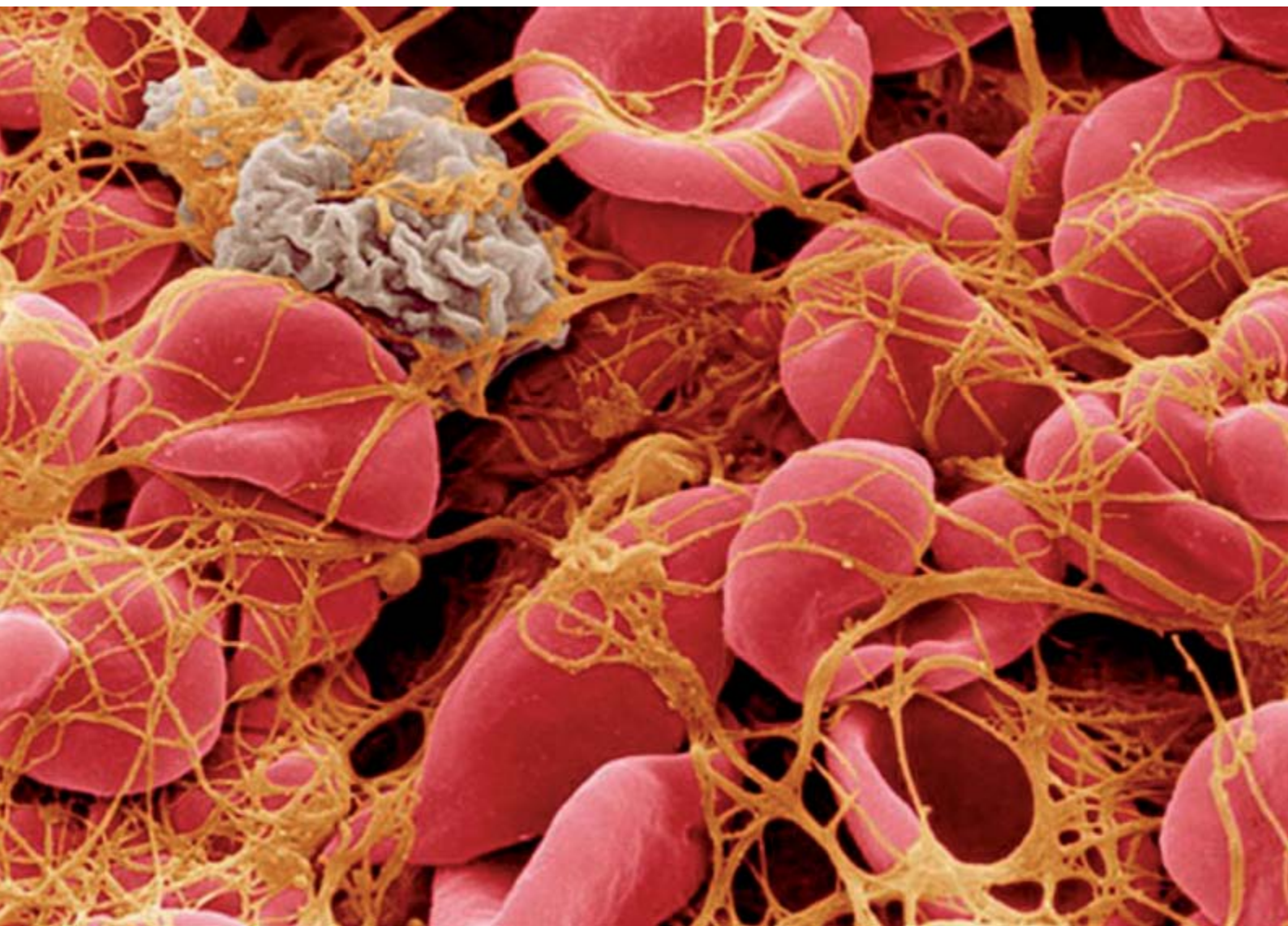


Around the Sample

zeszyt 1 2014 r.

HORIBA
Medical

Biuletyn Laboratoryjnej Diagnostyki Medycznej



- Wrodzona neutropenia – nowoczesna diagnostyka i leczenie
- Początkowe etapy diagnostyki izolowanej leukopenii
- Szpiczak plazmocytowy IgE?
- Gamma-glutamylotranspeptydaza (GGTP) - czy tylko marker w diagnostyce schorzeń wątroby?
- Nadmierna glikacja białek krwi – objaw czy aktywny uczestnik patomechanizmów cukrzycy
- Peptydowe inhibitory enzymu konwertującego angiotensynę I pochodzące z białek żywności
- Czynniki wpływające na wiarygodność oznaczeń lipidowych

Pentra XLR

Wydajność i wiarygodność w Hematologii

Kompaktowy i niezawodny analizator hematologiczny z możliwością oznaczania retikulocytów metodą fluorescencyjną

