas iki L-laktato. Šioje reakcijoje NADH yra oksiduojamas į NAD⁺. Reakcija stebima matuojant absorbcijos greičio sumažėjimą 340 nm bangos ilgyje dėl NADH oksidacijos į NAD⁺.

2 lentelė. ALT tyrimui naudotų metodų palyginimo schema

	Be P5P	Su P5P
Mėginių kiekis	96	96
Reagentai:		
R1	L-alaninas, β-NADH, LDH	L-alaninas, β-NADH, LDH, P5P, TRIS
R2	L-alaninas, α-ketoglutaratas	L-alaninas, 2-oksoglutarato rūgštis, TRIS
Laboratoriniai prietaisai	Abbott ARCHITECT c8000	Abbott ARCHITECT c8000
Kokybės kontrolė	„Liquid Assayed Multiqual” partijos numeris 45790	„Liquid Assayed Multiqual” partijos numeris 45790

3.2 AST nustatymo metodai

Metodo be piridoksolio 5'-fosfato principas

Mėginyje esanti AST katalizuoja amino grupės perkėlimą iš L-aspartato į α-ketoglutaratą, susidarant oksaloacetatui ir L-glutamalui. Oksaloacetatas, dalyvaujant NADH ir malato dehidrogenazei, yra redukuojamas iki L-malato. Šioje reakcijoje NADH oksiduojamas į NAD⁺. Reakcija stebima matuojant absorbcijos greičio sumažėjimą 340 nm bangos ilgyje dėl NADH oksidacijos į NAD⁺.

Metodo su piridoksolio 5'-fosfatu principas

Mėginyje esantis AST katalizuoja amino grupės perkėlimą iš L-aspartato į 2-oksoglutaratą, dalyvaujant piridoksolio 5'-fosfatui. Reakcijos metu susidaro oksaloacetatas ir L-glutamatas. Oksaloacetatas, dalyvaujant NADH ir MDH, redukuojamas į L-malatą. Šioje reakcijoje NADH oksiduojamas į NAD⁺. Reakcija stebima matuojant absorbcijos greičio sumažėjimą 340 nm bangos ilgyje dėl NADH oksidacijos į NAD⁺.

3 lentelė. AST tyrimui naudotų metodų palyginimo schema

	Be P5P	Su P5P
Mėginių kiekis	99	99
Reagentai:		
R1	L-aspartatas, β-NADH, MDH, LDH	L-aspartatas, β-NADH, MDH, LDH, P5P, TRIS
R2	L-aspartatas, α-ketoglutaratas	L-aspartatas, 2-oksoglutarato rūgštis, TRIS
Laboratoriniai prietaisai	Abbott ARCHITECT c8000	Abbott ARCHITECT c8000
Kokybės kontrolė	„Liquid Assayed Multiqual” partijos numeris 45790	„Liquid Assayed Multiqual” partijos numeris 45790

3.3 Feritino nustatymo metodai

Turbidimetrinio metodo principas

Quantia Ferritin reagentai skirti kiekybiniam feritino nustatymui žmogaus kraujo serume arba plazmoje. Reagentas yra vienodo dydžio polistireno latekso dalelių, kurios padengtos triušio imunoglobulino G (IgG) antikūnais prieš žmogaus feritiną, suspensija. Kai mėginys, kuriame yra

feritino, sumaišomas su reagentu, įvyksta aiški agliutinacija, kuri gali būti išmatuojama turbidimetru.

Mikrodalelių chemiliuminescencinės imunoanalizės metodo principas

Tai dviejų pakopų imunologinis tyrimas feritino nustatymui. Pirmiausia mėginys ir antikūnais prieš žmogaus feritiną padengtos paramagnetinės dalelės yra sumaišomos. Feritinas, esantis mėginyje, jungiasi prie antikūnais prieš žmogaus feritiną padengtų dalelių. Vyksta plovimas, po kurio į reakcijos mišinį pridedamas antikūnais prieš žmogaus feritiną akridinu žymėtas konjugatas. Vykdomas antrasis plovimas, po kurio į reakcijos mišinį yra pridedamas pre-trigeris (angl. *pre-trigger*) ir trigeris (angl. *trigger*). Chemiliuminescencija yra išmatuojama santykiniais šviesos vienetais (RLU). Detekcijos metu nustatomas tiesioginis ryšys tarp feritino kiekio koncentracijos ir RLU.

4 lentelė. **Feritino tyrimui naudotų metodų palyginimo schema**

	Turbidimetrinis	CMIA
Mėginių kiekis	30	30
Reagentai:		
R1	HEPES buferis	Antikūnais prieš žmogaus feritiną padengtos mikrodalelės TRIS buferyje su baltymų stabilizatoriais
R2	Polistireno latekso dalelių suspensija, padengta triušio IgG anti-žmogaus feritinu	Antikūnais prieš žmogaus feritiną, žymėti akridinu, konjugatas MES buferyje su baltymų stabilizatoriais
Laboratoriniai prietaisai	Abbott ARCHITECT <i>c8000</i>	Abbott ARCHITECT <i>i2000</i>
Kokybės kontrolė	„Multichem IA Plus“ partijos numeris 35711170	„Multichem IA Plus“ partijos numeris 35711170

3.4 Kreatinino nustatymo metodai

Jaffe metodo principas

Esant šarminiam pH, mėginyje esantis kreatininas reaguoja su pikratu ir susiformuoja kreatinino-pikrato kompleksas. Absorbcijos padidėjimo greitis esant 500 nm bangos ilgiui dėl šio komplekso susidarymo yra tiesiogiai proporcingas kreatinino koncentracijai mėginyje.

Fermentinio metodo principas

Mėginyje esantis kreatininas kreatiniazės pagalba hidrolizuojamas į kreatiną. Kreatinas hidrolizuojamas kreatinazės į sarkoziną ir karbamidą. Sarkozinas šioje reakcijoje oksiduojamas sarkozino oksidazės į gliciną ir formaldehidą, kartu pasigaminant vandenilio peroksidui. Susidaręs vandenilio peroksidas reaguoja su 4-aminoantipirinu ir N-etil-N-sulfopropil-m-toluidinu (ESPMT) dalyvaujant peroksidazei, kad susidarytų chinonoimino dažas. Gautas absorbcijos pokytis esant 548 nm bangos ilgiui yra proporcingas kreatinino koncentracijai mėginyje. Šis fermentinis metodas yra jautrus ir specifiškas kreatininui ir jam įtakos neturi endogeninės medžiagos, tokios kaip bilirubinas, cefalosporinas ir ketorūgštys, kurios turi įtakos *Jaffe* metodui.

5 lentelė. Kreatinino tyrimui naudotų metodų palyginimo schema

	<i>Jaffe</i>	Fermentinis
Mėginių kiekis	95	95
Reagentai:		
R1	Natrio hidroksidas (NaOH)	Good's buferis (gamintojas sudėties neatskleidžia), kreatinazė, sarkozino oksidazė, katalazė, ESPMT
R2	Pikro rūgštis	Good's buferis (gamintojas sudėties neatskleidžia), kreatininazė, peroksidazė, 4-aminoantipirinas
Laboratoriniai prietaisai	Abbott ARCHITECT <i>c8000</i>	Abbott ARCHITECT <i>c8000</i>
Kokybės kontrolė	„Liquid Assayed Multiqual“ partijos numeris 45790	„Liquid Assayed Multiqual“ partijos numeris 45790

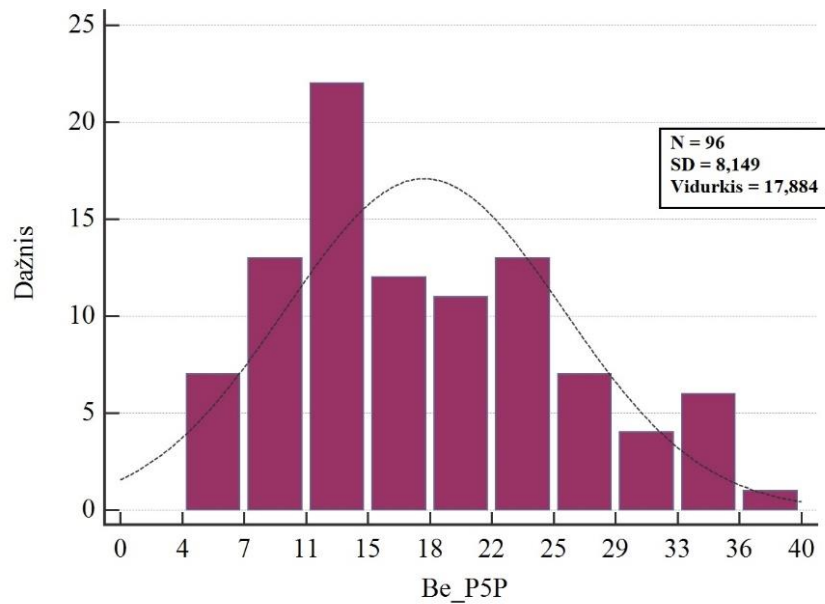
Statistinė analizė atlikta naudojantis R statistiniu paketu (*R Foundation*, versija 3.5.3, JAV), Excel (*Microsoft Office*, versija 14.0, JAV) bei Excel (Anders Kallner validuotas ANOVA metodas, versija 8.5, Švedija) ir MedCalc (*MedCalc.Ink*, versija 19.0, Belgija) programomis. Metodų suderinamumas analizuotas vertinant Bland-Altman ir *Passing-Bablok* analizes. Koreliacija tarp analizuojamų metodų nustatyta naudojant Pearsono koreliacijos koeficientą. Visi statistinės analizės rezultatai buvo laikomi statistiškai reikšmingais, jei p vertė $<0,05$.

4. TYRIMO REZULTATAI

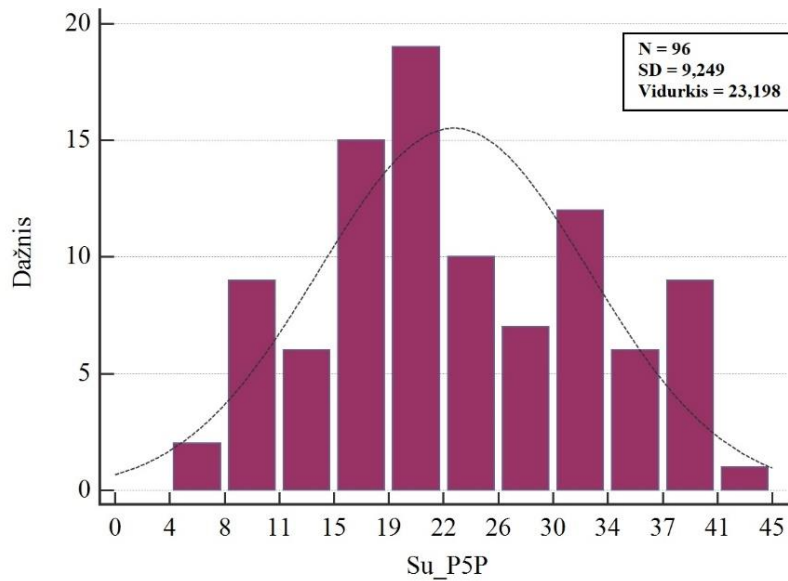
4.1 Alaninaminotransferazės tyrimo rezultatai

Rezultatų, gautų ALT be piridoksaliao 5'-fosfato metodu, intervalas buvo nuo 6 U/L iki 38 U/L, o intervalas rezultatų, gautų ALT su piridoksaliao 5'-fosfatu metodu, buvo nuo 6 U/L iki 43 U/L. Rezultatai gauti su P5P buvo didesni nei be P5P metodu gauti rezultatai. Taip yra todėl, kad P5P priedas prisotina ALT ir išmatuojamas pilnas jos aktyvumas.

ALT aktyvumo matavimai be piridoksaliao 5'-fosfato (13 pav.) ir su piridoksaliao 5'-fosfato metodu (14 pav.) pasiskirstę pagal Gauso skirstinį. Koreliacija tarp metodų buvo $r = 0,959$ ($p < 0,0001$).



13 pav. ALT be P5P aktyvumo rezultatų pasiskirstymas



14 pav. ALT su P5P aktyvumo rezultatų pasiskirstymas

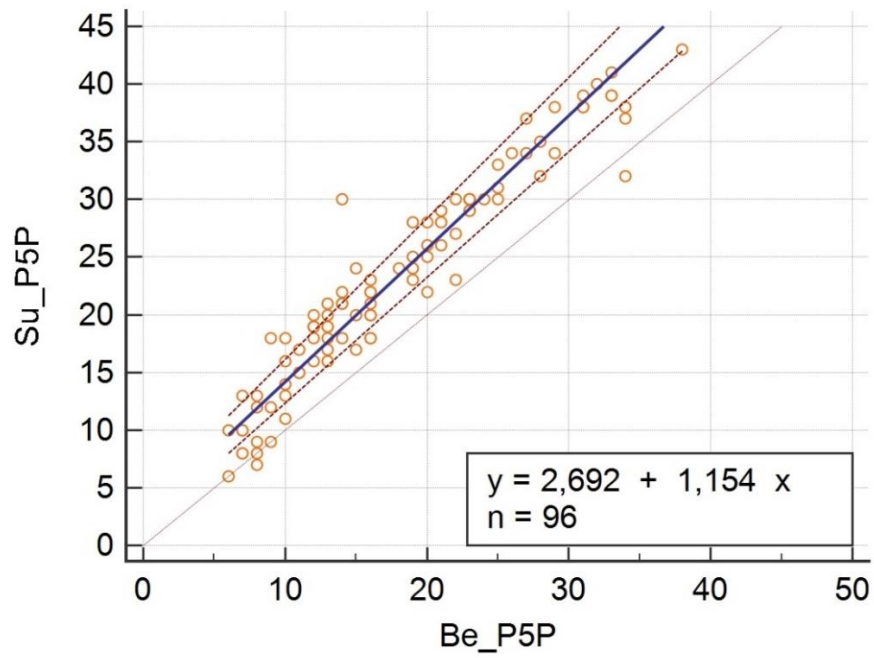
Metodai palyginti naudojant *Passing-Bablok* regresiją (*MedCalc* programa).

Pagal *Passing-Bablok* regresinę analizę, gauta regresijos lygtis $y = 2,692 + 1,154x$. Atkirta $A = 2,692$, jos 95 proc. pasikliautinis intervalas nuo 1,444 iki 3,909. 0 į šį intervalą nepatenka, tai rodo, jog gauta atkirta A reikšmingai skiriasi nuo 0 ($y = 1x + 0$). Vadinasi, tarp dviejų lyginamų ALT tyrimo metodų egzistuoja proporcinis skirtumas. Gautas nuolydis B yra lygus 1,154, o jo pasikliautinis intervalas yra nuo 1,091 iki 1,222. Į šį intervalą 1 nepatenka ir tai rodo, kad gautas nuolydis B reikšmingai skiriasi nuo 1 ($y = 1x + 0$). Tai reiškia, kad tarp dviejų lyginamų metodų egzistuoja sisteminis skirtumas.

