

VYSOKÁ PŘESNOST ANALÝZY V KLINICKÉ BIOCHEMII – NUTNOST, ČI NIKOLIV? PŘEHLED ILUSTRUJÍCÍ PROBLEMATIKU NA PŘÍKLADU STANOVENÍ KORTIZOLU V BIOLOGICKÝCH VZORCÍCH

JUDITA ARNOŠTOVÁ^a, LIBUŠE ARNOŠTOVÁ^b
a BARBORA HOLUBOVÁ^a

^a Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 1903/3, 166 28 Praha 6,

^b Vysoká škola chemicko-technologická v Praze – Centrální laboratoře, Technická 1905/5, 166 28 Praha 6

Judita.Arnostova@vscht.cz, Libuse.Arnostova@vscht.cz, Barbora.Holubova@vscht.cz

Došlo 16.10.19, přijato 11.4.20.

Klíčová slova: kortizol, Cushingův syndrom, imunochemické metody, diagnostika, klinická chemie

Obsah

1. Úvod
2. Role kortizolu v organismu a vliv cirkadiánních rytmů na jeho hladiny
3. Kortizol jako analyt – formy výskytu v různých biologických vzorcích
4. Endokrinopatie spojené s poruchami sekrece kortizolu a jejich diagnostika
5. Souhrn analytických metod používaných pro stanovení kortizolu, interference při měření
6. Závěr

1. Úvod

Detekce a kvantifikace biomolekul je v posledních 50 letech stále v popředí zájmu. Jedním z hlavních důvodů je potřeba měření přesných koncentrací těchto molekul v oblasti medicíny. Pro účely humánní i veterinární medicíny se tradičně používají imunochemické metody, jejichž hlavní rozkvět spadá do 80.–90. let. V současné době dochází k určité renesanci imunochemických metod, a to díky jejich nízké ceně a novým formátům souprav, které umožňují miniaturizaci a použití v terénu. K tradičním imunochemickým metodikám se v průběhu posledních 20 let přidaly metody založené na kombinaci chromatografie a hmotnostní spektrometrie a v současné době imunochemickým metodám konkurují již i v rutinních, především zdravotnických laboratořích. Jsou tyto nové metody nezbytností nebo jsou jen doplňkem stávajícího spektra vyšetření? Na tuto otázku není jednoznačná odpověď, nicméně cílem článku je ilustrace situace na příkladu měření jednoho ze steroidních hormonů, konkrétně kortizolu.

2. Role kortizolu v organismu a vliv cirkadiánních rytmů na jeho hladiny

Kortizol je jedním ze steroidních hormonů, který reguluje důležité životní procesy organismu. Patří do skupiny glukokortikoidů, hormonů produkovaných kůrou nadledvin. Receptory pro kortizol lze nalézt ve většině buněk organismu savců, u kterých má kortizol celou řadu funkcí. Jako příklad lze uvést regulaci hladiny glukosy, hladiny elektrolytů, ovlivnění imunologických procesů, kardiovaskulární aktivity a mozkových funkcí. Problematikou správného a reprodukovatelného stanovení kortizolu v matricích živočišného původu se laboratoře zabývají desítky let, přesto stále zůstává celá řada nevyřešených problémů. Problém nespočívá v molekule jako takové, ta je samozřejmě známá, jednoznačně definovaná, stanovitelná bez větších problémů celou řadou analytických technik. Problémem spíše zůstává samotný odběr vzorku, resp. načasování tohoto odběru. Hladiny kortizolu, jak v organismu primátů včetně člověka, tak i dalších savců (např. psů nebo koček) podléhají mnoha výkyvům během aktivní části dne i během ročních období. Rytmus, se kterým je kortizol vylučován, je regulován tzv. hlavním cirkadiánním oscilátorem, který se nachází v hypothalamu. Zdraví jedinci pak mají následující průběh denních resp. nočních hladin kortizolu: velmi nízká koncentrace kortizolu v noci, uvádí se často i nulové hodnoty kolem půlnoci, vysoké ranní maximum spojené se zahájením denní aktivity a slunečním svitem a postupný pokles hladin během dne¹. Hlavní koncentrační pik je tedy shodný přibližně se začátkem aktivního denního života, tedy u lidí s ranním vstáváním. Dlouhou dobu převládal názor, že syntéza a sekrece tohoto hormonu je regulována výhradně zpětnovazebně hypothalamo-hypofyzární osou. V dalších publikacích^{2,3} převládá názor, že souběžně s tímto mechanismem se uplatňují další regulační mechanismy a ty jsou hlavní příčinou diurnálního cyklu (diurnální cyklus = cyklus opakující se s periodou 24 hodin) kortizolu. Jako podpora této teorie slouží i záznam hladin kortizolu u pacientů s určitými endokrinologickými poruchami, spojenými s abnormální sekrecí kortizolu⁴. U těchto pacientů dochází k tomu, že symptomy onemocnění se projevují jen v určitých denních hodinách, zatímco po zbytek dne jsou pacienti bez symptomů choroby. Kromě výzev vyvstávajících při stanovování kortizolu v různých biologických vzorcích tedy již do vývoje nových diagnostických postupů vstupuje i snaha o vyvinutí metody, která by byla schopná kromě samotného stanovení hladiny kortizolu ve vzorku i pomoci v určení závislosti hladin kortizolu na cirkadiánních rytmech⁵.