- 35 parametrów analizowanych z wydajnością 80 próbek na godzinę
- Referencyjne metody oznaczania parametrów krwi
- Kompatybilność ze stacją zarządzająco-walidującą ABX Pentra ML



Pełny panel parametrów retikulocytów z 35uL krwi

RET#: Wartość bezwzględna retikulocytów

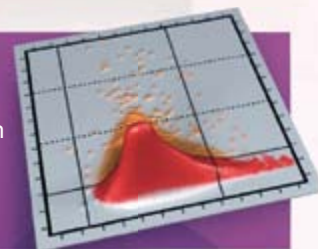
RET%: Wartość procentowa retikulocytów

RETH%, RETM%, RETL%

RHCc: Zawartość komórkowej hemoglobiny w retikulocytach

MRV: Średnia objętość retikulocytów (fl, μm^3)

CRC%: Skorygowany odsetek retikulocytów (%)



Erytroblasty

Retikulocyty

Krwinki czerwone

Szanowni Państwo,

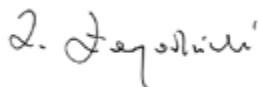
Oddajemy w Państwa ręce pierwszy numer naszego nowego czasopisma Around the Sample, które skierowane jest do diagnostów, lekarzy oraz pragnących pogłębiać swoją wiedzę studentów kierunków medycznych.

Jako firma o zasięgu ogólnosiwiatowym, mająca długoletnią tradycję, proponujemy naukowe podejście do prowadzonej przez nas działalności produkcyjnej i handlowej. W Polsce, naszą działalność skupiamy na medycznej diagnostyce laboratoryjnej, w szczególności na hematologii, biochemii oraz elektroforezie. Prężny Dział Badawczo-Rozwojowy firmy HORIBA nieustannie pracuje nad udoskonaleniem zarówno metod badawczych, jak i walorów konstrukcyjnych zautomatyzowanych analizatorów diagnostycznych. Efektem tych działań jest wprowadzenie na rynek nowych, bardzo nowoczesnych aparatów diagnostycznych i wysokiej jakości odczynników.

Obecne wydanie czasopisma poświęcone jest tematyce hematologicznej oraz biochemicznej z wyraźnym zaakcentowaniem roli hemoglobiny glikowanej, która w dobie wciąż wzrastającej liczby pacjentów diabetologicznych nabiera szczególnej roli w monitorowaniu cukrzycy.

W kąciku „Warto wiedzieć” zawarliśmy edukacyjnie wartościowe materiały, które będą przydatne dla przypomnienia o istotnych dla diagnostyki In vitro tematach.

Życzę Państwu miłej i ciekawej lektury.



dr Zbigniew Łagodziński

Dyrektor Sprzedaży i Marketingu
HORIBA ABX Sp. z o.o.

SPIS TREŚCI

- 3 Wrodzona neutropenia – nowoczesna diagnostyka i leczenie**
SEVERE CONGENITAL NEUTROPENIA – A MODERN DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC APPROACH
Aleksandra Jasińska, Wojciech Młynarski
- 9 Początkowe etapy diagnostyki izolowanej leukopenii**
FIRST DIAGNOSTIC STEPS OF ISOLATED LEUKOPENIA
Kazimierz Sułek, Anna Torska
- 13 Szpiczak plazmocytowy IgE?**
IGE MULTIPLE MYELOMA?
Anna Rodziewicz-Lurzyńska, Dagna Bobilewicz
- 15 Gamma-glutamylotranspeptydaza (GGTP) - czy tylko marker w diagnostyce schorzeń wątroby?**
GAMMA-GLUTAMYLTRANSPEPTIDASE (GGTP) - ONLY A MARKER IN DIAGNOSIS OF LIVER DISEASES OR SOMETHING ELSE?
Aneta Mańkowska-Cyl, Grażyna Odrowąż-Sypniewska
- 20 Nadmierna glikacja białek krwi – objaw czy aktywny uczestnik patomechanizmów cukrzycy**
HYPERGLYCATION OF BLOOD PROTEINS – SYMPTOM OR ACTIVE PARTICIPANT OF DIABETIC PATHOMECHANISMS
Andrzej Szutowicz
- 26 Peptydowe inhibitory enzymu konwertującego angiotensynę I pochodzące z białek żywności**
ANGIOTENSIN I – CONVERTING ENZYME INHIBITORY PEPTIDES DERIVED FROM FOOD PROTEINS
Monika Karaś, Anna Jakubczyk
- 30 Czynniki wpływające na wiarygodność oznaczeń lipidowych**
FACTORS INFLUENCING RELIABILITY OF LIPID TESTING
Wiesław Piechota
- 36 Warto wiedzieć**

Wydawca Around the Sample

HORIBA ABX Sp. z o.o.