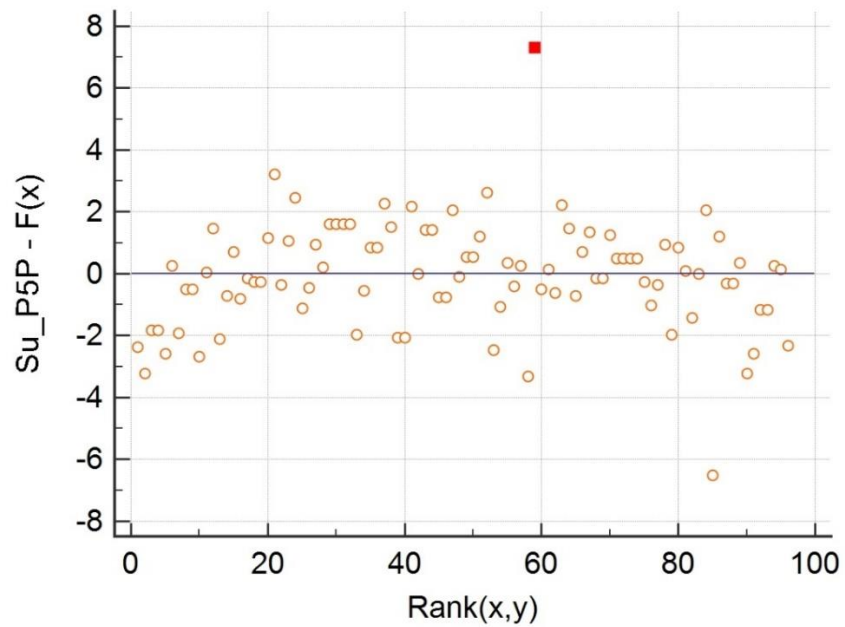
Tiesiškumas tarp dviejų metodų parodo, ar tarp jų egzistuoja tiesinė priklausomybė. Taikytas *Cusum* testas (*cumulative sum control chart*) rodo, jog nėra reikšmingo nukrypimo nuo tiesiškumo, p reikšmė yra didesnė nei 0,05 ($p = 0,14$). Vadinasi, tarp dviejų lyginamų metodų egzistuoja tiesinė priklausomybė.

6 lentelė. ALT aktyvumo nustatymo metodų palyginimas, naudojant *Passing-Bablok* regresiją

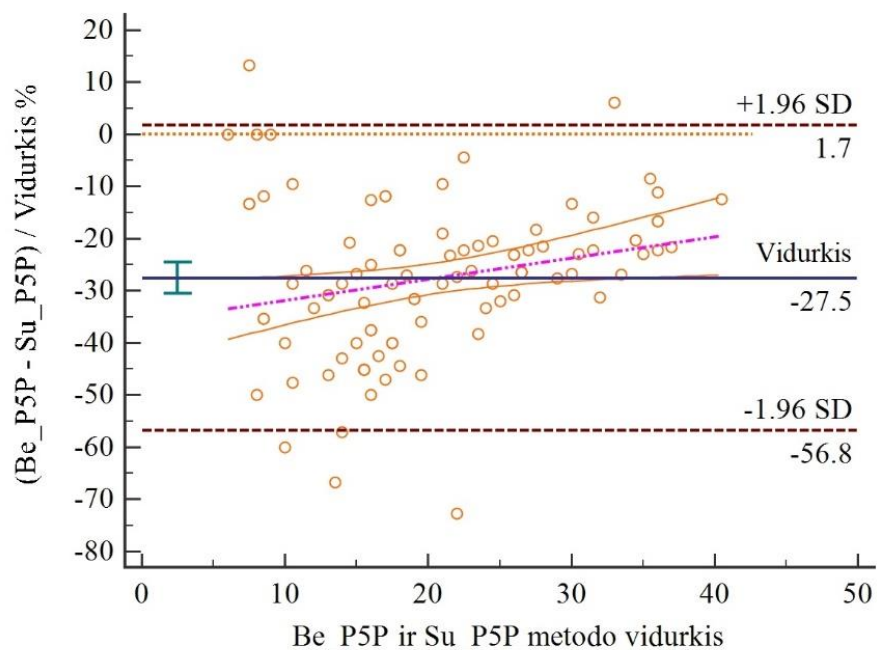
	Be P5P	Su P5P
Mažiausia reikšmė	6,000	6,000
Didžiausia reikšmė	38,000	43,000
Aritmetinis vidurkis	17,844	23,198
Mediana	16,000	22,000
Standartinis nuokrypis	8,149	9,249
Standartinė vidurkio paklaida	0,832	0,944
Sisteminiai skirtumai		
Atkirta A		2,692
95% Pasikliautinis intervalas		1,444 – 3,909
Proporciniai skirtumai		
Nuolydis B		1,154
95% Pasikliautinis intervalas		1,091 – 1,222
Atsitiktiniai skirtumai		
Likutinis standartinis nuokrypis (LSN)		1,765
± 1.96 LSN intervalas		-3,459 – 3,459
Tiesiškumas		
<i>Cusum</i> tiesiškumo testas	Nėra reikšmingo nukrypimo nuo tiesiškumo (P=0,14)	



15 pav. **Passing-Bablok regresija**: regresijos linija – mėlyna, regresijos linijos pasikliautinis intervalas – punktyrinės linijos, $x=y$ linija – violetinė linija



16 pav. **Paklaidų (residuals) išsidėstymas**



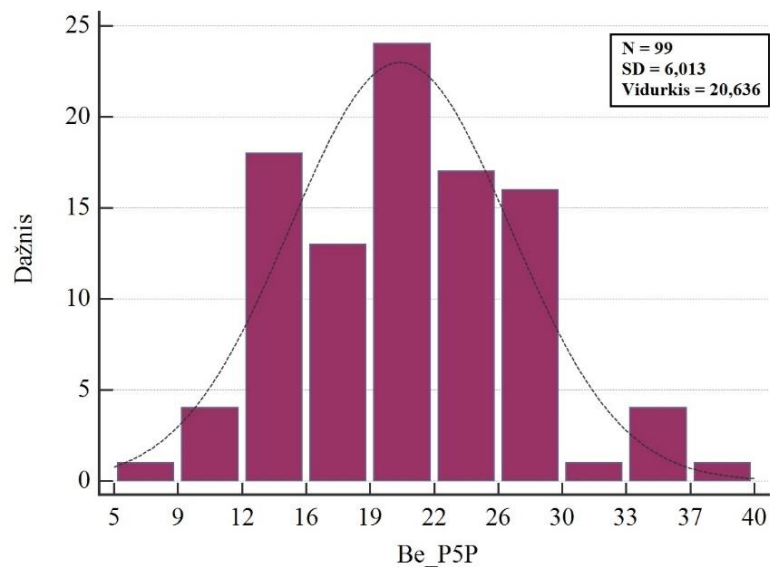
17 pav. **Bland-Altman diagrama** (x ašis – skirtumas tarp dviejų metodų matavimų (be P5P ir su P5P), y ašis – dviejų metodų procentinis vidurkis, violetinė linija – skirtumų regresijos linija)

Atlikus Bland-Altman analizę, matoma, kad skirtumo aritmetinis vidurkis lygus -27,541, jo 95 proc. pasikliautinis intervalas nuo 30,562 iki -24,519. Apatinė riba -56,769, 95 proc. pasikliautinis intervalas nuo -61,951 iki -51,588, viršutinė riba – 1,689, 95 proc. pasikliautinis intervalas nuo -3,493 iki 6,870. Pavaizduotoje diagramoje matoma, kad beveik visi taškai telpa į -1,96SD – +1,96SD ribas. Rezultatai statistiškai reikšmingi, nes $p < 0,05$ ($p = < 0,0001$).

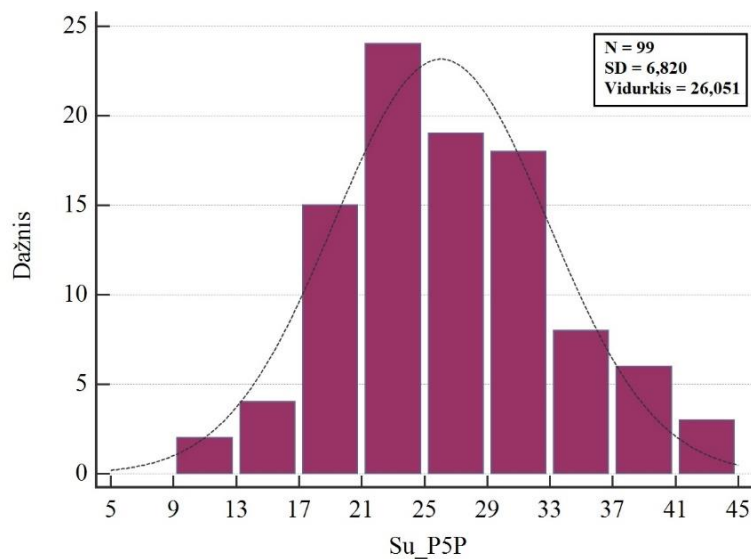
4.2 Aspartataminotransferazės tyrimo rezultatai

Rezultatų, gautų AST be piridoksolio 5'-fosfato metodu, intervalas buvo nuo 8 U/L iki 37 U/L, o intervalas rezultatų, gautų ALT su piridoksolio 5'-fosfatu metodu, buvo nuo 10 U/L iki 43 U/L. Rezultatai, gauti su P5P, buvo didesni nei be P5P metodu gauti rezultatai. Taip yra todėl, kad P5P priedas prisotina AST ir išmatuojamas pilnas jos aktyvumas.

AST aktyvumo matavimai be piridoksaliao 5'-fosfato (18 pav.) su piridoksaliao 5'-fosfato metodu (19 pav.) pasiskirstę pagal Gauso skirstinį. Koreliacija tarp metodų buvo $r = 0,937$ ($p < 0,0001$).



18 pav. AST be P5P aktyvumo rezultatų pasiskirstymas



19 pav. AST su P5P aktyvumo rezultatų pasiskirstymas

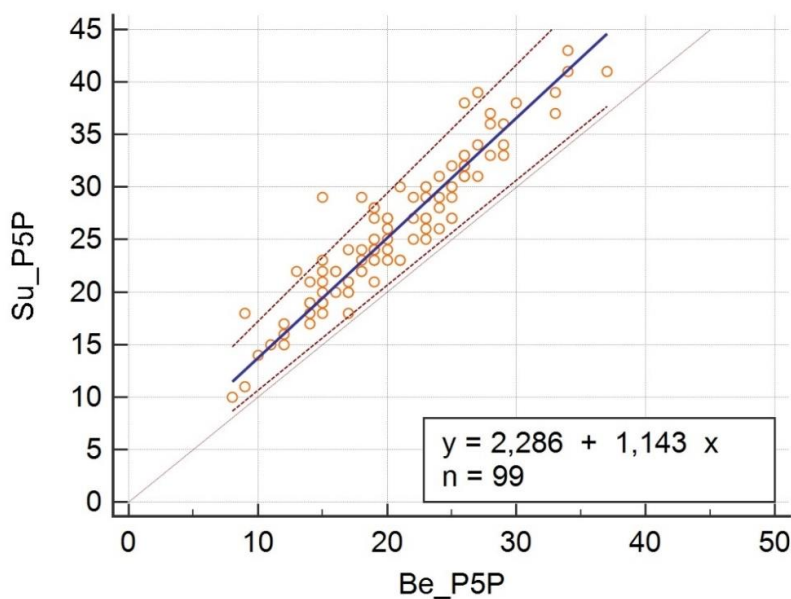
Metodai palyginti naudojant *Passing-Bablok* regresiją (*MedCalc* programa).

7 lentelė. AST aktyvumo nustatymo metodų palyginimas, naudojant *Passing-Bablok* regresiją

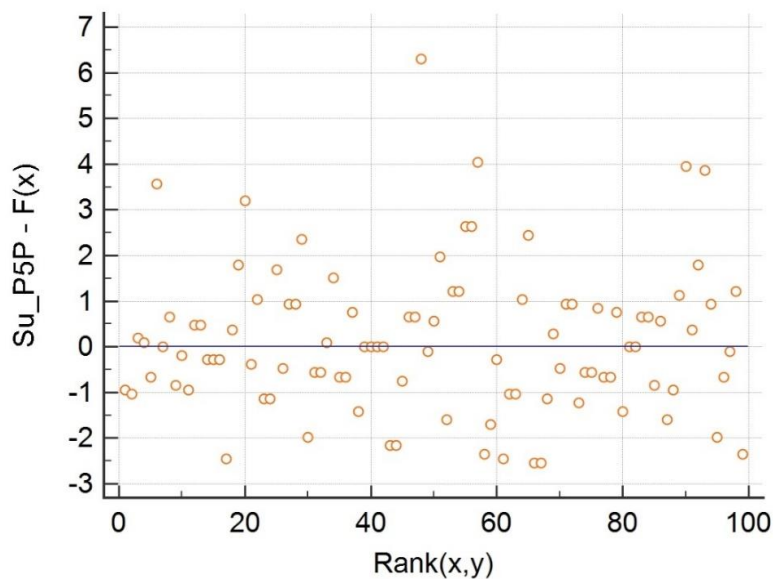
	Be P5P	Su P5P
Mažiausia reikšmė	8,000	10,000
Didžiausia reikšmė	37,000	43,000
Aritmetinis vidurkis	20,636	26,051
Mediana	20,000	25,000
Standartinis nuokrypis	6,013	6,820
Standartinė vidurkio paklaida	0,604	0,686
Sisteminiai skirtumai		
Atkirta A		2,286
95% Pasikliautinis intervalas		0,667 – 5,000
Proporciniai skirtumai		
Nuolydis B		1,143
95% Pasikliautinis intervalas		1,000 – 1,222
Atsitiktiniai skirtumai		
Likutinis standartinis nuokrypis (LSN)		1,610
± 1.96 LSN intervalas		-3,155 – 3,155
Tiesiškumas		
<i>Cusum</i> tiesiškumo testas	Nėra reikšmingo nukrypimo nuo tiesiškumo (P=0,99)	

Pagal *Passing-Bablok* regresinę analizę, gauta regresijos lygtis $y = 2,286 + 1,143x$. Atkirta $A = 2,259$, jos 95 proc. pasikliautinis intervalas nuo 0,667 iki 5,000. 0 į šį intervalą nepatenka, tai rodo, jog gauta atkirta A reikšmingai skiriasi nuo 0 ($y = 1x + 0$). Vadinasi, tarp dviejų lyginamų AST tyrimo metodų egzistuoja proporcinis skirtumas. Gautas nuolydis B yra lygus 1,143, o jo pasikliautinis intervalas yra nuo 1,000 iki 1,222. Į šį intervalą patenka 1 ir tai rodo, kad nėra reikšmingo skirtumo tarp gautos nuolydžio B reikšmės ir 1 ($y = 1x + 0$). Tai reiškia, kad tarp dviejų lyginamų metodų nėra reikšmingo sisteminio skirtumo.

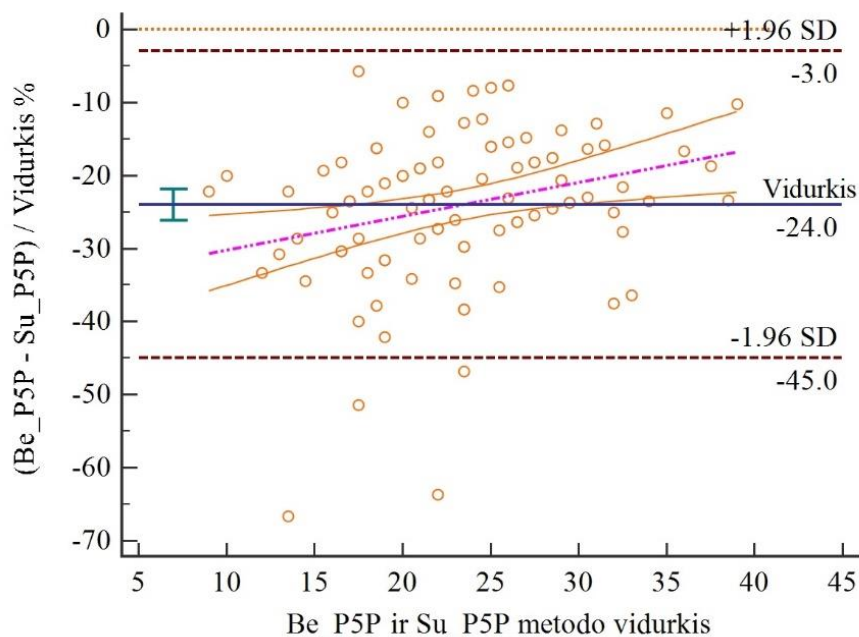
Tiesiškumas tarp dviejų metodų parodo, ar tarp jų egzistuoja tiesinė priklausomybė. Taikytas *Cusum* testas (*cumulative sum control chart*) rodo, jog nėra reikšmingo nukrypimo nuo tiesiškumo, p reikšmė yra didesnė nei 0,05 ($p=0,99$). Vadinasi, tarp dviejų lyginamų metodų egzistuoja tiesinė priklausomybė.