Situace je navíc komplikována skutečností, že hladiny kortizolu nesouvisí s denní dobou jako takovou, ale

s dobou, kdy pacient nebo modelový organismus (zvíře) vstává a začne být po spánku aktivní nebo, a to je předmětem současného zkoumání, že kortizol (a melatonin) je secernován v závislosti na vlnové délce a intenzitě světla, kterému je organismus vystaven. Autoři West a spol. publikovali výsledky studie⁶, ve které pacienti, zotavující se z infarktu myokardu, podrobili fototerapii modrým světlem definované vlnové délky a intenzity. Podle této studie pak kortizol, na rozdíl od melatoninu, není uvolňován do oběhu v závislosti na denní nebo noční době, ale v přímé souvislosti se změnou intenzity a barvy světla, přičemž citlivost na intenzitu světla a vlnovou délku je vyšší ráno a nižší večer. Vyplyvá z toho, že odpoledne organismus reaguje na změny intenzity a barvy světla změnou sekrece kortizolu poměrně málo, zatímco v ranních a dopoledních hodinách je odpověď na intenzitu a barvu světla velice výrazná.

3. Kortizol jako analyt – formy výskytu v různých biologických vzorcích

Materiály, ze kterých se v oblasti biologie/humánní medicíny kortizol nejčastěji stanovuje, jsou: krev, resp. sérum n. plazma, moč a sliny⁷, v poslední době jsou ve fázi testování soupravy pro stanovení kortizolu ve vlasech. V živých organismech se kortizol nachází ve dvou formách, a to jako vázaný na vazebný protein a jako volný – bez vazby na jinou molekulu. V některých analytických systémech a v některých biologických materiálech je možné detegovat pouze jeden z těchto typů, např. u salivárních souprav pro stanovení kortizolu (stanovení kortizolu ve slinách) se jedná vždy o kortizol volný, u imunochemických souprav konstruovaných pro použití séra/plazmy se jedná většinou o kortizol celkový, tedy jak o kortizol volný, tak i kortizol vázaný na vazebné bílkoviny. Kortizol je vázán buď na specifickou kortizol-vázající bílkovinu nebo na albumin. Kortizol-vázající bílkovina má vůči kortizolu nízkou vazebnou kapacitu, ale vysokou afinitu. Oproti tomu albumin má ke kortizolu nízkou afinitu, ale disponuje vysokou kapacitou pro vazbu kortizolu. Albumin je bílkovinou, která v rámci organismu váže celou řadu biologicky aktivních látek a je všeobecně známá.

Druhou vazebnou bílkovinou pro kortizol je glykoprotein, patřící mezi proteasy, známý pod synonymy kortikosteroidy-vázající globulin, serpinA6 nebo transkortin. Jako všechny serpiny, i transkortin existuje v několika konformacích, které mají přímou souvislost s jeho funkcí⁸.