Wał Miedzeszyński 598, 03-994 Warszawa

+ 48 22 673 20 22, + 48 22 673 20 26

www.horiba-abx.com.pl

Redaktor koordynujący: dr Zbigniew Łagodziński, Ewa Patoka

Konsultacja naukowa: prof. dr hab. n.med. Dagna M. Bobilewicz

Redakcja: Iwona Knechta

Projekt graficzny: Andrzej Famielec

Skład i łamanie: Gopher U.R.P.

Okładka: Obraz ze skaningowego mikroskopu elektronowego:

krwinki czerwone i białe w siatce fibrynogenu w skrzepie

ISSN 2353-7191

Nakład 1000 egz.

maj 2014

Zasady publikowania prac w Around the Sample

do wglądu u p. Ewy Patoki

e-mail: ewa.patoka@horiba.com

Wrodzona neutropenia – nowoczesna diagnostyka i leczenie

SEVERE CONGENITAL NEUTROPENIA – A MODERN DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC APPROACH

Aleksandra Jasińska, Wojciech Młynarski

Streszczenie

Wrodzone neutropenie stanowią heterogenną grupę pierwotnych niedoborów odporności, których wspólną cechą jest stały spadek liczby krążących granulocytów obojętnochłonnych $<500/\mu\text{l}$. Rozpoznawane są zazwyczaj w okresie niemowlęcym w oparciu o objawy kliniczne, wśród których dominują nawracające stany gorączkowe i infekcje, w szczególności skórne i śluzówkowe, a także ciężkie zapalenia płuc i zakażenia tkanki podskórnej. Neutropenia może być elementem zespołów genetycznych lub stanowić izolowany objaw, jak w ciężkiej wrodzonej neutropenii (SCN). Charakterystyczną cechą SCN jest zahamowanie rozwoju linii granulocytarnej w szpiku kostnym na etapie promielocyta/mielocyta. Obecnie również w Polsce dostępne są badania genetyczne umożliwiające u większości pacjentów rozpoznanie podłoża molekularnego choroby i ustalenie rokowania, a także wdrożenie odpowiedniego leczenia.

Słowa kluczowe:

wrodzona neutropenia, diagnostyka, badania genetyczne

Summary

Congenital neutropenia is a heterogeneous group of primary immune deficiencies, with a common feature of permanent decrease in absolute neutrophil count $<500/\mu\text{l}$. They are usually diagnosed in infancy due to characteristic clinical symptoms, mainly recurrent fevers and infections, including mucosal ulcerations, skin abscesses, severe pneumonia and cellulitis. Neutropenia may be a component of several genetic syndromes or appear as an isolated symptom, as in severe congenital neutropenia (SCN). Maturation arrest at promyelocyte/myelocyte stage is a typical finding in bone marrow smears of SCN patients. Genetic testing is currently available also in Poland, enabling in most cases identification of molecular background of the disease, establishing prognosis, as well as choice of proper treatment.

Keywords:

congenital neutropenia, diagnostics, genetic testing

Adres kontaktowy:

Klinika Pediatrii, Onkologii, Hematologii
i Diabetologii
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
ul. Sporna 36/50
91-738 Łódź
tel. 42 617-77-50

Wrodzone neutropenie stanowią heterogenną grupę pierwotnych niedoborów odporności, których wspólną cechą jest stały, znaczny spadek liczby krążących granulocytów obojętnochłonnych ($<500/\mu\text{l}$). Według danych pochodzących z Międzynarodowego Rejestru Ciężkiej Przewlekłej Neutropenii, częstość występowania wrodzonej neutropenii waha się od 1 do 6 przypadków na milion mieszkańców [1]. Podejrzenie wrodzonej neutropenii stawiane jest zazwyczaj w okresie niemowlęcym w oparciu o objawy kliniczne, wśród których dominują nawracające stany gorączkowe i infekcje; niejednokrotnie jednak choroba rozpoznawana jest w późniejszym okresie życia. Ze względu na kluczową rolę neutrofilów w ochronie błony śluzowej, wśród objawów przeważają

zapalenia przyzębia i owrzodzenia śluzówki jamy ustnej oraz okolic odbytu, częstym problemem są także ciężkie zapalenia płuc, ropnie i zakażenia tkanki podskórnej. Najczęściej dochodzi do infekcji florą endogenną pacjenta. Nie obserwuje się zwiększonej podatności na zakażenia wirusowe, pasożytnicze ani grzybicze, a zwiększona częstość grzybic związana jest przede wszystkim z prowadzoną u tych pacjentów antybiotykoterapią.

Stawiając podejrzenie wrodzonej neutropenii, należy w miarę możliwości wykluczyć stany związane z nabytą neutropenią. Najczęstszą przyczyną izolowanej granulocytopenii u noworodków i niemowląt jest allo- lub autoimmunizacja, która zazwyczaj jest zjawiskiem samoograniczającym się i nie wymaga leczenia. Rozpoznanie może potwierdzić

udokumentowanie obecności przeciwciał przeciwnetrofilowych. Warto jednak podkreślić, że nie jest to badanie rozstrzygające; ujemny wynik badania w kierunku przeciwciał nie wyklucza immunizacji, a przeciwciała wykrywane bywają także u pacjentów z potwierdzoną molekularnie wrodzoną genetycznie uwarunkowaną neutropenią [2].