20 pav. *Passing-Bablok* regresija: regresijos linija – mėlyna, regresijos linijos pasikliautinis intervalas – punktyrinės linijos, $x=y$ linija – violetinė linija



21 pav. Paklaidų (residuals) išsidėstymas



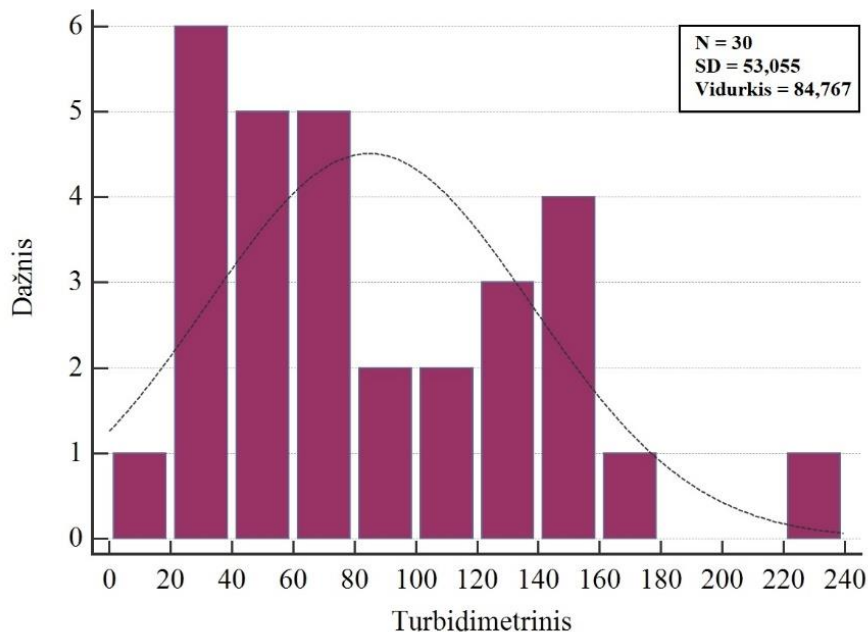
22 pav. **Bland-Altman diagrama** (x ašis – skirtumas tarp dviejų matavimo metodų (be P5P ir su P5P), y ašis – dviejų metodų procentinis vidurkis, violetinė linija – skirtumų regresijos linija)

Atlikus Bland-Altman analizę, matoma, kad skirtumo aritmetinis vidurkis lygus -23,977, jo 95 proc. pasikliautinis intervalas nuo -26,114 iki -21,841. Apatinė riba -44,972, 95 proc. pasikliautinis intervalas nuo -48,636 iki -41,309, viršutinė riba – -2,982, 95 proc. pasikliautinis intervalas nuo -6,646 iki 0,681. Pavaizduotoje diagramoje matoma, kad beveik visi taškai telpa į -1,96SD – +1,96SD ribas. Rezultatai statistiškai reikšmingi, nes $p < 0,05$ ($p = 0,0001$).

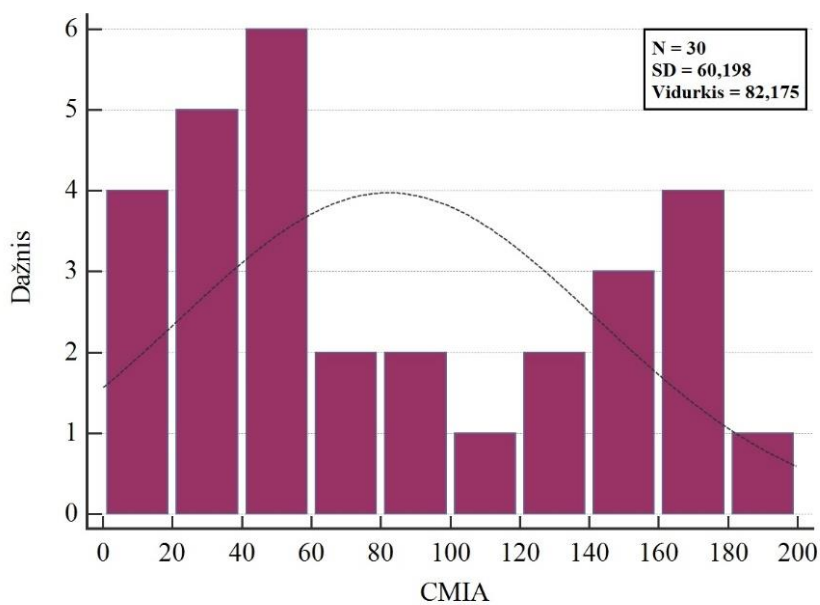
4.3 Feritino tyrimo rezultatai

Rezultatų, gautų turbidimetriniu metodu, intervalas buvo nuo 16,7 $\mu\text{g/l}$ iki 229 $\mu\text{g/l}$, o intervalas rezultatų, gautų CMIA metodu, buvo nuo 5,94 $\mu\text{g/l}$ iki 186,24 $\mu\text{g/l}$. Rezultatai, gauti CMIA metodu, buvo mažesni nei turbidimetriniu metodu gauti rezultatai.

Feritino koncentracijos matavimai turbidimetriniu (23 pav.) metodu ir mikrodalelių chemiluminescencinės imunoanalizės metodu (24 pav.) pasiskirstę pagal Gauso skirstinį. Koreliacija tarp metodų buvo $r = 0,851$ ($p < 0,0001$).



23 pav. Feritino koncentracijos matavimų pasiskirstymas turbidimetriniu metodu



24 pav. Feritino koncentracijos matavimų pasiskirstymas CMIA metodu

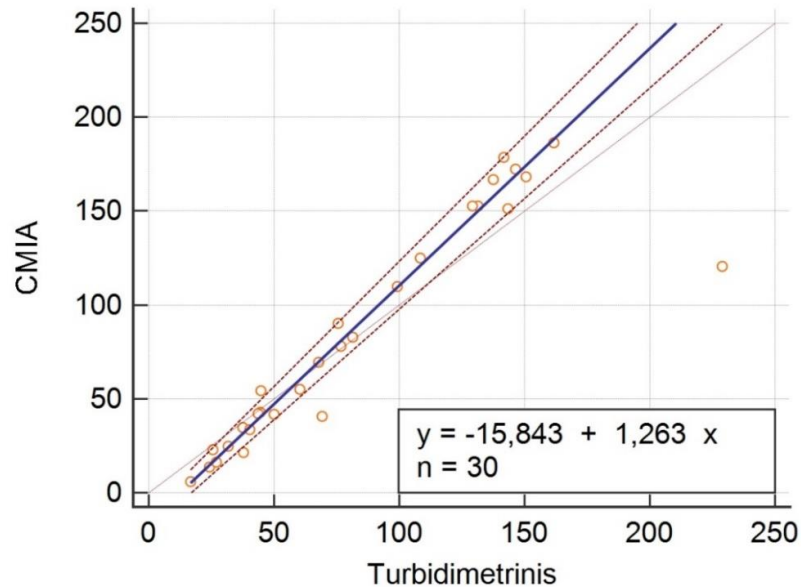
Metodai palyginti naudojant *Passing-Bablok* regresiją (*MedCalc* programa).

8 lentelė. Feritino koncentracijos nustatymo metodų palyginimas, naudojant *Passing-Bablok* regresiją

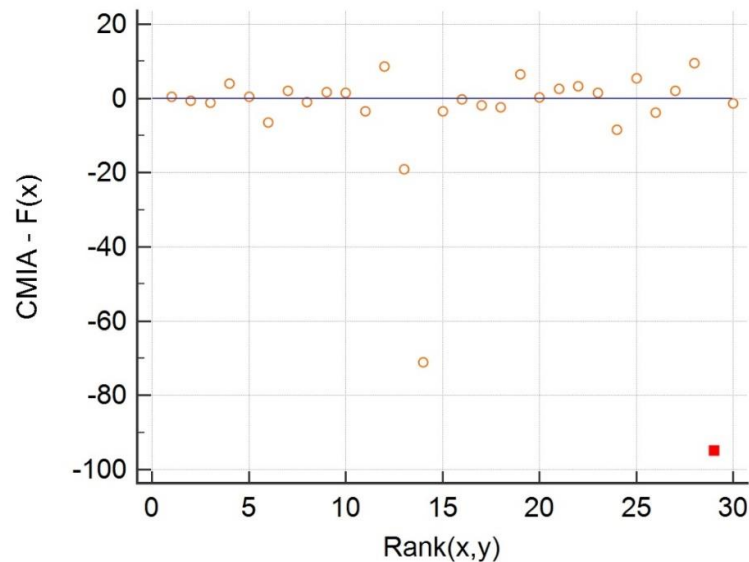
	Turbidimetrinis	CMIA
Mažiausia reikšmė	16,700	5,940
Didžiausia reikšmė	229,000	186,240
Aritmetinis vidurkis	84,767	82,175
Mediana	72,300	62,235
Standartinis nuokrypis	53,055	60198
Standartinė vidurkio paklaida	9,686	10,991
Sisteminiai skirtumai		
Atkirta A		-15,843
95% Pasikliautinis intervalas		-20,508 – -10,011
Proporciniai skirtumai		
Nuolydis B		1,263
95% Pasikliautinis intervalas		1,179 – 1,332
Atsitiktiniai skirtumai		
Likutinis standartinis nuokrypis (LSN)		23,050
± 1.96 LSN intervalas		-45,178 – 45,178
Tiesiškumas		
<i>Cusum</i> tiesiškumo testas	Nėra reikšmingo nukrypimo nuo tiesiškumo (P=0,63)	

Pagal *Passing-Bablok* regresinę analizę, gauta regresijos lygtis $y = 15,843 + 1,263x$. Atkirta A = -15,843, jos 95 proc. pasikliautinis intervalas nuo -20,508 iki -10,011. 0 į šį intervalą nepatenka, tai rodo, jog gauta atkirta A reikšmingai skiriasi nuo 0 ($y = 1x + 0$). Vadinasi, tarp dviejų lyginamų feritino tyrimo metodų egzistuoja proporcinis skirtumas. Gautas nuolydis B yra lygus 1,263, o jo pasikliautinis intervalas yra nuo 1,179 iki 1,332. Į šį intervalą 1 nepatenka ir tai rodo, kad gautas nuolydis B reikšmingai skiriasi nuo 1 ($y = 1x + 0$). Tai reiškia, kad tarp dviejų lyginamų metodų egzistuoja sisteminis skirtumas.

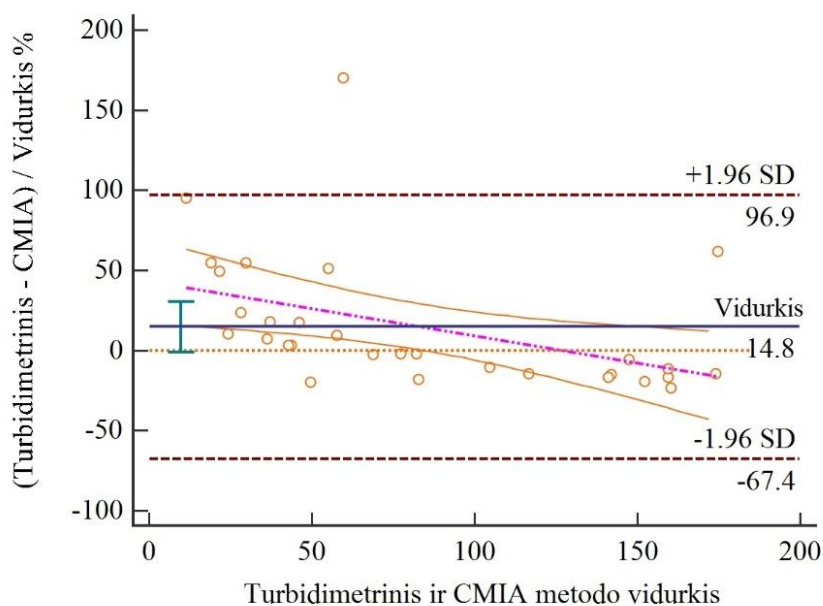
Tiesiškumas tarp dviejų metodų parodo, ar tarp jų egzistuoja tiesinė priklausomybė. Taikytas *Cusum* testas (*cumulative sum control chart*) rodo, jog nėra reikšmingo nukrypimo nuo tiesiškumo, p reikšmė yra didesnė nei 0,05 ($p=0,63$). Vadinasi, tarp dviejų lyginamų metodų egzistuoja tiesinė priklausomybė.



25 pav. *Passing-Bablok* regresija: regresijos linija – mėlyna, regresijos linijos pasikliautinis intervalas – punktyrinės linijos, $x=y$ linija – violetinė linija



26 pav. Paklaidų (*residuals*) išsidėstymas



27 pav. **Bland-Altman diagrama** (x ašis – skirtumas tarp dviejų metodų matavimų (turbidimetris ir CMIA), y ašis – dviejų metodų procentinis vidurkis, violetinė linija – skirtumų regresijos linija)

Atlikus Bland-Altman analizę, matoma, kad skirtumo aritmetinis vidurkis lygus 14,754, jo 95 proc. pasikliautinis intervalas nuo -0,896 iki 30,403. Apatinė riba -67,390, 95 proc. pasikliautinis intervalas nuo -94,437 iki -40,343, viršutinė riba – 96,898, 95 proc. pasikliautinis intervalas nuo 69,850 iki 123,945. Pavaizduotoje diagramoje matoma, kad tik vienas taškas netelpa į -1,96SD – +1,96SD ribas. Rezultatai statistiškai nereikšmingi, nes $p > 0,05$ ($p = 0,064$).

Feritino tyrimo rezultatai buvo suskirstyti į intervalus siekiant įvertinti, kaip skiriasi gauti rezultatai naujuoju CMIA metodu, lyginant su senuoju turbidimetriniu metodu (9 lentelė).