Transkortin tedy neslouží jen k pouhému transportu steroidu, ale má v organismu aktivní úlohu sám o sobě, je např. takzvaným sebevražedným substrátem pro elastasu tvořenou v neutrofilech během zánětlivého procesu. Při konformačních změnách transkortinu, ke kterým dochází v návaznosti na štěpení určitých oblastí serpinu, klesá schopnost vazby transkortinu na steroid. Tento mechanismus je v současné době hlavní hypotetickou metodou pro vysvětlení protizánětlivého účinku steroidů⁸.

V diagnostickém procesu se uplatňuje jak stanovení celkového kortizolu, tak i stanovení kortizolu volného,

přičemž výběr typu stanovení se provádí s ohledem na diagnostické účely.

4. Endokrinopatie spojené s poruchami sekrece kortizolu a jejich diagnostika

Hyperkortizolismus nebo hypokortizolismus představují u člověka méně četnou skupinu endokrinopatií například ve srovnání s poruchami štítné žlázy. Incidence Cushingovy choroby (hyperkortizolismus) je odhadována na 5 až 25 případů na 1 milion obyvatel ročně. Ve veterinární medicíně je překvapivě Cushingův syndrom nejčastější endokrinopatií u psů a jeho diagnóza i terapie je stále živě diskutovaným tématem ve veterinární literatuře⁹. Diagnózu Cushingovy choroby v humánní medicíně navíc komplikuje skutečnost, že klinicko-patologické příznaky tohoto onemocnění se mohou objevit i u pacientů, kteří syndromem ve skutečnosti netrpí a vykazují příznaky z jiných důvodů (takovým důvodem může být např. alkoholismus) – takové případy jsou souhrnně v literatuře nazvány „pseudo-Cushingův syndrom“ (PCS) a jejich diagnostické odlišení od klasické Cushingovy choroby je aktuálně řešené téma v odborné literatuře^{10,11}. Obecně symptomy Cushingovy choroby zahrnují nabývání na váze, hypertenzi, osteoporózu, „papírovou kůži“ a snadnou tvorbu modřin, přičemž při správné diagnóze, a tedy optimální volbě terapie onemocnění, dochází obvykle u pacientů kromě normalizace klinických parametrů ke všeobecnému zvýšení kvality života a celkově delší době dožití^{12,13}. Volba správné terapie však mimo jiné závisí právě na odlišení od PCS.

Výskyt Cushingova syndromu s ektopickou sekrecí adrenokortikotropního hormonu (ACTH) je nejčastější mezi pacienty s malobuněčným karcinomem plic, kde se uvádí výskyt u asi 1 % nemocných¹⁴. Incidence hyperkortizolismu je odhadována asi na 5 případů na 100 000 obyvatel za rok. Příčinami vzniku této poruchy bývá selhání nadledvin, ke kterému dochází nejčastěji kvůli autoimunitním potížím pacienta nebo může být způsobeno nedostatkem ACTH. Sekundární poruchy v produkci kortizolu souvisí s různými typy poškození hypothalamo-hypofyzární dráhy, např. nádorem, meningitidou, krvácením a podobně.

V diagnostice obou typů endokrinopatií se uplatňuje měření kortizolu, a to jak měření tzv. bazální (nestimulované nebo nesuprimované) hladiny, tak i měření kortizolu při funkčních testech. Dále se vyšetření dělí na screeningová, aplikovaná při podezření na danou poruchu, a specializovaná, při pozitivním výsledku screeningového testu. Zlatým standardem pro testování adrenální nedostatečnosti je tzv. inzulínový toleranční test, který je užitečný zejména pro detekci sekundární adrenální nedostatečnosti. Spočívá v intravenózním podání inzulínu (dávka je závislá na váze pacienta) za účelem vyvolání hypoglykemie¹⁵. Při hypoglykémii u zdravých pacientů dochází ke zvýšené produkci kortizolu, u pacientů s Cushingovým syndromem ke zvýšené produkci kortizolu zpravidla nedochází¹⁶. Tento test má svá úskalí, zejména v podobě samotné hypogly-

chemie, která s sebou nese zdravotní rizika pro testovaného pacienta. Z tohoto důvodu se nedoporučuje zejména osobám starším, u kterých hrozí záchvaty křečí a u osob s onemocněním srdce¹⁷. I přes známé nevýhody je test v humánní medicíně dodnes velmi často používán. Specializovaná vyšetření jsou především tzv. funkční testy, které spočívají ve stanovení bazální hladiny hormonu a ve stanovení stejného hormonu po podání biologicky účinné látky, která stimuluje nebo potlačuje uvolňování hormonu do oběhu.