CIĘŻKA WRODZONA NEUTROPENIA I JEJ PODŁOŻE MOLEKULARNE

W 1950 roku szwedzki lekarz Rolf Kostmann opisał rodzinę cierpiącą na dziedziczącą się autosomalnie recesywnie chorobę przebiegającą z ciężką neutropenią i pojawiającymi się od wczesnego dzieciństwa nawrotowymi ciężkimi infekcjami bakteryjnymi. Dzisiaj wiemy, że ciężka wrodzona neutropenia (SCN, severe congenital neutropenia) to heterogenna grupa chorób o wspólnym fenotypie klinicznym i hematologicznym charakteryzującym się zahamowaniem rozwoju prekursorów neutrofilów w szpiku na etapie promielocyta/mielocyta, z liczbą krążących neutrofilów $<500/\mu\text{l}$ i licznymi infekcjami. Oprócz pierwotnie opisanego jednostki dziedziczonej autosomalnie recesywnie – tradycyjnie zwanej zespołem Kostmanna – znane są dziś formy dziedziczone autosomalnie dominująco, sprzężone z chromosomem X oraz sporadyczne. Aktualna nomenklatura zgodnie z kolejnością identyfikacji poszczególnych genów wyróżnia:

- SCN1 – u której podłoża leżą mutacje genu *ELANE*. Mutacje w genie *ELANE* (dawniej *ELA2*), kodującym elastazę neutrofilową, odpowiadają za około 50-60% przypadków SCN [3][4]. Opisano do tej pory ponad 190 różnych mutacji genu *ELANE* [5], przy czym wykazano, że obecność niektórych mutacji genu *ELANE* jest związana z cięższym przebiegiem klinicznym neutropenii i większym ryzykiem powikłań. U niektórych pacjentów mutacje genu *ELANE* dają natomiast fenotyp w postaci cyklicznej neutropenii.

- SCN2 – opisane dotąd u pojedynczych pacjentów mutacje genu czynnika transkrypcyjnego *GFI1*
- SCN3 – homozygotyczne mutacje *HAX1*

Po 57 latach od pierwszego opisu rodziny obciążonej wrodzoną neutropenią wykazano, że u podłoża autosomalnie recesywnie dziedziczonej SCN leży mutacja genu *HAX1* – ulegającego powszechnej ekspresji białka mitochondrialnego o działaniu antyapoptotycznym zbliżonym do *bcl-2* [6]. U znacznej części pacjentów z mutacją *HAX1* neutropenii towarzyszą zaburzenia neurologiczne, od łagodnego opóźnienia psychoruchowego do ciężkiej padaczki.

- SCN4 – za jego wystąpienie odpowiedzialny jest gen kodujący podjednostkę katalityczną 3 gluko-6-fosfatazy, *G6PC3*

Do chwili obecnej na świecie opisano około 60 pacjentów z SCN4. Z neutropenią zazwyczaj współistnieją wrodzone wady serca oraz układu moczowego, a także charakterystyczny wyraźny rysunek żył powierzchownych [7].

- SCN5 – opisana u pojedynczych rodzin neutropenia przebiegająca z włóknieniem szpiku kostnego, wywołana mutacją genu *VPS45* [8]
- XLN – neutropenię dziedziczną w sposób sprzężony z chromosomem X, wynikającą z mutacji genu *WAS* [9]

Ponadto u pojedynczych pacjentów opisano wrodzoną neutropenię wynikającą z mutacji somatycznej genu receptora dla G-CSF – *CSF3R* [10].

Oprócz izolowanej ciężkiej wrodzonej neutropenii wyróżnia się liczne zespoły, w skład których może wchodzić neutropenia o różnym nasileniu. Te jednostki nozologiczne dzieli się zazwyczaj na grupę zespołów łączących neutropenię z hipopigmentacją oraz grupę wrodzonych zespołów z neutropenią bez hipopigmentacji (Tabela 1).

W ostatnich latach badania molekularne znacznie poszerzyły naszą wiedzę na temat patomechanizmów poszczególnych form SCN, nadal jednak w około 20% przypadków nie znamy tła genetycznego choroby [11].