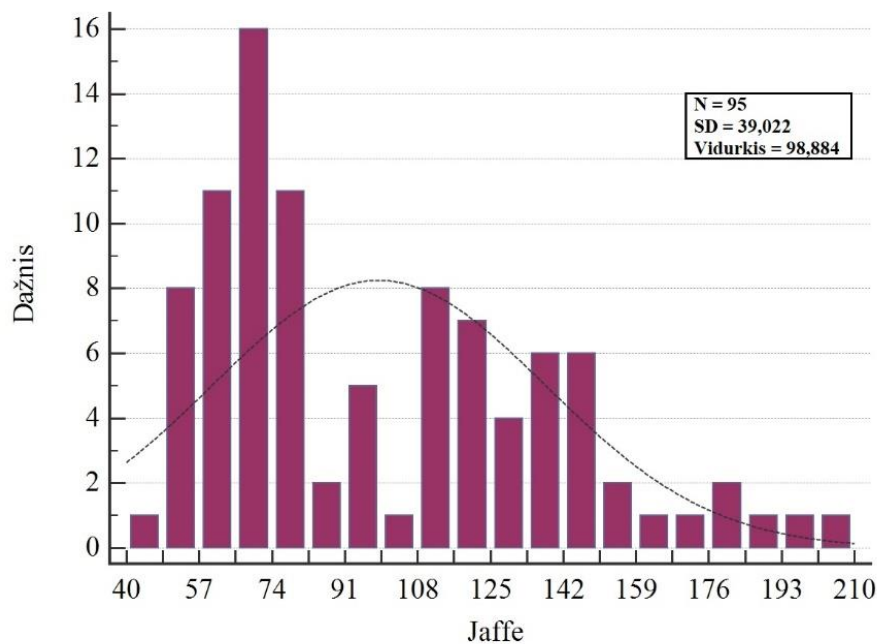
9 lentelė. **Feritino reikšmių poslinkis, tiriant CMIA metodu**

Feritino reikšmių intervalas, $\mu\text{g/l}$	Analizuotų pacientų mėginių skaičius (n)	Feritino reikšmių CMIA metodu poslinkis, %	Reikšmingumas (p vertė)
Iki 100	19	-24,8	0,097
100 ir daugiau	11	6,5	0,48

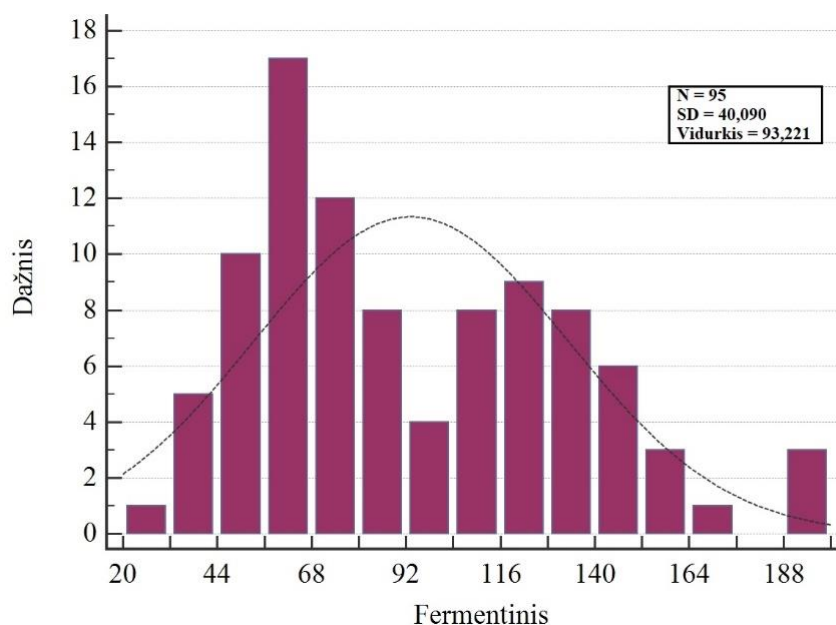
4.4 Kreatinino tyrimo rezultatai

Rezultatų, gautų modifikuotu *Jaffe* metodu, intervalas buvo nuo 48 $\mu\text{mol/l}$ iki 206 $\mu\text{mol/l}$, o intervalas rezultatų, gautų fermentiniu metodu, buvo nuo 31 $\mu\text{mol/l}$ iki 199 $\mu\text{mol/l}$. Rezultatai, gauti fermentiniu metodu, buvo mažesni nei modifikuotu *Jaffe* metodu gauti rezultatai. Taip gali būti todėl, kad fermentinis metodas mažiau reaguoja į įvairias trukdančias medžiagas mėginyje, todėl gaunami tikslesni kreatinino rezultatai.

Kreatinino koncentracijos matavimai modifikuotu *Jaffe* metodu (28 pav.) ir fermentiniu metodu (29 pav.) pasiskirstę pagal Gauso skirstinį. Koreliacija tarp metodų buvo $r = 0,984$ ($p < 0,0001$).



28 pav. Kreatinino koncentracijos matavimų pasiskirstymas *Jaffe* metodu



29 pav. Kreatinino koncentracijos matavimų pasiskirstymas fermentiniu metodu

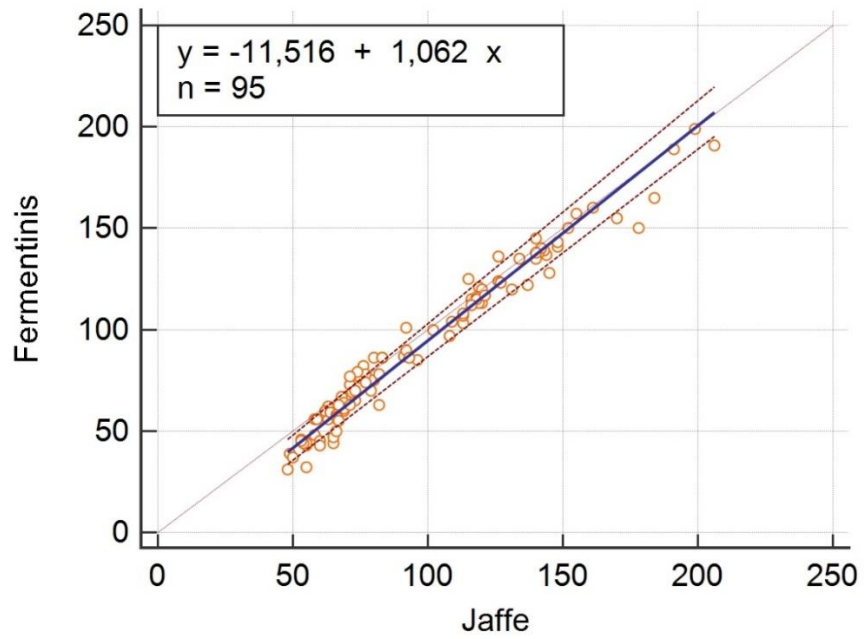
Metodai palyginti naudojant *Passing-Bablok* regresiją (*MedCalc* programa).

Pagal *Passing-Bablok* regresinę analizę gauta regresijos lygtis $y = 11,516 + 1,062x$. Atkirta $A = -11,516$, jos 95 proc. pasikliautinis intervalas nuo 15,400 iki -6,882. 0 į šį intervalą nepatenka, tai rodo, jog gauta atkirta A reikšmingai skiriasi nuo 0 ($y = 1x + 0$). Vadinasi, tarp dviejų lyginamų feritino tyrimo metodų egzistuoja proporcinis skirtumas. Gautas nuolydis B yra lygus 1,062, o jo pasikliautinis intervalas yra nuo 1,024 iki 1,100. Į šį intervalą 1 nepatenka ir tai rodo, kad gautas nuolydis B reikšmingai skiriasi nuo 1 ($y = 1x + 0$). Tai reiškia, kad tarp dviejų lyginamų metodų egzistuoja sisteminis skirtumas.

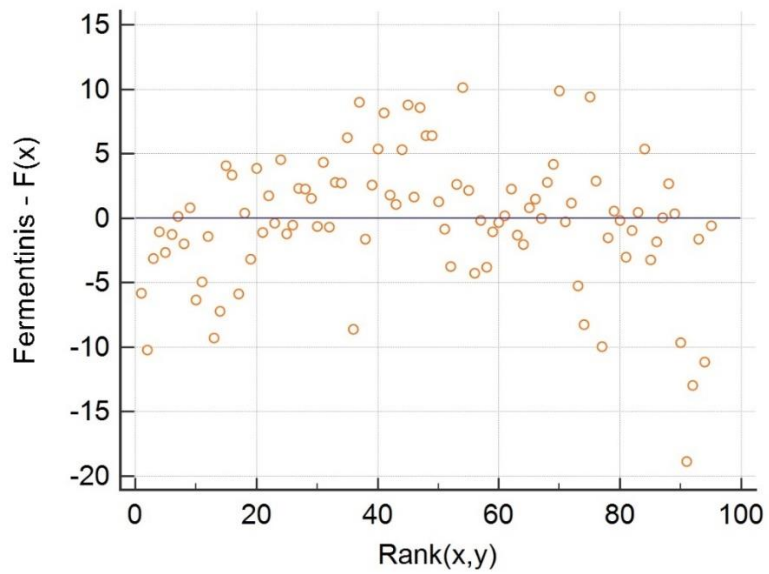
Tiesiškumas tarp dviejų metodų parodo, ar tarp jų egzistuoja tiesinė priklausomybė. Taikytas *Cusum* testas (*cumulative sum control chart*) rodo, jog nėra reikšmingo nukrypimo nuo tiesiškumo, p reikšmė yra didesnė nei 0,05 ($p = 0,22$). Vadinasi, tarp dviejų lyginamų metodų egzistuoja tiesinė priklausomybė.

10 lentelė. Kreatinino koncentracijos nustatymo metodų palyginimas, naudojant *Passing-Bablok* regresiją

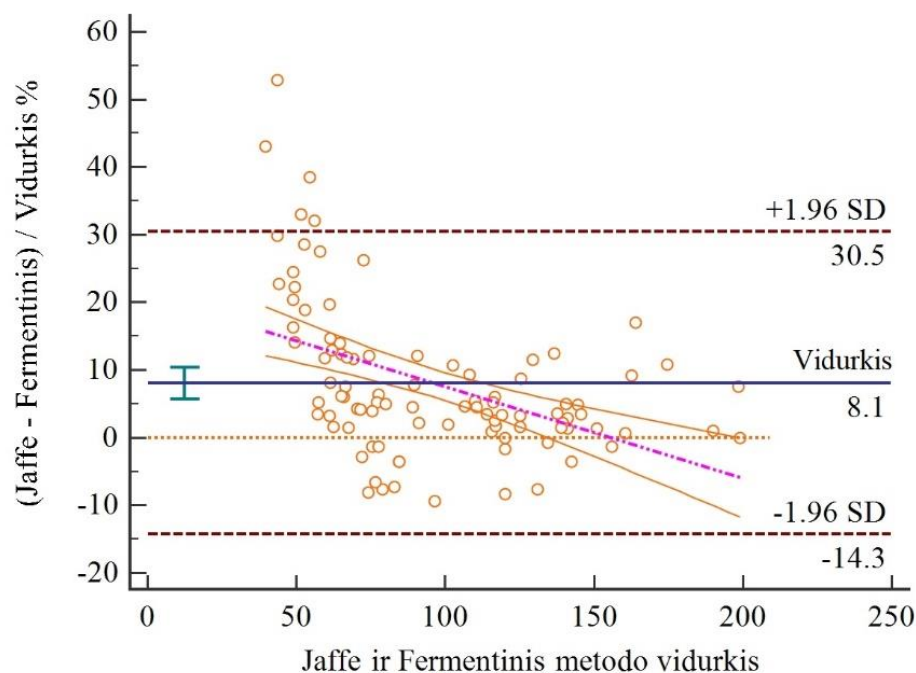
	<i>Jaffe</i>	Fermentinis
Mažiausia reikšmė	48,000	31,000
Didžiausia reikšmė	206,000	199,000
Aritmetinis vidurkis	98,884	93,221
Mediana	83,000	86,000
Standartinis nuokrypis	39,0212	40,090
Standartinė vidurkio paklaida	4,004	4,113
Sisteminiai skirtumai		
Atkirta A		-11,516
95% Pasikliautinis intervalas		-15,400 – -6,882
Proporciniai skirtumai		
Nuolydis B		1,062
95% Pasikliautinis intervalas		1,024 – 1,100
Atsitiktiniai skirtumai		
Likutinis standartinis nuokrypis (LSN)		5,179
± 1.96 LSN intervalas		-10,151 – 10,151
Tiesiškumas		
<i>Cusum</i> tiesiškumo testas	Nėra reikšmingo nukrypimo nuo tiesiškumo (P=0,22)	



30 pav. *Passing-Bablok regresija*: regresijos linija – mėlyna, regresijos linijos pasikliautinis intervalas – punktyrinės linijos, $x=y$ linija – violetinė linija



31 pav. *Paklaidų (residuals) išsidėstymas*



32 pav. **Bland-Altman diagrama** (x ašis – skirtumas tarp dviejų metodų matavimų (*Jaffe* ir fermentinis), y ašis – dviejų metodų procentinis vidurkis, violetinė linija – skirtumų regresijos linija)

Atlikus Bland-Altman analizę, matoma, kad skirtumo aritmetinis vidurkis lygus 8,064, jo 95 proc. pasikliautinis intervalas nuo 5,736 iki 10,392. Apatinė riba -14,335, 95 proc. pasikliautinis intervalas nuo -18,328 iki -10,343, viršutinė riba – 30,463, 95 proc. pasikliautinis intervalas nuo 26,470 iki 34,455. Pavaizduotoje diagramoje matoma, kad beveik visi taškai telpa į -1,96SD – +1,96SD ribas. Rezultatai statistiškai reikšmingi, nes $p < 0,05$ ($p = < 0,0001$).

Pagal gautus kreatinino tyrimo rezultatus buvo apskaičiuojamas glomerulų filtracijos greitis naudojantis CKD-EPI lygtimi (angl. *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*) bei gauti rezultatai suskirstyti į intervalus pagal CKD klasifikacijos sistemą. eGFR rezultatai tiriant fermentiniu kreatinino metodu yra nežymiai didesni nei tiriant *Jaffe* kreatinino metodu (11 lentelė).

11 lentelė. Apskaičiuojamo glomerulų filtracijos greičio [eGFR (CKD-EPI)] poslinkis

eGFR reikšmių intervalas, ml/min/1,73 m ²	Analizuotų pacientų mėginių skaičius (n)	eGFR reikšmių fermentiniu metodu poslinkis, %	Reikšmingumas (p vertė)
15 – 30	4	8,7	0,044
30 – 60	32	3,6	0,003
60 – 90	21	3,4	0,013

Skiriasi ir kreatinino rezultatai, gauti naujuoju fermentiniu kreatinino matavimo metodu, lyginant su senuoju modifikuotu *Jaffe* metodu (12 lentelė).

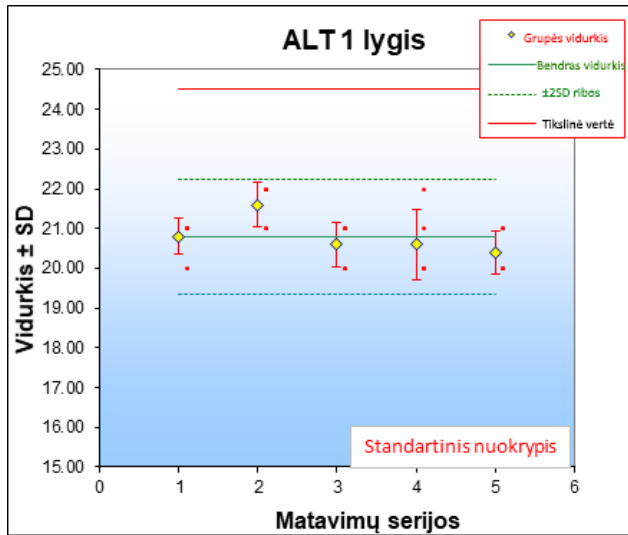
12 lentelė. Kreatinino reikšmių poslinkis tiriant fermentiniu metodu

Kreatinino reikšmių intervalas, μmol/l	Analizuotų pacientų mėginių skaičius (n)	Kreatinino reikšmių fermentiniu metodu poslinkis, %	Reikšmingumas (p vertė)
48 – 115	47	-5,9	<0,0001
115 – 300	29	-3,5	0,001

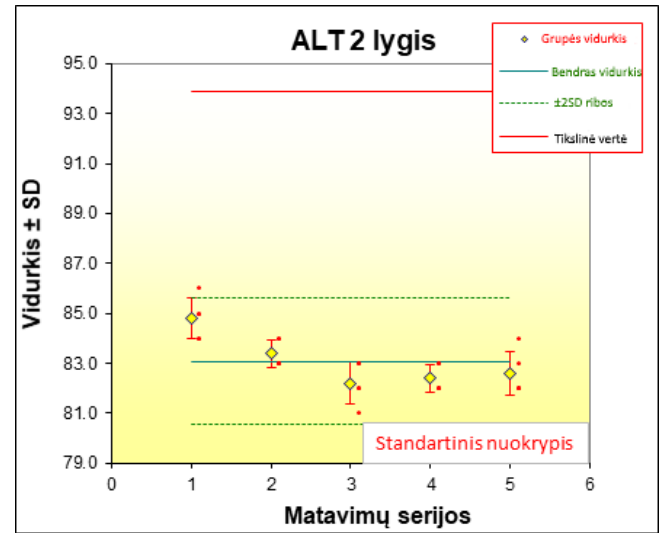
4.5 Rezultatų neglaudumo įvertinimas

ALT, AST, feritino ir kreatinino metodų glaudumo duomenys buvo įvertinti naudojant dispersijos komponentų analizę. Skaičiavimas grindžiamas kvadratų ir vidurkio kvadratų sumomis, kurios gali būti gautos vienfaktorine dispersine analize (angl. *One-way ANOVA*).