Pro diagnostiku nadměrné produkce kortizolu u pacientů s pozitivním screeningovým vyšetřením se, vedle dalších metod, v humánní i veterinární medicíně nejčastěji používá tzv. dexametazonový test¹⁸, který by mohl hrát významnou roli i při odlišování pacientů s Cushingovým syndromem od pacientů trpících PCS (cit.¹¹). Spočívá v podání určité dávky léčiva dexametazonu, přičemž v reakci na tento podnět dojde k supresi hladiny kortizolu organismem. Obráceně při diagnostice hypokortizolismu se často používá ACTH stimulační test, při kterém je pacientovi aplikována látka, jejímž působením dojde ke zvýšení produkce kortizolu (použitou látkou bývá nejčastěji Synacthen, uměle připravená látka, která se v organismu chová stejně jako ACTH).

Některé státy (např. Japonsko) mají dostupné, závazné, publikované, celostátní standardy postupu při diagnostice endokrinopatií spojených s nadměrnou nebo nedostatečnou produkcí kortizolu. Jiné se přidržují standardů vydávaných autoritami v daném oboru. Pro stanovení kortizolu při diagnostice endokrinopatií je nejčastěji citovaná práce¹⁹, ve které autoři doporučují provádění stanovení hladiny kortizolu ve vzorku séra odebraného o půlnoci. Naopak podle doporučení Endocrine society screeningová vyšetření zahrnují i funkční test a opomíjejí zcela testy ze séra^{20,21}. V recentním článku českých autorů byly v rámci diagnostiky Cushingova syndromu nalezeny abnormální hladiny desítek látek steroidní povahy, což je však spíše poznatek z oblasti základního výzkumu než z oblasti aplikované diagnostiky²². Navzdory různým názorům na metodiku diagnostického procesu, z chemického pohledu je závažný jiný fakt, a to požadavek na instrumentaci testů. V posledních letech se ve stanovování látek steroidní povahy dostaly do popředí zájmu metody, které byly dříve pro běžnou klinickou praxi výjimkou – k tomuto vývoji přispěl hlavně rozvoj lepších a citlivějších přístrojů a obecně značný technologický vývoj použitých metod^{23,24}. V důsledku tohoto vývoje tak převládá požadavek na stanovení pomocí HPLC, popř. LC-MS/MS (cit.^{25,26}), a to i v případech, kdy alternativní imunochemická stanovení poskytují výsledky s podobným detekčním limitem i srovnatelnými, nebo lepšími inter- a intra-variálními koeficienty (coefficient of variation, CV). Pojmy inter- a intra-assay CV si pro další text tohoto článku zaslouží krátké vysvětlení. Variační koeficient je obecně definován jako podíl směrodatné odchylky setu měření a aritmetického průměru tohoto setu měření. V imunologii je nejčastěji používán pro vyjádření přesnosti měření. Inter-assay CV vyjadřuje konzistenci výsledků získaných při provádění stejného experimentu na více soupravách – např. při analý-