DIAGNOSTYKA WRODZONEJ NEUTROPENII

Podstawowym krokiem w diagnostyce pacjentów z przewlekłą izolowaną neutropenią jest starannie przeprowadzone badanie podmiotowe i przedmiotowe, dostarczające informacji na temat liczby i rodzajów przebytych infekcji, w szczególności typowych dla granulocytopenii objawów zapalenia jamy ustnej, ucha, czy zatok, zmian skórnych i śluzówkowych, w tym okołoodbytniczych, cech ciężko przebiegających, wymagających hospitalizacji zapaleń płuc lub epizodów posocznicy. Ocenie podlega także dotychczasowy przebieg procesu wzrastania oraz przybór masy ciała, a także obecność dodatkowych objawów charakterystycznych dla zespołów genetycznych przebiegających z neutropenią (Tabela 1). W wywiadzie rodzinnym należy zwrócić uwagę nie tylko na występowanie neutropenii, ale także na niewyjaśnione zgony niemowląt oraz występujące w dzieciństwie choroby mieloproliferacyjne.

W celu wykluczenia wtórnych przyczyn neutropenii wskazane jest wykonanie podstawowych badań biochemicznych w kierunku funkcji wątroby i nerek, niedoborów pokarmowych i niedoborów immunologicznych, a w razie wskazań klinicznych poszerzenie diagnostyki o specjalistyczne badania w kierunku chorób metabolicznych i autoimmunologicznych.

Biopsja aspiracyjna szpiku kostnego jest bardzo cennym badaniem, umożliwiającym identyfikację zaburzeń mielopoezy u pacjentów z neutropenią. Dla ciężkiej wrodzonej neutropenii typowe jest zahamowanie rozwoju linii granulocytarnej na etapie promielocyta/mielocyta, z niewielkim udziałem bardziej dojrzałych form, z kolei w zespole WHIM charakterystyczną cechą jest obecność bardzo licznych, hipersegmentowanych granulocytów.

Zgodnie z zaleceniami panelu ekspertów AIEOP (Associazione Italiana Emato-Oncologia Pediatrica) u pacjentów z ciężkimi infekcjami lub typowymi objawami można rozważyć szybkie wykonanie biopsji szpiku kostnego, aby rozpocząć leczenie G-CSF. W przypadkach bez ciężkich infekcji w wywiadzie należy przez około 6 miesięcy kontrolować morfologię krwi obwodowej, wykonać i ewentualnie powtórzyć badanie w kierunku przeciwciał antyneutrofilowych, dopiero w następnej kolejności rozważyć biopsję szpiku kostnego i badanie genetyczne [12].

W przypadku podejrzenia cyklicznej hematopoezy, ze względu na wysokie prawdopodobieństwo obecności mutacji genu *ELANE*, możliwe jest bezpośrednie skierowanie pacjenta na badanie genetyczne, z pominięciem pośrednich kroków. W razie ujemnego wyniku należy jednak udokumentować cykliczną neutropenię za pomocą badania morfologii krwi obwodowej, powtarzanej 3 x w tygodniu przez co najmniej 6 tygodni. Przed włączeniem G-CSF wskazane jest wykonanie biopsji szpiku kostnego [12].

Proponowany algorytm diagnostyki różnicowej neutropenii przedstawia Rycina 1.

Kierując pacjenta na badanie genetyczne, należy zwrócić szczególną uwagę na cechy kliniczne towarzyszące neutropenii, które mogą umożliwić zróżnicowanie poszczególnych podtypów genetycznych (Tab. 1). Warto jednak pamiętać, że cechy te są w większości niespecyficzne i mogą pojawiać się w różnym nasileniu; niektóre zaś mogą rozwijać się w późniejszym okresie życia. W Polsce badania genetyczne w kierunku wrodzonej neutropenii można wykonać w Pracowni Immunopatologii i Genetyki Kliniki Pediatrii, Onkologii, Hematologii i Diabetologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

MOŻLIWOŚCI TERAPEUTYCZNE I POWIKŁANIA

Przed erą rekombinowanych czynników wzrostu mniej więcej połowa dzieci umierała w pierwszym roku życia z powodu uogólnionych infekcji bakteryjnych. Śmiertelność w kolejnych latach życia sięgała 6-7% rocznie [13]. Rokowanie uległo diametralnej zmianie po wprowadzeniu do leczenia rekombinowanego czynnika wzrostu gra-

nulocytów (G-CSF). Przy codziennym podawaniu G-CSF w dawkach farmakologicznych u 90 do 95% pacjentów z wrodzoną neutropenią obserwuje się wzrost liczby granulocytów $>1000/\mu\text{l}$ i związany z tym spadek zachorowalności oraz liczby hospitalizacji. Większość pacjentów odpowiada na dawki od 3 do $10\mu\text{g/kg/dobę}$. Leczenie zazwyczaj rozpoczyna się od $5\mu\text{g/kg/dobę}$. W przypadku braku adekwatnej reakcji dawka może być zwiększana maksymalnie do $120\mu\text{g/kg/dobę}$; pacjenci nie odpowiadający na dawkę $120\mu\text{g/kg}$ uznawani są za opornych na G-CSF [13].