Alaninaminotferzė



33 pav. Grafinis ALT 1 lygio kontrolinės medžiagos neįlaudumo duomenų pavaizdavimas



34 pav. Grafinis feritino 1 lygio kontrolinės medžiagos neįlaudumo duomenų pavaizdavimas

33 paveiksle pavaizduotame grafike matoma, kad visų matavimų serijų rezultatai telpa į nustatytas $\pm 2SD$ ribas. Matavimų rezultatai yra mažesni, nei kontrolinių medžiagų apraše nurodyta tikslinė vertė (angl. *target value*), kuri yra 24,5 U/L, o mūsų matavimų rezultatų gautas aritmetinis vidurkis buvo 20,8 U/L, tačiau mūsų matavimai tenkina kontrolinių medžiagų apraše nurodytą matavimo verčių intervalą, kuris yra 15,3 – 33,7 U/L.

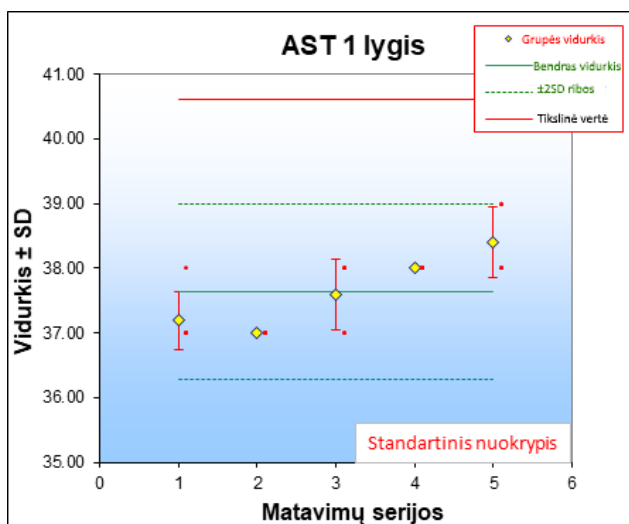
34 paveiksle pavaizduotame grafike matoma, kad pirmos serijos vienas matavimas netelpa į nustatytas $\pm 2SD$ ribas. Matavimų serijų rezultatai yra mažesni nei kontrolinių medžiagų apraše nurodyta tikslinė vertė, kuri yra 93,9 U/L, o mūsų matavimais gautų rezultatų aritmetinis vidurkis buvo 83,08 U/L, tačiau mūsų matavimai tenkina kontrolinių medžiagų apraše nurodytą matavimo verčių intervalą, kuris yra 78,5 – 109 U/L.

13 lentelė. ALT dispersijos komponentų analizės rezultatai

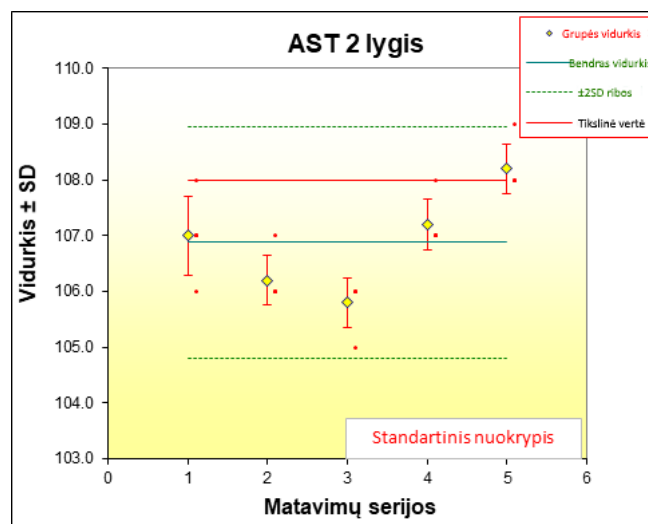
1 lygio kontrolė				2 lygio kontrolė				Neglaudumas pagal Westgard biologinės variacijos modelį
Gautas rezultatų neglaudumas tarp matavimų	Gautas rezultatų neglaudumas tarp dienų	Gamintojo deklaruotas rezultatų neglaudumas tarp matavimų	Gamintojo deklaruotas rezultatų neglaudumas tarp dienų	Gautas rezultatų neglaudumas tarp matavimų	Gautas rezultatų neglaudumas tarp dienų	Gamintojo deklaruotas rezultatų neglaudumas tarp matavimų	Gamintojo deklaruotas rezultatų neglaudumas tarp dienų	
1,9	1,6	1,2	1,8	0,6	1,1	0,5	1,7	9,7
–	–	Nepriimtina (p=0,002)	Priimtina (p=0,525)	–	–	Nepriimtina (p=0,232)	Priimtina (p=0,018)	

Atlikus ALT kontrolinių medžiagų neglaudumo analizę nustatyta, kad pirmo lygio kontrolinės medžiagos neglaudumas tarp matavimų (CV 1,9 proc.) netenkina gamintojo deklaruojamos vertės (CV 1,2 proc.). Antro lygio kontrolinės medžiagos gautas neglaudumo variacijos koeficientas 0,6 proc. irgi neatitinka gamintojo deklaruotos 0,5 proc. CV vertės.

Aspartataminotransferazė



35 pav. Grafinis AST 1 lygio kontrolinės medžiagos neįlaudumo duomenų pavaizdavimas



36 pav. Grafinis AST 2 lygio kontrolinės medžiagos neįlaudumo duomenų pavaizdavimas

35 paveiksle pavaizduotame grafike matoma, kad penktos matavimų serijos du matavimai nežymiai viršija nustatytas $\pm 2SD$ ribas. Matavimų rezultatai yra mažesni nei kontrolinių medžiagų apraše nurodyta tikslinė vertė, kuri yra 40,6 U/L, o mūsų matavimų serijų rezultatų aritmetinis vidurkis buvo 37,64 U/L, tačiau mūsų matavimai tenkina kontrolinių medžiagų apraše nurodytą matavimo verčių intervalą, kuris yra 35,6 – 45,7 U/L.

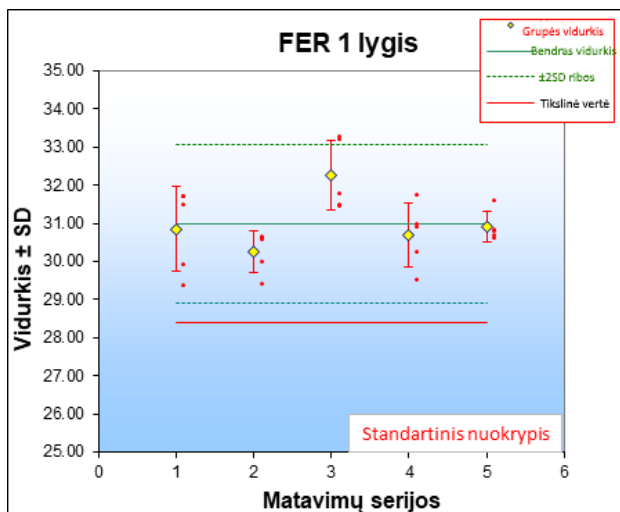
36 paveiksle pavaizduotame grafike matoma, kad penktos matavimų serijos vienas matavimas nežymiai viršija nustatytas $\pm 2SD$ ribas. 1-4 matavimų serijos rezultatai yra mažesni nei kontrolinių medžiagų apraše nurodyta tikslinė vertė, kuri yra 108 U/L, o penktos matavimų serijos gautas rezultatų aritmetinis vidurkis (108,2 U/L) viršija nustatytą tikslinę vertę, tačiau visi matavimai tenkina kontrolinių medžiagų apraše nurodytą matavimo verčių intervalą, kuris yra 95,5 – 120 U/L.

14 lentelė. AST dispersijos komponentų analizės rezultatai

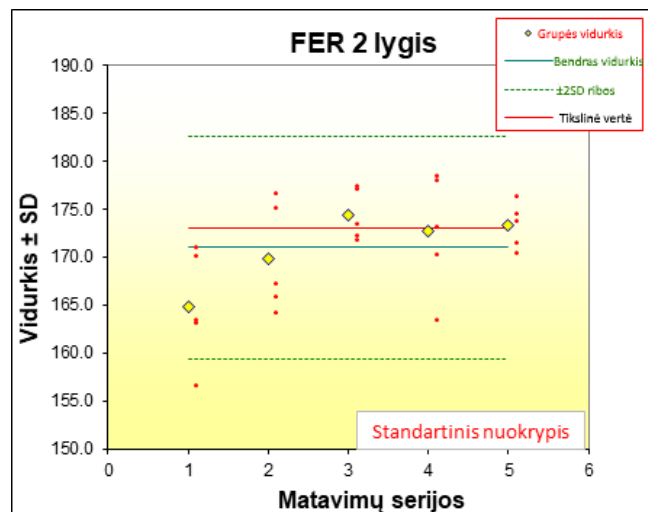
1 lygio kontrolė				2 lygio kontrolė				Neglaudumas pagal Westgard biologinės variacijos modelį
Gautas rezultatų neglaudumas tarp matavimų	Gautas rezultatų neglaudumas tarp dienų	Gamintojo deklaruotas rezultatų neglaudumas tarp matavimų	Gamintojo deklaruotas rezultatų neglaudumas tarp dienų	Gautas rezultatų neglaudumas tarp matavimų	Gautas rezultatų neglaudumas tarp dienų	Gamintojo deklaruotas rezultatų neglaudumas tarp matavimų	Gamintojo deklaruotas rezultatų neglaudumas tarp dienų	
1,1	1,4	2,5	3,7	0,5	0,8	0,6	0,6	6,15
–	–	Priimtina (p<0,0001)	Priimtina (p<0,0001)	–	–	Priimtina (p=0,315)	Nepriimtina (p=0,060)	

AST pirmo lygio kontrolinės medžiagos matavimų rezultatai yra priimtini gamintojo deklaruojamoms vertėms, tačiau antro lygio kontrolinės medžiagos matavimai tarp dienų netenkina gamintojo deklaruojamų rezultatų. Gautas variacijos koeficiento (CV) rezultatas 0,8 proc. yra didesnis nei gamintojo deklaruojama 0,6 proc. vertė.

Feritinas



37 pav. Grafinis feritino 1 lygio kontrolinės medžiagos neįlaidumo duomenų pavaizdavimas



38 pav. Grafinis feritino 2 lygio kontrolinės medžiagos neįlaidumo duomenų pavaizdavimas

37 paveiksle pavaizduotame grafike matoma, kad trečios matavimų serijos du matavimai nepatenka į nustatytas $\pm 2SD$ ribas. Atliktų feritino matavimų rezultatai viršija kontrolinių medžiagų apraše nurodytą tikslinę vertę, kuri yra $28,4 \mu\text{g/l}$, o mūsų matavimų serijomis gautų rezultatų aritmetinis vidurkis buvo $30,99 \mu\text{g/l}$, tačiau mūsų matavimai tenkina kontrolinių medžiagų apraše nurodytą matavimo verčių intervalą, kuris yra $19,9 - 36,9 \mu\text{g/l}$.

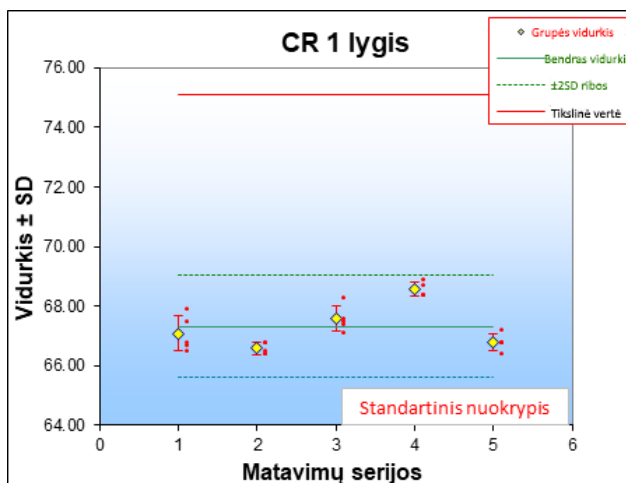
Iš 38 paveiksle pavaizduoto grafiko matoma, kad pirmos matavimų serijos vienas matavimas nepatenka į nustatytas $\pm 2SD$ ribas. Taip pat matavimų serijų, išskyrus pirmąją matavimų seriją, rezultatai viršija kontrolinių medžiagų aprašuose nurodytą tikslinę vertę, kuri yra $173 \mu\text{g/l}$, tačiau mūsų matavimai tenkina kontrolinių medžiagų apraše nurodytą matavimo verčių intervalą, kuris yra $138 - 207 \mu\text{g/l}$.

15 lentelė. Feritino dispersijos komponentų analizės rezultatai

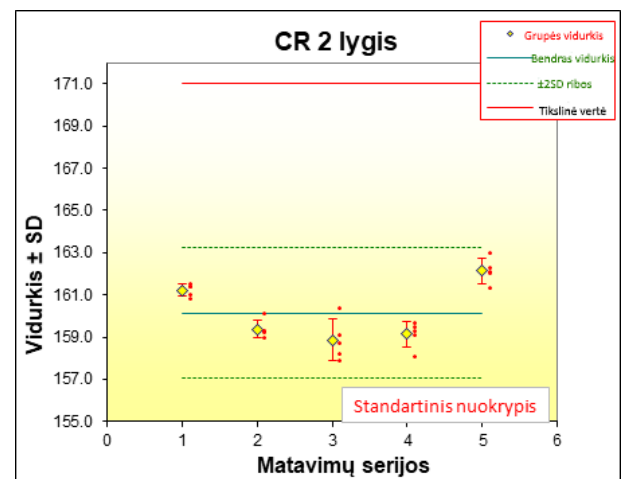
1 lygio kontrolė				2 lygio kontrolė				Neglaudumas pagal Westgard biologinės variacijos modelį
Gautas rezultatų neglaudumas tarp matavimų	Gautas rezultatų neglaudumas tarp dienų	Gamintojo deklaruotas rezultatų neglaudumas tarp matavimų	Gamintojo deklaruotas rezultatų neglaudumas tarp dienų	Gautas rezultatų neglaudumas tarp matavimų	Gautas rezultatų neglaudumas tarp dienų	Gamintojo deklaruotas rezultatų neglaudumas tarp matavimų	Gamintojo deklaruotas rezultatų neglaudumas tarp dienų	
2,6	2,1	3,6	4,3	2,8	1,9	4,8	6,4	7,1
–	–	Priimtina (p=0,074)	Priimtina (p=0,0002)	–	–	Priimtina (p=0,004)	Priimtina (p<0,0001)	

Atlikto tyrimo metu pirmo ir antro lygio feritino kontrolinės medžiagos tenkino gamintojo deklaruojamas variacijos koeficiento vertes tiek tarp matavimų (CV 2,6 proc. ir 2,8 proc.), tiek tarp skirtingų matavimo dienų (CV 2,1 proc. ir 1,9 proc.).