ze velkého množství vzorků pomocí enzymové imunoanalýzy (ELISA), při které nestačí jedna destička na všechny vzorky. Každá destička pak bude mít své vlastní standardy na kalibraci soupravy a obvykle i set kontrol s vysokou a nízkou koncentrací analytu. Inter-assay CV je pak stanoven jako průměr variačních koeficientů vysokých a nízkých kontrol napříč použitými destičkami. Intra-assay CV vyjadřuje konzistenci výsledků získaných při opakovaném provádění experimentu za stejných podmínek stejným operátorem i způsobem, tedy např. stanovení analytu v jednom vzorku na stejné ELISA destičce vícekrát za sebou. Jedná se tedy *de facto* o vyjádření opakovatelnosti. Imunochemická stanovení také konkurují HPLC a LC-MS/MS metodám neporovnatelně lepší cenou za výsledek použitelný pro klinicko-diagnostickou praxi. V neposlední řadě je třeba také poukázat na skutečnost, že kromě mnohonásobně vyšší ceny za stanovení pomocí instrumentálně-analytických metod je z literatury zřejmé, že pro dosažení kvality stanovení srovnatelné s imunochemickými metodami si LC-MS/MS při stanovování kortizolu, zejména v moči, žádá i náročnou úpravu vzorků před samotnou analýzou, což dále zvyšuje všeobecnou náročnost tohoto přístupu^{27–29}. Je třeba zmínit, že se některé studie snaží zdůraznit opak, tedy že zrovna jejich varianta LC-MS/MS se vyznačuje minimální preanalytickou úpravou vzorků – ale takováto tvrzení se v publikované literatuře zdají být v menšině, pro příklad je zde uveden článek z roku 2010 (cit.³⁰). Tato tvrzení jsou pro přehlednost doložena následujícím příkladem výše zmíněného schématu pro screening hyperkortizolismu dle literatury²⁰, kdy při screeningovém vyšetření majícím za úkol zachytit pacienty s hyperadrenokorticismem bývá v klinické praxi použita jedna, často však i dvě nebo všechny tři (dle rozhodnutí lékaře) uvedené metody. Pro upřesnění použité terminologie: v tomto článku je pojem „cut-off“ používán jako označení pro hraniční koncentraci, při které je výsledek testu ještě považován za normální. Při hodnotách vyšších než je „cut-off“ je výsledek testu vyhodnocen jako abnormální.

1. metoda: supresní test s 1 mg dexametazonu (DST), „cut-off“ 50–138 nmol l⁻¹ po supresi,
2. metoda: tzv. stanovení nočního kortizolu ve slinách (LNSC) – volný kortizol ze vzorku slin odebraných v době kolem 24. hodiny noční, „cut-off“ 14,46 nmol l⁻¹,
3. metoda: volný kortizol v moči sbírané 24 hodin (UFC) s požadavkem na měření LC-MS/MS, „cut-off“ 170 nmol l⁻¹.

V České republice jsou k dispozici doporučení pro diagnostiku, např. na webových stránkách³¹. Ve výše uvedených zdrojích je třeba upozornit na dvě skutečnosti, které v předchozím textu ještě nebyly jednoznačně sděleny. Autoři schématu pro screening a diagnostiku Cushingova syndromu zdůrazňují u stanovování volného močového kortizolu nutnost kompletního 24hodinového sběru moči, a to tak, aby celkový objem a močová koncentrace kreatininu byla adekvátní. Dále je také zajímavá skutečnost, že stanovení nočního slinného kortizolu pomocí ELISA v kombinaci s LC-MS/MS je, podle několika studií^{32,33}, zřejmě spolehlivé pro diagnostiku, neboť zdraví pacienti

mají koncentraci salivárního kortizolu před spaním (kolem půlnoci) zpravidla nižší než 4 nmol l^{-1} . Studie zabývající se metodou LC-MS/MS pro stanovení salivárního kortizolu přitom uvádí pro tuto metodu hodnotu „cut-off“ $2,4 \text{ nmol l}^{-1}$, při které autoři článku uvádí senzitivitu metody na 100 % a specificitu na 98 % pro diagnostiku Cushingova syndromu³⁴. Ani se ale nejedná o příliš výrazné zlepšení parametrů analýzy oproti imunochemickým metodám (viz porovnání s údaji v tab. I).

5. Souhrn analytických metod používaných při stanovení kortizolu, interference při měření

Současné analytické možnosti stanovení kortizolu zahrnují následující nepoužívanější metody: HPLC, popř. LC/MS-MS a imunochemické metody.

Meze detekce a inter- resp. intra-assay CV pro jednotlivé metodiky jsou uvedeny v tab. I. zpracované dle cit.³⁴.