Wraz ze zwiększeniem przeżywalności pacjentów z neutropenią na pierwszy plan wysunęły się nieinfekcyjne powikłania, przede wszystkim ryzyko rozwoju zespołów mielodysplastycznych (MDS) i ostrej białaczki szpikowej (AML). Dwie podgrupy pacjentów szczególnie narażone na rozwój MDS/AML to pacjenci z mutacjami genów *ELANE* i *HAX1* [14]. Niedawno pojawiły się także doniesienia o transformacji nowotworowej u pacjentów z mutacjami genów *WAS* i *GFI1* [9][15]. Dokładne mechanizmy molekularne prowadzące do transformacji nowotworowej nie są znane. Najczęstsze aberracje genetyczne znajdowane w AML na podłożu SCN to anomalie chromosomu 7 (monosomia 7, 7q-) i trisomia 21. Oprócz nabytych mutacji genu receptora dla G-CSF (*CSF3R*), w SCN/AML znaleziono także mutacje genu *RUNX1*; wykrycie u pacjenta obu tych mutacji może wskazywać na wysokie ryzyko transformacji [16]. W AML na podłożu wrodzonej neutropenii nie są natomiast wykrywane mutacje typowe dla *de novo* AML, takie jak mutacje genów kinaz tyrozynowych *FLT3*, *KIT* i *JAK2*, czy mutacje genów *NPM1*, *CEBPA* i *TP53* [17].

Otwarta pozostaje kwestia wpływu leczenia na ryzyko rozwoju MDS/AML. Wysoka częstość powikłań mieloproliferacyjnych w grupie pacjentów z SCN, szczególnie w obliczu mutacji genu *CSF3R*, budzi podejrzenia wpływu leczenia G-CSF na promocję klonów nowotworowych. Ryzyko transformacji białaczkowej rośnie wraz z dawką G-CSF niezbędną do wywołania odpowiedzi w postaci wzrostu liczby neutrofilów $>1,5 \times 10^9/\text{l}$. Wśród pacjentów, którzy wymagali dawki większej niż $8\mu\text{g/kg}$ na dobę skumulowane ryzyko rozwoju AML wyniosło 40% po 10 latach, wobec 11% ryzyka u pacjentów, u których wystarczała standardowa dawka [18][19]. Większe ryzyko powikłań w grupie otrzymującej wysokie dawki G-CSF niekoniecznie świadczy o negatywnym wpływie leczenia - może jedynie odzwierciedlać stopień ciężkości choroby [14]. W świetle najnowszych danych, częstość występowania MDS/AML na podłożu SCN jest porównywalna z częstością transformacji nowotworowej w innych wrodzonych zespołach

przebiegających z upośledzeniem funkcji szpiku, jak anemii Fanconiego czy *dyskratosi congenita*. Zakończone niedawno badanie przeprowadzone na 374 pacjentach z SCN wykazało ryzyko rozwoju MDS/AML na poziomie 2,3% rocznie po 10 latach, a skumulowane ryzyko AML/MDS po 15 latach leczenia G-CSF wyniosło 22% i osiągnęło plateau podobne do tego obserwowanego w anemii Fanconiego. Warto także pamiętać, że kumulacyjne ryzyko zgonu z powodu posocznicy po 15 latach leczenia G-CSF wynosi 10% i jest znacząco wyższe u pacjentów wymagających wysokich dawek G-CSF [18].

Mutacji genu *CSF3R* nie obserwowano dotąd u pacjentów z cykliczną ani idiopatyczną neutropenią otrzymujących G-CSF i opisano tylko jeden przypadek rozwoju MDS u pacjenta z cykliczną neutropenią. Niemniej jednak, dopóki negatywny wpływ G-CSF nie zostanie wykluczony w wieloletniej obserwacji dużej populacji pacjentów z SCN, zaleca się ostrożność we włączaniu czynnika wzrostu i stosowanie go w minimalnych skutecznych dawkach [13].

Ponieważ rokowanie u większości pacjentów rozwijających MDS/AML na podłożu SCN jest złe, istotne jest wykrycie transformacji w najwcześniejszym możliwym stadium [20]. Niektórzy autorzy zalecają więc regularne monitorowanie szpiku na obecność mutacji *CSF3R* [21], a być może także *RUNX1* [16], nie wszyscy jednak pacjenci z wykrywaną mutacją rozwijają AML/MDS a czas, który upływa od momentu nabycia mutacji do transformacji nowotworowej jest nieprzewidywalny. W obliczu tego, decyzja o przeszczepieniu szpiku u pacjentów dobrze odpowiadających na leczenie G-CSF bez innych cech progresji nowotworo-

wej (jak np. monosomia 7) jest kontrowersyjna [22]. Aktualnie zaleca się strategię wyczekującą, mimo że wyniki leczenia na etapie dokonanej transformacji białaczkowej są niezadowalające [20]. Nadal jednak jedynym możliwym postępowaniem terapeutycznym u pacjentów nie odpowiadających na leczenie G-CSF jest allogeniczny przeszczep szpiku kostnego [23][24].