Kreatininas



39 pav. Grafinis kreatinino 1 lygio kontrolinės medžiagos neglaudumo duomenų pavaizdavimas



40 pav. Grafinis kreatinino 2 lygio kontrolinės medžiagos neglaudumo duomenų pavaizdavimas

39 paveiksle pavaizduotame grafike matoma, kad visų matavimų serijų rezultatai telpa į nustatytas $\pm 2SD$ ribas. Tačiau kreatinino 1 lygio kontrolinės medžiagos matavimų rezultatai yra mažesni už kontrolinių medžiagų aprašuose nurodytą tikslinę vertę, kuri yra 75,1 $\mu\text{mol/l}$, o mūsų atliktų matavimų serijų aritmetinis vidurkis buvo 67,32 $\mu\text{mol/l}$. Tačiau mūsų matavimai tenkina kontrolinių medžiagų apraše nurodytą matavimo verčių intervalą, kuris yra 60,1 – 89,3 $\mu\text{mol/l}$.

40 paveiksle pavaizduotame grafike matoma, kad, kaip ir 1 lygio kreatinino kontrolinių medžiagų, taip ir 2 lygio kontrolinių medžiagų matavimų serijų rezultatai telpa į nustatytas $\pm 2SD$ ribas. Tačiau, kaip ir 1 lygio kontrolinių medžiagų, 2 lygio matavimų serijų rezultatai yra mažesni už kontrolinių medžiagų aprašuose nurodytą tikslinę vertę, kuri yra 171 $\mu\text{mol/l}$, o mūsų matavimų serijų rezultatų aritmetinis vidurkis buvo 160,15 $\mu\text{mol/l}$, tačiau mūsų matavimai tenkina kontrolinių medžiagų apraše nurodytą matavimo verčių intervalą, kuris yra 137 – 205 $\mu\text{mol/l}$.

16 lentelė. **Kreatinino dispersijos komponentų analizės rezultatai**

1 lygio kontrolė				2 lygio kontrolė				Neglaudumas pagal Westgard biologinės variacijos modelį
Gautas rezultatų neglaudumas tarp matavimų	Gautas rezultatų neglaudumas tarp dienų	Gamintojo deklaruotas rezultatų neglaudumas tarp matavimų	Gamintojo deklaruotas rezultatų neglaudumas tarp dienų	Gautas rezultatų neglaudumas tarp matavimų	Gautas rezultatų neglaudumas tarp dienų	Gamintojo deklaruotas rezultatų neglaudumas tarp matavimų	Gamintojo deklaruotas rezultatų neglaudumas tarp dienų	
0,6	1,1	0,64	2,65	0,4	0,9	0,33	1,45	2,98
–	–	Priimtina (p=0,744)	Priimtina (p<0,0001)	–	–	Priimtina (p=0,209)	Priimtina (p=0,010)	

Tyrimo metu nustatyta, kad pirmo ir antro lygio kreatinino kontrolinės medžiagos tenkino gamintojo deklaruojamas variacijos koeficiento vertes tiek tarp matavimų (CV 0,6 proc. ir 0,4 proc.), tiek tarp skirtingų matavimo dienų (CV 1,1 proc. ir 0,9 proc.).

5. REZULTATŲ APTARIMAS

5.1 Alaninaminotransferazė

Alaninaminotransferazė yra fermentas, kuris dažniausiai randamas kepenyse. Kartu su kitais fermentais ji gali būti naudojama įvairių kepenų sutrikimų eigai stebėti [3]. Kepenų ląstelių pažeidimas pasireiškia padidėjusiu ALT aktyvumu serume dar prieš atsirandant klinikiniam simptomams ir požymiams, todėl svarbu laiku ir tinkamai įvertinti gautus tyrimo rezultatus. Tariant ALT be piridoksialio 5'-fosfato, išmatuojamas nepilnas ALT aktyvumas, kadangi apofermentas yra nepilnai prisotintas [28], todėl buvo nuspręsta įdiegti IFFC rekomenduojamą ALT tyrimo metodą su piridoksialio 5'-fosfatu, kuris padidina katalizinį ALT apofermento aktyvumą ir taip išmatuojama tikslesnė analizės vertė.

Atlikta *Passing-Bablok* regresine analize nustatyta, kad tarp metodų egzistuoja proporcinis ir sisteminis skirtumas. Gauta atkirta A buvo lygi 2,692, o nuolydis B buvo lygus 1,154. Lawrence ir kitų mokslininkų [111] atliktame tyrime gautas nuolydis B buvo didesnis už 1, o tarp metodų egzistavo sisteminis skirtumas, kadangi į 95 proc. pasikliautinį intervalą nepateko 1 – tai sutampa su tyrimo duomenimis.

Pagal gautą Bland-Altman diagramą matoma, kad ALT rezultatai gauti be piridoksialio 5'-fosfato metodu yra mažesni nei gauti su piridoksialio 5'-fosfatu ir nustatytas neigiamas poslinkis tarp rezultatų, kuris buvo -27,5 proc. ($p < 0,0001$). Lawrence ir kitų mokslininkų [111] atliktame tyrime nustatytas neigiamas poslinkis tarp lyginamų metodų, o tai sutampa su tyrimo metu gautais rezultatais.

Atlikus AST su piridoksialio 5'-fosfatu metodo kontrolinių medžiagų neglaudumo analizę nustatyta, kad pirmo lygio kontrolinės medžiagos neglaudumas tarp matavimų (CV 1,9 proc.) netenkina gamintojo deklaruojamos vertės (CV 1,2 proc.) ($p = 0,002$). Be to, ir antro lygio kontrolinės medžiagos gautas neglaudumo tarp matavimų variacijos koeficientas 0,6 proc. neatitinka gamintojo deklaruotos 0,5 proc. CV vertės ($p = 0,232$). Tačiau Westgard biologinės variacijos modelio deklaruota CV vertė skiriasi nuo gamintojo deklaruojamos vertės. Tai gali lemti sąlygos, kuriomis gamintojas atliko analizę – tyrimas atliktas idealiomis sąlygomis, todėl rezultatų CV reikšmės yra deklaruojamos mažesnės nei Westgard biologinės variacijos modelio.

Pritaikius šį modelį, visi glaudumo analizės rezultatai, tiek pirmo lygio, tiek antro lygio kontrolinių medžiagų, tenkina modelyje nurodytą CV vertę (9,7 proc.). Analizuotas naujasis ALT tyrimo metodas su piridoksaliao 5'-fosfatu yra priimtinas. Kaip ir AST atveju, abu metodai - tiek be P5P, tiek su P5P - atitinka analitinius kriterijus norint juos taikyti rutininėje praktikoje. Vis dėlto su piridoksaliao 5'-fosfatu gaunami tikslesni rezultatai, nes pasiekiamas pilnas fermento aktyvumas. Tai turi įtakos ne tik AST, bet ir ALT rezultatams, ypač tiriant pacientus, kuriems yra vitamino B₆ deficitas, kai tiriant be piridoksaliao 5'-fosfatu gali būti gaunami klaidingai maži rezultatai.

5.2 Aspartataminotransferazė

Aspartataminotransferazė yra fermentas, kuris dažniausiai randamas kepenyse. Kaip ir ALT, kartu su kitais fermentais AST gali būti naudojama įvairių kepenų sutrikimų eigai stebėti [3]. Dėl egzistuojančių dviejų AST formų (mitochondrinė ir citoplazminė), ląstelė turi būti labiau pažeista, kad AST patektų į tarpląstelinę erdvę, kadangi mitochondrinė AST sudaro 70 proc. Kaip ir ALT, tiriant AST be piridoksaliao 5'-fosfato, išmatuojamas nepilnas fermento aktyvumas [28], todėl buvo nuspręsta įdiegti IFFC rekomenduojamą AST tyrimo metodą su piridoksaliao 5'-fosfatu, kuris padidina katalizinį AST aktyvumą ir išmatuojama tikslesnė vertė.

Atlikta *Passing-Bablok* regresine analize nustatyta, kad tarp metodų egzistuoja proporcinis skirtumas, o reikšmingo sisteminio skirtumo nėra. Gauta atkirta A buvo lygi 2,259, o nuolydis B buvo lygus 1,143. Lawrence ir kitų mokslininkų [111] atliktame tyrime gautas nuolydis B buvo didesnis už 1, tačiau į jo 95 proc. pasikliautinį intervalą neįėjo 1, tai reiškia, kad jų atliktame tyrime tarp metodų egzistavo sisteminis skirtumas, o tai prieštarauja gautiems rezultatams. Tačiau Lawrence ir kitų mokslininkų [111] atliktame tyrime pacientų imtis buvo 320, trigubai didesnė nei mūsų atlikto tyrimo imtis, be to, gali būti, kad šių autorių tyrime pacientai buvo pasirinkti selektyviai, o mūsų tyrime nebuvo taikyta rimtų kriterijų pacientų mėginių atrinkimui. Tai galėjo lemti gautų rezultatų skirtumus.

Pagal gautą Bland-Altman diagramą matoma, kad AST rezultatai, gauti be piridoksaliao 5'-fosfato metodu, yra mažesni nei gauti su piridoksaliao 5'-fosfatu ir nustatytas neigiamas poslinkis tarp rezultatų, kuris buvo -24 proc. ($p < 0,0001$). Lawrence ir kitų mokslininkų [111]

atliktame tyrime nustatytas neigiamas poslinkis tarp lyginamų metodų, o tai sutampa su tyrimo metu gautais rezultatais.

Atlikus AST nustatymo su piridoksaliao 5'-fosfatu metodo neglaudumo analizę, gauti pirmo lygio kontrolinių medžiagų variacijos koeficientų rezultatai tenkino gamintojo deklaruojamas vertes, tačiau antro lygio kontrolinės medžiagos matavimai tarp dienų netenkina gamintojo deklaruojamų rezultatų. Gautas variacijos koeficiento (CV) rezultatas 0,8 proc. yra didesnis nei gamintojo deklaruojama 0,6 proc. vertė ($p=0,060$). Tai, kad ši vertė yra nepriimtina, galima paaiškinti tuo, jog gamintojas tyrimą atliko idealiomis sąlygomis – nauji prietaisai, naujos kontrolinės medžiagos, be to, gali būti, kad tyrimui naudotų medžiagų matrica buvo skirtinga. Tačiau pritaikius Westgard biologinės variacijos modelį, kuriame CV reikšmė nurodoma 6,15 proc., tiek pirmo, tiek antro lygio kontrolinės medžiagos tenkina šį rezultatą, todėl analizuotas naujasis AST metodas su piridoksaliao 5'-fosfatu yra priimtinas. Literatūroje nėra duomenų apie AST su P5P metodo neglaudumo analizę, todėl nėra galimybės palyginti mūsų gautų rezultatų su kitų autorių. Nors abu metodai - tiek be P5P, tiek su P5P - metodas AST matavimui atitinka analitinius kriterijus norint juos taikyti rutininėje praktikoje, vis dėlto su piridoksaliao 5'-fosfatu gaunami tikslesni rezultatai, nes pasiekiamas pilnas fermento aktyvumas. Tai turi reikšmingos įtakos tiriant pacientus, kuriems yra vitamino B₆ deficitas, kada tiriant be piridoksaliao 5'-fosfatu gali būti gaunami klaidingai maži rezultatai, dėl kurių nebus imtasi gydymo priemonių.

5.3 Feritinas

Feritinas – tai daugiafunkcinis baltymas, kuris atlieka svarbų vaidmenį geležies saugojime ir metabolizme. Mažas kiekis yra susijęs su geležies trūkumu, o didelė koncentracija nustatoma esant hemosiderozei, hemochromatozei ir lėtiniais uždegiminiams sutrikimams. Be to, naujausi tyrimai parodė, kad feritinas dalyvauja ne tik pernešant geležį, bet gali transportuoti ir kitas makro- bei mikromolekules. Feritinas gali būti naudojamas ir kaip vėžinių susirgimų ar daugelio neurologinių ligų biomarkeris [38]. Įdiegti naują feritino matavimo metodą buvo nuspręsta pakartotinai nustačius turbidimetrinio metodo neatitiktis išorinėje kokybės vertinimo programoje. Išanalizavus išorinio kokybės vertinimo rezultatus bei žinant metodų skirtumus, buvo apsispręsta pereiti prie imunocheminio feritino nustatymo metodo.

Mūsų atliktų tyrimų rezultatai nesutapo su išorinėje kokybės vertinimo programoje gautais rezultatais. Išorinio kokybės vertinimo programoje, ypač vėžio žymenų, kur mėginių kiekis (n=21) yra artimas mūsų tirtų mėginių skaičiui (n=25), gauti rezultatai buvo didesni nei mūsų tyrimo rezultatai, todėl turbidimetriniu metodu gauti rezultatai nepatekdavo į reikiamas ribas. Pavyzdžiui, išorinės kokybės kontrolės vėžio žymenų priskirtoji vertė (angl. *assigned value*) yra 65 µg/l, o tikslinės vertės ribos yra 65 µg/l ± 15 proc., tad gaunamas tikslinės vertės intervalas yra 55 – 75 µg/l. Mūsų matavimais gautų rezultatų vidurkis buvo 31 µg/l, todėl aiškiai matoma, kad jis nesutampa su išorinės kokybės vertinimo programoje nustatytais vertėmis, nes išorinės kokybės vertinimo rezultatų vidurkis buvo 65,2 µg/l.

Atlikta *Passing-Bablok* regresine analize nustatyta, kad tarp lyginamų metodų egzistuoja proporcinis ir sisteminis skirtumai. Gauta atkirta A buvo lygi -15,843, o nuolydis B buvo lygus 1,263. Literatūroje duomenų apie šių dviejų feritino matavimo metodų palyginimus nėra.

Pagal gautą Bland-Atlman diagramą tarp turbidimetrinio ir CMIA feritino matavimo metodų nustatytas teigiamas poslinkis, kuris buvo 14,8 proc. (p<0,0001). Vizualiai iš diagramos matoma, kad skirtumas tarp dviejų metodų yra didžiausias esant feritino koncentracijai mažiau 100 µg/l. Suskirsčius feritino rezultatus į intervalus nustatyta, kad iki 100 µg/l intervale CMIA feritino rezultatai yra apytiksliai 25 proc. (p=0,097) mažesni nei senuoju turbidimetriniu metodu, o intervale nuo 100 µg/l ir daugiau naujojo CMIA feritino matavimo metodo rezultatai apytiksliai 7 proc. (p=0,48) didesni nei turbidimetriniu metodu gauti rezultatai. Literatūroje nėra aprašomi šių dviejų metodų palyginimai, todėl mūsų tyrimo rezultatai negali būti palyginti su kitų autorių gautais rezultatais.

Atlikus feritino matavimo chemiliuminescencinės mikrodalelių imunoanalizės metodu neįglaudumo analizę, nustatyta, kad tiek pirmo, tiek antro lygio kontrolinių medžiagų matavimų variacijos koeficientai tenkino gamintojo deklaruojamas CV vertes. Tai rodo gerą metodo įglaudumą, todėl naujasis mikrodalelių chemiliuminescencinės imunoanalizės metodas yra priimtinas. Apie CMIA metodo neįglaudumo analizę literatūroje duomenų nėra, todėl gauti tyrimo rezultatai negali būti palyginti su kitų autorių gautais duomenimis. Be to, magistro baigiamojo darbo rengimo metu nespėta sudalyvauti naujojo chemiliuminescencinės mikrodalelių imunoanalizės metodo išorinės kokybės vertinimo programoje.