Nejčastější interference při měření, které by mohly, a také v některých případech relativně významně ovlivňují stanovování kortizolu v biologických vzorcích, jsou vyjmenovány níže, pro lepší přehlednost textu jsou uvedeny formou seznamu. Autoři jedné ze studií zabývajících se problematikou vnějších vlivů na hodnoty kortizolu v biologických vzorcích upozornili i na další okolnosti, které hladiny kortizolu i dalších steroidů v biologických vzorcích ovlivňují, ale není možné je jednoduše změnit – jako nejvýraznější vlivy totiž jejich studie vyhodnotila pohlaví a věk³⁵. Tyto faktory je však potřeba spíše brát v potaz v průběhu celého diagnostického postupu a upravovat podle nich očekávané výsledky (je známo, že pacient je kuřák – nebude očekáváno naměření stejných výsledků jako u nekuřáka a podobně) než kvůli nim volit jinou analytickou metodu.

1. Efekt kouření, požívání různých druhů jídel a čištění zubů s použitím nebo bez použití zubní pasty – interference při měření, podle autorů mnoha článků na

toto téma, existuje, ale není podle jednotlivých výrobců komerčních souprav pro stanovení kortizolu přesně kvantifikována.

2. Efekt nedodržení doby odběru – cca kolem 10–20 % při časovém posunu kolem 1 hodiny. K tomu je běžný 23–53% interindividuální rozptyl u ranního kortizolu i při dodržení všech standardních podmínek odběru^{35,36}.
3. Rozdíly mezi jednotlivými etniky – 21,4 % mezi Afroameričany a bělochy³⁷.

Celkově se může jednat o 30–60% odchylky při použití různých postupů a praktik při odběru vzorků a při počítání časové prodlevy při odběrech v hromadných zdravotnických zařízeních.

6. Závěr

V současné době je pro stanovení glukokortikoidů včetně kortizolu k dispozici celá řada metodik s mezí stanovitelnosti v jednotkách nmol l^{-1} . V praxi se stále častěji prosazují metodiky založené na kombinaci chromatografie a hmotnostní spektrometrie, a to vzhledem k požadavkům na stále nižší detekční limity diagnostických metod. Cena těchto zařízení je v řádu milionů korun, oproti tomu cena imunochemických systémů nutných pro analýzu těchto látek se pohybuje v hodnotách řádově nižších. Pořizování takto nákladného vybavení se tím pádem, dle názoru autorů tohoto článku, vyplatí pouze při velkém počtu analyzovaných vzorků, při kterém cena za analýzu jednoho vzorku klesne na podstatně menší částky. Pro pracoviště nakládající s menšími počty vzorků pak může být pořizovací cena vybavení rozhodujícím faktorem ve volbě metody, která je pro analýzu zvolena. Celkové chyby nákladných instrumentálních metod, dané interindividuálními i intraindividuálními rozdíly v sekreci kortizolu, mohou dosahovat až desítek procent. Podle názoru autorů, kteří se v současnosti zabývají analytickými metodami v oblasti endokrinologických parametrů, je cesta směřující k vysoce

Tabulka I

Přehled nejčastěji používaných metod pro stanovení kortizolu v různých typech biologických vzorků. Zpracováno dle literatury³³

Metodika	LOD ^b [nmol l^{-1}]	CV intra [%]	CV inter [%]
EIA sérum ^a	5,0	5,2	6,8
RIA sérum	13,8	4,4	4,9
HPLC sérum	30,0	4,5	6,2
LC-MS/MS ^c sérum	0,03–0,25	3,5–7,1	4,6–12,0
ELISA sliny	0,03	2,8	2,8
LC-MS/MS sliny	0,1–1,4	7,0–7,2	5,8–11,0

^a V metodě využívající stanovení kortizolu ze séra se jedná o stanovení kortizolu celkového, tedy volného i vázaného;

^b LOD = limit of detection. Nejnižší koncentrace kortizolu, kterou je danou metodou možno naměřit; ^c U LC-MS/MS metody jsou uváděny dva sety parametrů zahrnující rozdíly v přípravě vzorků

citlivým, ale současně neobyčejně finančně náročným měřicím systémům pochopitelná. Podle našeho názoru je třeba v každém případě zvážit vypovídající schopnost výsledku získaného metodikou detegující desítky jednotky nmol v litru s chybou preanalytické fáze v řádu několika desítek procent. Navíc výsledky obou typů metod – imunochemických a analytických založených na LC-MS/MS – jsou i podle nejnovějších publikací zcela srovnatelné³⁸.