PERSPEKTYWY NA PRZYSZŁOŚĆ

Chociaż ostatnie lata przyniosły wiele odkryć na polu wrodzonych neutropenii, coraz więcej pytań pozostaje otwartych. Nadal nie potrafimy określić podłoża genetycznego choroby u niemal 20% pacjentów z wrodzoną neutropenią. Mimo licznych prób niewyjaśniony dotąd pozostaje mechanizm, dzięki któremu mutacje w tak różnych, pozornie nie związanych ze sobą genach dają wspólny fenotyp w postaci zahamowania dojrzewania na etapie promielocyta. Przed klinicystami także stoją nowe wyzwania: wchodzące na rynek inne niż filgrastim czynniki wzrostu, a także ich analogi otworzą być może nowe możliwości terapeutyczne; należy jednak mieć na uwadze konieczność uzyskania dowodów na bezpieczeństwo ich stosowania w długotrwałej terapii. Na poprawę jakości życia pacjentów może także wpłynąć rozpoczynające się właśnie badanie włoskie, poszukujące dowodów na bezpieczeństwo i efektywność stosowania pegylowanej formy filgrastimu u pacjentów z SCN. Trwają także prace nad poprawą skuteczności procedur przeszczepowych u pacjentów wymagających tej najbardziej radykalnej formy terapii.

Piśmiennictwo:

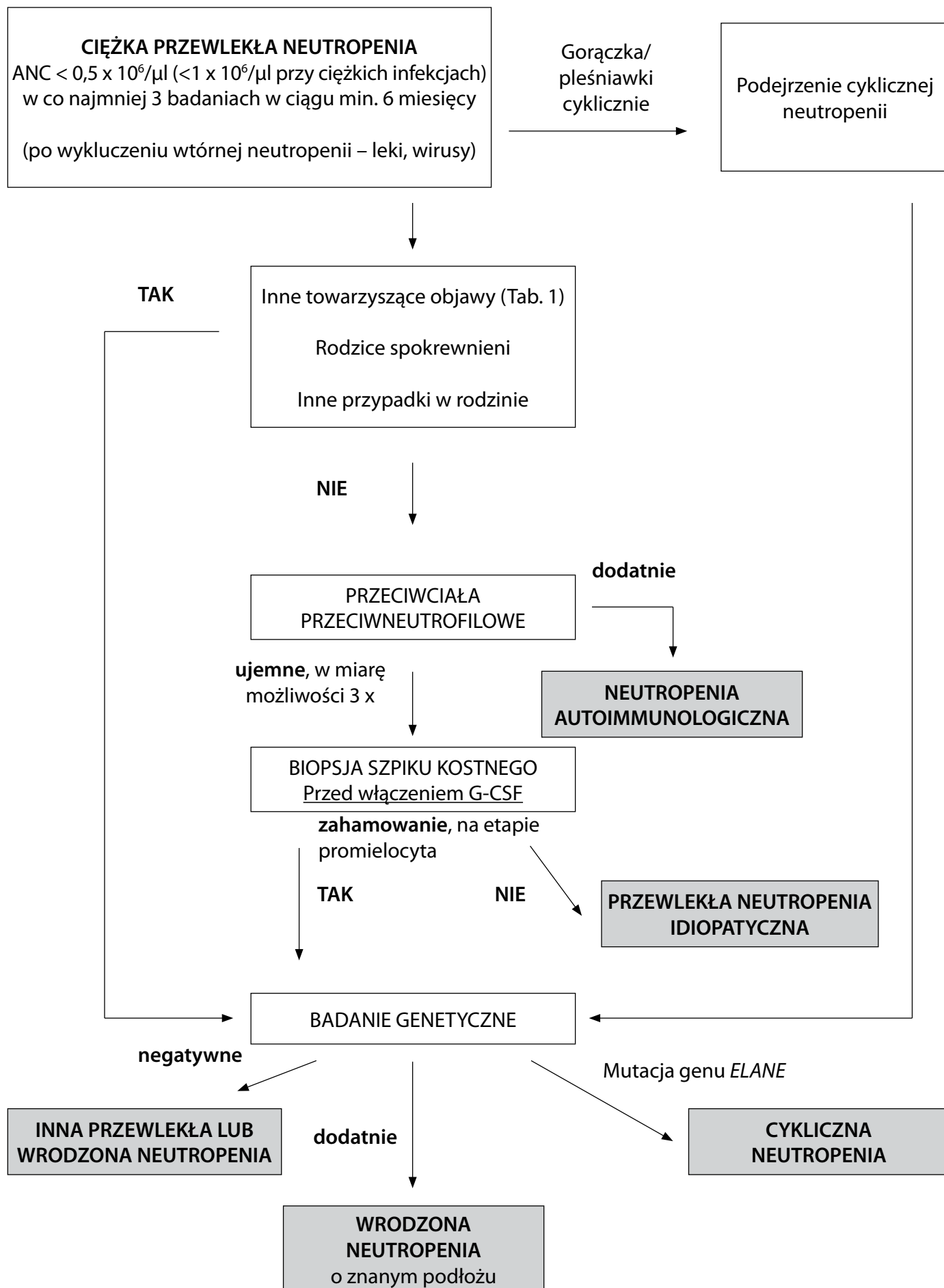
1. Dale DC, Bolyard AA, Schwinger BG i wsp. The Severe Chronic Neutropenia International Registry: 10-Year Follow-up Report. *Support Cancer Ther* 2006; 3: 223-234.
2. James RM, Kinsey SE. The investigation and management of chronic neutropenia in children. *Arch Dis Child* 2006; 91: 852-858.
3. Boxer L. Severe congenital neutropenia: genetics and pathogenesis. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2006; 117: 13-31.
4. Dale DC, Link DC. The many causes of severe congenital neutropenia. *N Engl J Med.* 2009; 360: 3-5.
5. Germeshausen M, Deerberg S, Peter Y i wsp. The spectrum of ELANE mutations and their implication in severe congenital neutropenia. *Hum Mutat* 2013, 34: 905-914.
6. Palmblad J, Papadaki HA. Chronic idiopathic neutropenias and severe congenital neutropenia. *Curr Opin Hematol* 2008, 15: 8-14.
7. Banka S, Newman WG. A clinical and molecular review of ubiquitous glucose-6-phosphatase deficiency caused by G6PC3 mutations. *Orphanet J Rare Dis* 2013; 13: 8-84.
8. Vilboux T, Lev A, Malicdan MC. A congenital neutrophil defect syndrome associated with mutations in VPS45. *N Engl J Med* 2013, 369: 54-65.
9. Beel K, Cotter MM, Blatny J I i wsp. A large kindred with X-linked neutropenia with an I294T mutation of the Wiskott-Aldrich syndrome gene. *Brit J Haematol* 2008; 144: 120-126.
10. Ward AC, van Aesch YM, Gits J i wsp. Novel point mutation in the extracellular domain of the granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) receptor in a case of severe congenital neutropenia hyporesponsive to G-CSF. *J Exp treatment Med* 1999; 190 (4): 497-507.
11. Zeidler C, Germeshausen M, Klein C, Welte K. Clinical implications of ELA2-, HAX1-, and G-CSF-receptor (*CSF3R*)