5.4 Kreatininas

Glomerulų filtracijos greitis yra geriausias inkstų funkcijos rodiklis. Yra keli pamatiniai metodai nustatant GFR, tokie, kaip inulino klirensas ar radiologiniai metodai. Tačiau jie nėra pritaikomi rutininėje praktikoje dėl tam tikrų jų savybių, kurios kelia sunkumų praktiniam naudojimui, tokių, kaip aukštesnė kaina ir radiacijos rizika, todėl GFR nustatymui naudojamas serumo kreatinino lygis [112]. Šiais laikais dauguma klinikinių laboratorijų pateikia eGFR rezultatus, gautus laboratorijos informacinei sistemai jį automatiškai apskaičiavus pagal serumo kreatinino rezultatus [113]. Būtent dėl šios priežasties buvo pradėtos taikyti tarptautinės standartizacijos programos kreatinino metodams. Vadovaujantis IFCC rekomendacijomis, mūsų laboratorijoje buvo diegiamas naujas kreatinino tyrimo metodas – fermentinis metodas, kuris pakeitė modifikuotą *Jaffe* metodą, anksčiau naudotą serumo kreatinino tyrimui. *Jaffe* reakcija yra dažniausiai naudojama klinikinėse laboratorijose kaip kreatinino nustatymo metodas, tačiau ją veikia daugelis ne kreatinino chromogenų. Dėl pašalinių chromogenų įtakos tyrimo rezultatams *Jaffe* metodas keičiamas fermentiniu metodu, kuriam ne kreatinino chromogenai tokios įtakos neturi. Vis dėlto ir fermentinis metodas turi trūkumų – jį sunku pritaikyti prie ligonio lovos atliekamiesiems tyrimams (POTC), be to, jis yra brangesnis už modifikuotą *Jaffe* metodą [93].

Atlikta *Passing-Bablok* regresine analize nustatyta, kad tarp metodų egzistuoja proporcinis bei sisteminis skirtumai. Gauta atkirta A buvo lygi -11,516, o nuolydis B buvo lygus 1,062. Hermida ir kitų mokslininkų [114] atliktame tyrime buvo gauta neigiama atkirta A bei nuolydis B, kuris buvo didesnis už 1. Remiantis šių duomenų 95 proc. pasikliautiniu intervalu buvo nustatyti proporcinis bei sisteminis skirtumai, kas sutampa su tyrimo metu gautais duomenimis.

Pagal gautą Bland-Altman diagramą matoma, kad *Jaffe* metodu gauti rezultatai yra didesni nei gauti fermentiniu metodu ir poslinkis tarp rezultatų yra 8,1 proc. ($p < 0,0001$). Vizualiai iš diagramos matoma, kad skirtumas tarp dviejų metodų yra didžiausias esant kreatinino koncentracijai 50 – 100 $\mu\text{mol/l}$ intervale. Suskirsčius kreatinino rezultatus į intervalus nustatyta, kad 48 – 115 $\mu\text{mol/l}$ intervale fermentinio kreatinino metodo rezultatai yra apytiksliai 6 proc. mažesni nei senuoju *Jaffe* metodu, o 115 – 300 $\mu\text{mol/l}$ intervale naujojo (fermentinio) kreatinino matavimo metodo rezultatai apytiksliai 4 proc. mažesni nei *Jaffe* metodu gauti rezultatai. Skirtumai yra statistiškai reikšmingi, nes p reikšmės yra mažesnės nei 0,05 ($p =$

<0,0001; p=0,001). Kūme ir kitų mokslininkų [93] atliktu kreatinino metodų palyginimo tyrimu gauti panašūs rezultatai – teigiamas poslinkis ir didžiausi rezultatų skirtumai esant kreatinino koncentracijai iki 100µmol/l. Hermida ir kitų mokslininkų [114] atliktame tyrime gauti panašūs rezultatai, kurie sutampa su mūsų tyrimo duomenimis.

Didesnis *Jaffe* metodo poslinkis esant žemesnėms kreatinino koncentracijoms gali privesti prie klaidingos GFR interpretacijos, ypač vyresnio amžiaus pacientams, todėl buvo atlikta eGFR poslinkio analizė, suskirsčius gautus rezultatus pagal lėtinių inkstų ligų (CKD) klasifikacijos sistemą. Vertinant eGFR reikšmes intervale nuo 15 iki 30, fermentiniu kreatinino metodu gaunamos apytiksliai 9 proc. didesnės vertės, 30-60 eGFR reikšmių intervale gaunamos apytiksliai 4 proc. didesnės vertės, o 60-90 eGFR reikšmių intervale fermentiniu kreatinino metodu gaunamos apytiksliai 3 proc. didesnės vertės. Skirtumai yra statistiškai reikšmingi, nes p vertės yra mažesnės nei 0,05 (p=0,044; p=0,003, p=0,013). Literatūroje nėra duomenų apie eGFR skirtumus, gautus *Jaffe* ir fermentiniu metodu, todėl mūsų rezultatai negali būti palyginti su kitų autorių gautais rezultatais. Išanalizavus eGFR rezultatus nustatyta, kad penkių pacientų rezultatų klinikinė reikšmė pasikeičia – 3 pacientams, kurių kreatinino koncentracija išmatuota *Jaffe* metodu, gauti eGFR rezultatai buvo mažesni už nustatytą pamatinių biologinių verčių intervalą, o apskaičiavus eGFR pagal fermentiniu metodu gautą kreatinino koncentraciją gautas rezultatas pateko į pamatinių biologinių verčių intervalą (atitinkamai 89,6 → 99; 85,7 → 99,5; 86 → 90,3); 2 pacientams, kurių kreatinino koncentracija matuota *Jaffe* metodu, gauti eGFR rezultatai pateko į pamatinių biologinių verčių intervalą, o apskaičiavus eGFR pagal fermentiniu kreatinino metodu gautą kreatinino koncentraciją gautas rezultatas buvo mažesnis nei pamatinis biologinių verčių intervalas (atitinkamai 98,6 → 88,1; 90,4 → 82,5).

Atlikus fermentinio kreatinino nustatymo metodo neglaudumo analizę gauti kontrolinių medžiagų variacijos koeficientų rezultatai tenkino gamintojo deklaruojamas vertes. Kūme ir kitų mokslininkų [93] atliktame neglaudumo tyrime gauti rezultatai atitiko biologinės variacijos modelio siūlomą neglaudumo vertę, kuri yra 2,98 proc., o tai sutampa su mūsų tyrimu gautais rezultatais. Šie duomenys rodo gerą metodo glaudumą, todėl naujasis fermentinis kreatinino matavimo metodas yra priimtinas. Nors abu metodai - tiek *Jaffe*, tiek fermentinis metodas kreatinino matavimui - atitinka analitinius kriterijus, norint juos taikyti rutininėje praktikoje, vis dėlto fermentiniu metodu gaunami patikimesni rezultatai tiriant mažas serumo kreatinino koncentracijas.

6. IŠVADOS

1. Naujai diegiamas alaninaminotransferazės nustatymo metodas su piridoksaliao 5'-fosfatu, nors ir nepasiekia gamintojo deklaruojamų funkcionalumo charakteristikų, atitinka žinomas biologinės variacijos modelio charakteristikas pagal Westgard, todėl yra tinkamas taikyti rutininėje laboratorijos praktikoje.
2. Naujai diegiamas aspartataminotransferazės nustatymo metodas su piridoksaliao 5'-fosfatu, nors ir nepasiekia gamintojo deklaruojamų funkcionalumo charakteristikų, atitinka žinomas biologinės variacijos modelio charakteristikas pagal Westgard duomenų bazę, todėl yra tinkamas taikyti rutininėje laboratorijos praktikoje.
3. Naujai diegiamas chemiliuminescencinės mikrodalelių imunoanalizės metodas feritino nustatymui atitinka gamintojo deklaruojamus kokybės tikslus, taigi metodą galima taikyti rutininėje laboratorijos praktikoje.
4. Naujai diegiamas fermentinis kreatinino nustatymo metodas atitinka gamintojo deklaruojamus kokybės tikslus, todėl metodą galima taikyti rutininėje laboratorijos praktikoje.

7. REKOMENDACIJOS

Įvertinę fermentinio kreatinino matavimo rezultatų poslinkį, siūlome informuoti klinicistus apie tai, kad skirtinguose kreatinino reikšmių intervaluose gauti rezultatai gali skirtis, todėl tų pačių pacientų skirtingais metodais gauti rezultatai turi būti interpretuojami atsižvelgiant į nustatytus metodų skirtumus. Atitinkamai šiek tiek skiriasi apskaičiuojamo glomerulų filtracijos greičio [eGFR (CKD-EPI)] rezultatai, todėl būtina atsižvelgti ir į šiuos skirtumus.

8. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Khatami Z, Hill R, Sturgeon C, Kearney E, Breadon P, Kallner A. Measurement verification in the clinical laboratory: A guide to assessing analytical performance during the acceptance testing of methods (quantitative examination procedures) and/or analysers. http://www.acb.org.uk/docs/default-source/committees/scientific/guidelines/measurement-verification/Measurement_verification_final_090608.pdf. Prieiga per internetą 2018-12-03.
2. Theodorsson E. Validation and verification of measurement methods in clinical chemistry. *Bioanalysis*. 2012;305–320.
3. Kariv R, Leshno M, Beth-Or A, Strul H, Blendis L, et al. Re-evaluation of serum alanine aminotransferase upper limit and its modulation factors in a large-scale population study. *Liver International* 2006; 26: 445–450.
4. Kim HJ, Oh SW, Kim DJ, Choi EY. Abundance of immunologically active alanine aminotransferase in sera of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma patients. *Clin Chem* 2009; 55:1022-1025.
5. Lo RC, Kim H. Histopathological evaluation of liver fibrosis and cirrhosis regression. *Clin Mol Hepatol* 2017; 23:302-307.
6. Kim W, Flamm SL, Di Bisceglie AM, Bodenheimer HC: Serum activity of alanine aminotransferase (ALT) as an indicator of health and disease. *Hepatology* 2008; 47(4):1363-1370.
7. Nyblom H, Bjornsson E, Simren M, Aldenborg F, Almer S, Olsson R. The AST/ALT ratio as an indicator of cirrhosis in patients with PBC. *Liver Int* 2006; 26:840-845.
8. Wong GL, Wong VW, Choi PC, Chan AW, Chan HL. Development of a non-invasive algorithm with transient elastography (Fibroscan) and serum test formula for advanced liver fibrosis in chronic hepatitis B. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; 31:1095-1103.
9. Toney, M. D. Aspartate aminotransferase: an old dog teaches new tricks. *Arch. Biochem. Biophys.* 2014; 544:119–127.
10. Mills JR, Greene DN, Bainton J, Lorey TS, Baumann NA. Fluctuating Serum Aspartate Aminotransferase Activity in a Complicated Pregnancy. *Clinical Chemistry* 2015; 61(10):1241-1244.

11. Sohocki MM, Sullivan LS, Harrison WR, Sodergren EJ, Elder FF, Weinstock G, Tanase S, Daiger SP. Human glutamate pyruvate transaminase (GPT): localization to 8q24. 3, cDNA and genomic sequences, and polymorphic sites. *Genomics* 1997; 40(2):247-252.
12. Miyashita Y, Dolferus R, Ismond KP, Good AG. Alanine aminotransferase catalyses the breakdown of alanine after hypoxia in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 2007; 49:1108–1121.
13. Liu Z, Que S, Xu J, Peng T. Alanine aminotransferase—old biomarker and new concept: a review. *Int J Med Sci.* 2014; 11(9):925-935.
14. Liaw Y-F, Chu C-M. Hepatitis B virus infection. *The Lancet* 2009; 373(9663):582-592.
15. Lai M, Hyatt BJ, Nasser I, Curry M, Afdhal NH. The clinical significance of persistently normal ALT in chronic hepatitis B infection. *Journal of hepatology* 2007; 47(6):760-767.
16. Poustchi H, George J, Esmaili S, Esna-Ashari F, Ardalan G, Sepanlou SG, Alavian SM. Gender differences in healthy ranges for serum alanine aminotransferase levels in adolescence. *PloS one* 2011; 6(6e):21178. doi: 10.1371/journal.pone.0021178. Prieiga per internetą 2018-12-01.
17. Dong MH, Bettencourt R, Barrett-Connor E, Loomba R: Alanine aminotransferase decreases with age: the Rancho Bernardo Study. *PloS one* 2010; 5(12e):14254 doi: 10.1371/journal.pone.0014254. Prieiga per internetą 2018-12-01.
18. Le Couteur DG, Blyth FM, Creasey HM, Handelsman DJ, Naganathan V, Sambrook PH, Seibel MJ, Waite LM, Cumming RG. The Association of Alanine Transaminase With Aging, Frailty, and Mortality. *The Journals of Gerontology: Series A* 2010; 65A(7):712–717.
19. Edge K, Chinoy H, Cooper R. Serum alanine aminotransferase elevations correlate with serum creatine phosphokinase levels in myositis. *Rheumatology* 2006; 45(4):487-488.
20. Nathwani RA, Pais S, Reynolds TB, Kaplowitz N. Serum alanine aminotransferase in skeletal muscle diseases. *Hepatology* 2005; 41(2):380-382.
21. Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *The American journal of gastroenterology* 2003; 98(5):960-967.
22. Gunji T, Matsushashi N, Sato H, Iijima K, Fujibayashi K, Okumura M, Sasabe N, Urabe A. Risk factors for serum alanine aminotransferase elevation: A cross-sectional study of healthy adult males in Tokyo, Japan. *Digestive and Liver Disease* 2010; 42(12):882-887.

23. Lee K-G, Mitchell A, Shibamoto T. Antioxidative activities of aroma extracts isolated from natural plants. *Biofactors* 2000; 13(1):173-178.
24. Córdoba J, O'Riordan K, Dupuis J, Borensztajn J, Blei AT. Diurnal variation of serum alanine transaminase activity in chronic liver disease. *Hepatology* 1998; 28(6):1724-1725.
25. Kritzmann MG. The isolation and properties of the enzyme effecting transamination of aspartic acid (aspartic aminopherase XII) Communication on the formation and breakdown of amino acids by intermolecular transfer of amino-groups. *Biokhimiya* 1939; 4:691-701.
26. Westerhuls LW, Hafkenscheid JC. Apoenzyme content of serum aminotransferase in relation to plasma pyridoxal-5'-phosphate. *Clin Chem.* 1983; 29:789-792.
27. Bergmeyer HU, Scheibe P, Wahlefeld AW. Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. *Clin. Chem.* 1978; 24:68-73.
28. Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Part 4. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alanine aminotransferase. *Clin Chem Lab Med.* 2002; 40:718-724.
29. Clayton PT. B6-responsive disorders: a model of vitamin dependency. *J Inherit Metab Dis.* 2006; 29:317-326.
30. Jung K, Egger E. Effect of pyridoxal-5'-phosphate on the temperature relationships of alanine aminotransferase. *Clin Chim Acta* 1975; 64: 329-331.
31. Jung K, Ludtke B, Egger E. The influence of pyridoxal 5'-phosphate on the temperature relationship of aspartate aminotransferase isoenzymes. *Z Klin Chem Klin Biochem* 1975; 13:179-181.
32. Huang XJ, Choi YK, Im HS, Yarimaga O, Yoon E, Kim HS. Aspartate Aminotransferase (AST/GOT) and Alanine Aminotransferase (ALT/GPT) Detection Techniques. *Sensors (Basel)* 2006; 6(7):756-782.
33. Yagi T, Kagamiyama H, Ohtawara S, Soda K, Nozaki M. A new assay for L-aspartate: 2-oxoglutarate aminotransferase. *Anal. Biochem.* 1979; 100:20-24.
34. Phillip MA, Graham RP. Designing a coupled assay system for aspartate aminotransferase. *Biochem. Edu.* 1995; 23:40-41.