Seznam zkratek

ACTH	adrenokortikotropní hormon (adrenocorticotropic hormone)
CV	variální koeficient (coefficient of variation)
DST	dexametazonový supresní test (dexamethasone suppression test)
EIA	enzymová imunoanalýza (enzyme immunoassay)
ELISA	typ enzymové imunoanalýzy (enzyme-linked immunosorbent assay)
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (liquid chromatography – mass spectroscopy/mass spectroscopy)
LNSC	stanovení nočního kortizolu ve slinách (late-night salivary cortisol)
LOD	limit detekce metody (limit of detection)
PCS	pseudo-Cushingův syndrom (pseudo-Cushing's syndrome)
UFC	volný kortizol v moči (urinary free cortisol)

LITERATURA

- Chan S., Debono M.: *Ther. Adv. Endocrinol. Metab.* 1, 129 (2010).
- Chung S., Son G. H., Kim K.: *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Basis Dis.* 1812, 581 (2011).
- Clow A., Hucklebridge F., Thorn L.: *Int. Rev. Neurobiol.* 93, 153 (2010).
- Boyar R. M., Witkin M., Carruth A., Ramsey J.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 48, 760 (1979).
- Mezzullo M., Fanelli F., Fazzini A., Gambineri A., Vicennati V., Di Dalmazi G., Pelusi C., Mazza R., Pagotto U., Pasquali R.: *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 163, 103 (2016).
- West A. S., Sennels H. P., Simonsen S. A., Schønsted M., Zielinski A. H., Hansen N. C., Jennum P. J., Sander B., Wolfram F., Iversen H. K.: *Int. J. Med. Sci.* 16, 125 (2019).
- Velghe S., Capiou S., Stove C. P.: *TrAC, Trends Anal. Chem.* 84, 61 (2016).
- Klieber M. A., Underhill C., Hammond G. L., Muller Y. A.: *J. Biol. Chem.* 282, 29594 (2007).
- Sanders K., Kooistra H. S., Galac S.: *Vet. J.* 241, 42 (2018).
- Chabre O.: *Ann. Endocrinol.* 79, 138 (2018).
- Nouvel M., Rabilloud M., Raverot V., Subtil F., Vouillarmet J., Thivolet C., Jouanneau E., Borson-Chazot F., Pugeat M., Raverot G.: *Ann. Endocrinol.* 77, 30 (2016).
- Stewart P. M., Petersenn S.: *Best Pract. Res., Clin. Endocrinol. Metab.* 23, S15 (2009).
- Daniel E., Newell-Price J.: *Medicine* 41, 508 (2013).
- Směrnice České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně *Doporučené postupy pro praktické lékaře.* (ČLS JEP, 2001). <http://docplayer.cz/amp/1992274-Ceska-lekarska-spolecnost-jana-evangelisty-purkyne-doporucene-postupy-pro-prakticke-lekare.html>, staženo 10. 10. 2019.
- Carmichael J. D., v knize: *The Pituitary* (Melmed S., ed.), 3. vyd., kap. 10, str. 343. Academic Press, San Diego 2011.
- Juszczak A., Damian G., Morris D. G., Grossman A. B., Nieman L. K., v knize: *Endocrinology: Adult and Pediatric* (De Groot L. J., de Kretser D. M., Giudice L. C., Grossman A. B., Jameson J. L., Melmed S., Potts J. T. Jr., Weir G. C., ed.), 7. vyd., kap. 13, str. 227. Elsevier Saunders, Philadelphia 2016.
- Cheer K., Trainer P. J., v knize: *Handbook of Clinical Neurology* (Fliers E., Korbonits M., Romijn J. A., ed.), svazek 124, kap. 10, str. 141. Elsevier, Amsterdam 2014.
- Newell-Price J.: *Best Pract. Res., Clin. Endocrinol. Metab.* 23, S5 (2009).
- Papanicolaou D. A., Yanovski J. A., Cutler Jr. G. B., Chrousos G. P., Nieman L. K.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 1163 (1998).
- Nieman L. K., Biller B. M. K., Findling J. W., Newell-Price J., Savage M. O., Stewart P. M., Montori V. M.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93, 1526 (2008).
- Ceccato F. a 10 spoluautorů: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 100, 3856 (2015).
- Hána V., Ježková J., Kosák M., Kršek M., Hána V., Hill M.: *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 192, 105410 (2019).
- Holmes D. T.: *Clin. Mass Spectrom.* 13, 18 (2019).
- Keevil B. G.: *Clin. Biochem.* 49, 989 (2016).
- Cuzzola A., Mazzini F., Petri A.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 94, 203 (2014).
- Kosicka K., Siemiątkowska A., Pałka D., Szpera-Goździewicz A., Bręborowicz G. H., Główna F. K.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 140, 174 (2017).
- Luo A., El Gierari E.-T. M., Nally L. M., Sturmer L. R., Dodd D., Shi R.-Z.: *Steroids* 146, 65 (2019).
- Nadarajah N., Skadberg Ø., Adaway J., Brede C.: *Clin. Mass Spectrom.* 4–5, 1 (2017).
- Nakamura M. a 10 spoluautorů: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 178, 112912 (2019). doi: 10.1016/j.jpba.2019.112912.
- Rauh M.: *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 121, 520 (2010).
- <https://www.prolekare.cz/tema/poruchy-stitne-zlazy/detail/diagnoza-cushingova-syndromu-cast-druha-2237>, staženo 10. 10. 2019.
- Sturmer L. R., Dodd D., Chao C. S. Shi R.-Z.: *Steroids* 129, 35 (2018).

33. Antonelli G., Ceccato F., Artusi C., Marinova M., Plebani M.: *Clin. Chim. Acta* 451, 247 (2015).
34. Gatti R., Antonelli G., Prearo M., Spinella P., Cappellin E., De Palo E. F.: *Clin. Biochem.* 42, 1205 (2009).
35. Eisenhofer G. a 11 spoluautorů: *Clin. Chim. Acta* 470, 115 (2017).
36. Reimondo G., Pia A., Bovio S., Allasino B., Daffara F., Paccotti P., Borretta G., Angeli A., Terzolo M.: *Clin. Chim. Acta* 388, 5 (2008).
37. Peterson L. M., Miller K. G., Wong P. M., Anderson B. P., Kamarck T. W., Matthews K. A., Kirschbaum C., Manuck S. B.: *Health Psychol.* 36, 502 (2017).
38. Oßwald A., Wang R., Beuschlein F., Hartmann M. F., Wudy S. A., Bidlingmaier M., Zopp S., Reincke M., Ritzel K.: *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 190, 193 (2019).

J. Arnoštová, L. Arnoštová, and B. Holubová
(*Department of Biochemistry and Microbiology and Central Laboratories, University of Chemistry and Technology, Prague*): **High Accuracy of Analysis in Clinical Biochemistry. A Necessity or Not?**

Methods for determination of biocompounds in biological samples, mainly molecules of steroid nature, have always been a well-discussed issue. This review is focused on the recent trend in clinical biochemistry, namely the use of methods that provide extreme accuracy for both research and clinical practice, such as liquid chromatography – mass spectroscopy/mass spectroscopy. These highly sophisticated methods may seem to have some advantages over the traditionally employed immunochemical methods (usually various types of enzyme immunoassay, mostly different modes of enzyme-linked immunosorbent assay). However, the former is significantly more costly, more time-consuming (as taken from the pre-analytic phase to verified results), and more demanding with respect to the qualification of the personnel. Thus, this review shows that, in many cases, these drawbacks cannot be compensated for by the benefits.

Keywords: cortisol, Cushing's syndrome, immunochemical methods, diagnostics, clinical chemistry