35. He YN, Chen HY. The kinetics-based electrochemical determination of serum glutamate pyruvate transaminase activity with a gold microelectrode. *Anal. Chim. Acta* 1997; 353: 319–323.
36. Hall AP, Elcombe CR, Foster FR, et al. Liver hypertrophy: a review of adaptive (adverse and non-adverse) changes – conclusions from the 3rd International ESTP Expert Workshop. *Toxicol Pathol.* 2012; 40:971–994.
37. Laufberger V. Sur la cristallisation de la ferritine. *Bulletin de la Societe de chimie biologique* 1937; 19:1575–1582.
38. Bradley JM, Le Brun NE, Moore GR. Ferritins: Furnishing proteins with iron. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2016; 21:13–28.
39. Cohen LA, Gutierrez L, Weiss A, et al. Serum ferritin is derived primarily from macrophages through a nonclassical secretory pathway. *Blood* 2010; 116(9): 1574–1584.
40. Arosio P, Elia L, Poli M. Ferritin, cellular iron storage and regulation. *IUBMB Life* 2017; 69:414–422.
41. Wang Z, Gao H, Zhang Y, Liu G, Niu G, Chen X. Functional ferritin nanoparticles for biomedical applications. *Front. Chem. Sci. Eng.* 2017; 11:633–646.
42. Mikhael M, Kim SF, Schranzhofer M, Lin SS, Sheftel AD, Mullner EW, Ponka P. Iron regulatory protein-independent regulation of ferritin synthesis by nitrogen monoxide. *The FEBS Journal* 2006; 273:3828–3836.
43. Dignass A, Farrag K, Stein J. Limitations of Serum Ferritin in Diagnosing Iron Deficiency in Inflammatory Conditions. *Int. J. Chronic Dis.* 2018; 11p. doi.org/10.1155/2018/9394060. Prieiga per internetą 2018-12-18.
44. Korolnek T, Hamza I. Macrophages and iron trafficking at the birth and death of red cells. *Blood* 2015; 125(19):2893–2897.
45. Schaer CA., Schoedon G, Imhof A, Kurrer MO, Schaer DJ. Constitutive endocytosis of CD163 mediates hemoglobin-heme uptake and determines the noninflammatory and protective transcriptional response of macrophages to hemoglobin. *Circulation Research* 2006; 99:943–950.
46. Kernan KF, Carcillo JA. Hyperferritinemia and inflammation. *International Immunology* 2017; 29(9):401–409.

47. Podmore C, Meidtner K, Schulze MB, et al. Association of multiple biomarkers of iron metabolism and type 2 diabetes: The EPIC-InterAct Study. *Diabetes Care* 2016; 39:572–581.
48. Silvestre OM, Gonçalves A, Nadruz WJ, et al. Ferritin levels and risk of heart failure—the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Eur J Heart Fail.* 2017; 19(3):340–347.
49. Bennett TD, Hayward KN, Farris RW, Ringold S, Wallace CA, Brogan TV. Very high serum ferritin levels are associated with increased mortality and critical care in pediatric patients. *Pediatr Crit Care Med.* 2011; 12(6):e233–236.
50. Rosário C, Shoenfeld Y. The hyperferritinemic syndrome. *Isr Med Assoc J.* 2014; 16(10):664–665.
51. Surguladze N, Thompson KM, Beard JL, Connor JR, Fried MG. Interactions and Reactions of Ferritin with DNA. *J. Biol. Chem.* 2004; 279:14694–14702.
52. Alkhateeb AA, Connor JR. Nuclear ferritin: A new role for ferritin in cell biology. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 2010; 1800:793–797.
53. Liu X, Madhankumar AB, Slagle-Webb B, Sheehan JM, Surguladze N, Connor JR. Heavy chain ferritin siRNA delivered by cationic liposomes increases sensitivity of cancer cells to chemotherapeutic agents. *Cancer Res.* 2011; 71:2240–2249.
54. Cohen-Solal A, Leclercq C, Deray G, Lasocki S, Zambrowski JJ, Mebazaa A, de Groote P, Damy T, Galinier M. Iron deficiency: an emerging therapeutic target in heart failure. *Heart* 2014; 100:1414–1420.
55. Nixon AM, Neely E, Simpson IA, Connor JR. The role of HFE genotype in macrophage phenotype. *J. Neuroinflamm.* 2018; 15:30. doi: 10.1186/s12974-018-1057-0. Prieiga per internetą 2018-12-18.
56. Biasiotto G, Di Lorenzo D, Archetti S, Zanella I. Iron and Neurodegeneration: Is Ferritinophagy the Link? *Mol. Neurobiol.* 2016; 53:5542–5574.
57. Chiou B, Connor JR. Emerging and Dynamic Biomedical Uses of Ferritin. *Pharmaceuticals* 2018, 11:124. doi: 10.3390/ph11040124. Prieiga per internetą 2018-12-18.
58. Hearnshaw S, Thompson NP, McGill A. The epidemiology of hyperferritinaemia. *World J. Gastroenterol.* 2006; 12:5866–5869.
59. Kidane TZ, Sauble E, Linder MC. Release of iron from ferritin requires lysosomal activity. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2006; 291:C445–C455.

60. Li L, Fang CJ, Ryan JC, Niemi EC, Lebrón JA, Björkman PJ, Arase H, Torti FM, Torti SV, Nakamura MC, et al. Binding and uptake of H-ferritin are mediated by human transferrin receptor-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010; 107:3505–3510.
61. Akinc A, Battaglia G. Exploiting Endocytosis for Nanomedicines. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2013. doi: 10.1101/cshperspect.a016980. Prieiga per internetą 2018-12-18.
62. Linder MC. Mobilization of stored iron in mammals: A review. *Nutrients* 2013; 5:4022–4050.
63. Gozzelino R, Soares MP. Coupling heme and iron metabolism via ferritin H chain. *Antioxid Redox Signal.* 2014; 20(11):1754–1769.
64. Borque L, Rus A, Bellod L, Seco ML. Development of an automated immunoturbidimetric ferritin assay. *Clin Chem Lab Med* 1999; 37:899–905.
65. Addison GM, Beamish MR, Hales CN, Hodgkins M, Jacobs A, Llewellyn P. An immunoradiometric assay for ferritin in the serum of normal subjects and patients with iron deficiency and iron overload. *J Clin Pathol* 1972; 25:326–329.
66. Wei Wang, Mary Ann Knovich, Lan G. Coffman, Frank M. Torti, Suzy V. Torti. Serum ferritin: Past, present and future. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 2010; 1800(8):760–769.
67. National Institute for Biological Standards and Control. WHO International Standard Ferritin, human, recombinant NIBSC code: 94/572. National Institute for Biological Standards and Control 2008; 1–2.
68. World Health Organization. Serum ferritin concentrations for the assessment of iron status and iron deficiency in populations. Geneva: World Health Organization, 2011.
69. Garcia-Casal MN, Peña-Rosas JP, Urrechaga E, Escanero JF, Huo J, Martinez RX, Lopez-Perez L. Performance and comparability of laboratory methods for measuring ferritin concentrations in human serum or plasma: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2018; 13(5). doi.org/10.1371/journal.pone.0196576. Prieiga per internetą 2018-12-18.
70. Molinario R, Autilio C, Pocino K, Daliso P, Di Leva S, Zuppi C, Antenucci M. Analytical evaluation of a new liquid immunoturbidimetric assay for the determination of ferritin in serum. *Clin Chem Lab Med* 2015; 53(12):E351–E353.

71. Min X, Fu D, Zhang J, et al. An automated microfluidic chemiluminescence immunoassay platform for quantitative detection of biomarkers. *Biomed Microdevices*. 2018; 20(4):91. doi: 10.1007/s10544-018-0331-3. Prieiga per internetą 2018-12-18.
72. Burtis CA, Ashwood E, Bruns DE. Teitz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. 5th Ed. *Saunders* 2012; 679–684.
73. Renda R. Can salivary creatinine and urea levels be used to diagnose chronic kidney disease in children as accurately as serum creatinine and urea levels? A case-control study. *Renal Failure* 2017; 39(1):452–457.
74. Allen J. Creatine metabolism and psychiatric disorders: Does creatine supplementation have therapeutic value? *Neuro Sci Bio Behav. Rev.* 2012; 36(5):1442–1462.
75. Delanaye P, Cavalier E, Maillard N, et al. Creatinine: past and present. *Ann Biol Clin (Paris)* 2010; 68:531–543.
76. Pottel H, Vrydags N, Mahieu B, et al. Establishing age/sex related serum creatinine reference intervals from hospital laboratory data based on different statistical methods. *Clin Chim Acta* 2008; 396:49–55.
77. Bargnoux AS, Kuster N, Cavalier E, Pi éroni L, Souweine JS, Delanaye P, Cristol JP. Serum creatinine: advantages and pitfalls. *J Lab Precis Med* 2018; 3:71. doi: 10.21037/jlpm.2018.08.01. Prieiga per internetą 2019-11-20.
78. Kuster N, Bargnoux AS, Pageaux GP, et al. Limitations of compensated Jaffe creatinine assays in cirrhotic patients. *Clin Biochem* 2012; 45:320–325.
79. Gorce-Dupuy AM, Vela C, Badiou S, et al. Antioxidant and oligonutrient status, distribution of amino acids, muscle damage, inflammation, and evaluation of renal function in elite rugby players. *Clin Chem Lab Med* 2012; 50:1777–1789.
80. Banfi G, Del Fabbro M, Lippi G. Serum creatinine concentration and creatinine-based estimation of glomerular filtration rate in athletes. *Sports Med* 2009; 39:331–337.
81. Carobene A, Marino I, Coşkun A, et al. European Biological Variation Study of the EFLM Working Group on Biological Variation. The EuBIVAS Project: Within- and Between-Subject Biological Variation Data for Serum Creatinine Using Enzymatic and Alkaline Picrate Methods and Implications for Monitoring. *Clin Chem* 2017; 63:1527–1536.

82. Myers L, Miller G, Coresh J. Recommendations for improving serum creatinine measurement: A report from the Laboratory Working Group of the National Kidney Disease Education Program. *Clin Chem*. 2006; 52:5–18.
83. Vieux R, Hascoet JM, Merdarius D, Fresson J, Guillemin F. Glomerular filtration rate reference values in very preterm infants. *Pediatrics* 2010; 125:e1186–1192.
84. Delanghe JR, Cobbaert C, Harmoinen A, Jansen R, Laitinen P, Panteghini M. Focusing on the clinical impact of standardization of creatinine measurements: a report by the EFCC Working Group on creatinine standardization. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49:977–982.
85. Ceriotti F. Establishing pediatric reference intervals: a challenging task. *Clin Chem* 2012; 58:808–810.
86. Stevens LA, Coresh J, Greene T, et al. Assessing kidney function--measured and estimated glomerular filtration rate. *N Engl J Med* 2006; 354:2473–2483.
87. Endre ZH, Pickering JW, Walker RJ. Clearance and beyond: the complementary roles of GFR measurement and injury biomarkers in acute kidney injury (AKI). *Am J Physiol-Renal* 2011; 301:F697–F707.
88. Delanaye P, Cavalier E, Cristol JP, et al. Calibration and precision of serum creatinine and plasma cystatin C measurement: impact on the estimation of glomerular filtration rate. *J Nephrol* 2014; 27:467–475.
89. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, et al. CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration). A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009; 150:604–612.
90. Pottel H, Hoste L, Dubourg L, et al. An estimated glomerular filtration rate equation for the full age spectrum. *Nephrol Dial Transplant* 2016; 31:798–806.
91. Jaffe M. Ueber den Niederschlag, welchen Pikrins äure in normalem Harnerzeugt und über eine neue Reaction des Kreatinins. *Z Physiol Chem*. 1886; 10:391–400.
92. Boutten A, Bargnoux AS, Carlier MC, et al; Société Française de Biologie Clinique. Enzymatic but not compensated Jaffe methods reach the desirable specifications of NKDEP at normal levels of creatinine. Results of the French multicentric evaluation. *Clin Chim Acta* 2013; 419:132–135.

93. Kme T, Saęlam B, Ergon C, Sisman AR. Evaluation and comparison of Abbott Jaffe and enzymatic creatinine methods: Could the old method meet the new requirements? *J Clin Lab Anal.* 2018;32(1). doi:10.1002/jcla.22168. Prieiga per internetą 2018-11-20.
94. Cobbaert M, Baadenhuijsen H, Weykamp C. Prime time for enzymatic creatinine methods in pediatrics. *ClinChem* 2009; 55(3):549–558.
95. Syal K, Srinivasan A, Banerjee D. Streptomycin interference in Jaffe reaction—possible false positive creatinine estimation in excessive dose exposure. *Clin Biochem.* 2013; 46(1–2):177–179.
96. Haeckel R. Assay of creatinine in serum, with use of Fuller’s Earth to remove interferents. *Clin Chem.* 1981; 27:179–183.
97. Cook G. Factors influencing the assay of creatinine. *Ann ClinBiochem.* 1975; 12:219–232.
98. Levey AS, Coresh J, Greene T. Expressing the MDRD study equation for estimating GFR with IDMS traceable (gold standard) serum creatinine values (abstract). *J Am SocNephrol.* 2005; 16:69A.
99. Nah H, Lee S, Lee K, Won J, Kim HO, Kim J. Evaluation of bilirubin interference and accuracy of six creatinine assays compared with isotope dilution–liquid chromatography mass spectrometry. *Clin Biochem* 2016; 49(3):274–281.
100. „Hitachi“ sistemų pakuotės lapelis; Hardeman D, Backer T. Ultrafiltration of serum to eliminate bilirubin interference in the kinetic Jaffe determination of creatinine. *Clin Chem.* 1991; 37:2010–2011.
101. Greenberg N, Roberts WL, Bachmann LM, et al. Specificity characteristics of 7 commercial creatinine measurement procedures by enzymatic and Jaffe method principles. *Clin Chem* 2012; 58:391–401.
102. Larsen K. Creatinine assay by a reaction kinetic principle. *Clin Chem* 1972; 41:209.
103. Liu S, Chung T, Yang Y, Lin C, Tsai H, Yang C, Chen W, Lai T, Li Y, Liu Y. Serum creatinine determined by Jaffe, enzymatic method, and isotope dilution-liquid chromatography-mass spectrometry in patients under hemodialysis. *J Clin Lab Anal.* 2012; 26(3):206–214.
104. Crocker H, Shephard D, White H. Evaluation of an enzymatic method for determining creatinine in plasma. *J ClinPathol.* 1988; 41:576–581.

105. Tanganelli E, Prencipe L, Bassi D, Cambiagli S, Murador E. Enzymatic assay of creatinine in serum and urine with creatinineiminohydrolase and glutamatedehydrogenase. *ClinChem* 1982; 28:1461–1464.
106. Moss GA, Bondar RL, Buzzelli DM. Kinetic enzymatic method for determining serum creatinine. *ClinChem* 1975; 21:1422–1426.
107. International Organization for Standardization. ISO 15189 Medical laboratories - Requirements for quality and competence, 2012.
108. Ricós C, Perich C, Minchinela J, Álvarez V, Simón M, Biosca C, et al. Application of biological variation. A review. *Biochem Med* 2009; 19:250–259.
109. Miler M, Simundic AM, Štefanović M, Ferenc-Ruzic D, Kvaternik M, Topic E, Vrkic N. A model for results comparison on two different biochemistry analyzers in laboratory accredited according to the ISO 15189. *Biochemia Medica* 2009; 19:287–293.
110. CLSI EP09A3: Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples. National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2013.
111. Lawrence J, Saleem M, Coates P, Petrou T, Biszak T. Addition Of Pyridoxal Phosphate Cofactor To Aminotransferase Reagent Produces A Clinically Significant Increase In Measurement Of ALT And AST For Patients Who Are Deficient In The Cofactor. www.aacb.asn.au/documents/item/3047. Prieiga per internetą 2019-04-10.
112. Levey AS, Stevens LA, Hostetter T. Automatic reporting of estimated glomerular filtration rate—just what the doctor ordered. *Clin Chem*. 2006; 52:2188–2193.
113. Miller WG. Estimating glomerular filtration rate. *Clin Chem Lab Med*. 2009; 47:1017–1019.
114. Hermida FJ, Lorenzo MJ, Pérez A, Fernández M, Sagastagoia O, Magadán C. Comparison between ADVIA Chemistry systems Enzymatic Creatinine_2 method and ADVIA Chemistry systems Creatinine method (kinetic Jaffe method) for determining creatinine. *Scand J Clin Lab Invest*. 2014; 74(7):629–636.