- mutations in severe congenital neutropenia. *Br J Haemat* 2008; 144: 459-467.
12. Fioredda F, Calvillo M, Bonanomi S i wsp. Congenital and acquired neutropenia consensus guidelines on diagnosis from the Neutropenia Committee of the Marrow Failure Syndrome Group of the AIEOP (Associazione Italiana Emato-Oncologia Pediatrica). *Pediatr Blood Cancer*. 2011; 57 (1): 10-7.
 13. Beekman R, Touw IP. G-CSF and its receptor in myeloid malignancy. *Blood* 2010; 115: 5131-5136.
 14. Rivers A, Slayton W. Congenital neutropenia and bone marrow failure syndrome. *Semin Perinatol* 2009; 33: 20-28.
 15. Khandapour C, Thiede C, Valk P i wsp. A variant allele of Growth Factor Independence 1(GFI1) is associated with acute myeloid leukemia. *Blood* 2010; 115: 2462-2472.
 16. Skokowa J, Steinemann D, Katsman-Kuipers JE. Cooperativity of RUNX1 and CSF3R mutations in the development of leukemia in severe congenital neutropenia: a unique pathway in myeloid leukemogenesis. *Blood*. 2014 Feb 12. [Epub ahead of print]
 17. Link DC, Kunter G, Kasai Y i wsp. Distinct patterns of mutations occurring in de novo AML versus AML arising in the setting of severe congenital neutropenia. *Blood* 2007; 110:1 648-1655.
 18. Rosenberg PS, Alter BP, Bolyard AA i wsp. The incidence of leukemia and mortality from sepsis in patients with severe congenital neutropenia receiving long-term G-CSF therapy. *Blood* 2006;107: 4628-4635.
 19. Zeidler C, Germeshausen M, Klein C, Welte K. Clinical implications of ELA2-, HAX1-, and G-CSF-receptor (CSF3R) mutations in severe congenital neutropenia. *Br J Haemat* 2008; 144: 459-467.
 20. Ferry C, Ouache M, Leblanc T i wsp. Hematopoietic stem cell transplantation in severe congenital neutropenia: experience of the French SCN register. *Bone Marrow Transplant* 2005; 35: 45-50.
 21. Botzug K, Welte K, Zeidler C i wsp. Congenital neutropenia syndromes. *Immunol Allergy Clin N Am* 2008; 28: 259-275
 22. Choi SW, Boxer LA, Pulsipher MA i wsp. Stem cell transplantation in patients with severe congenital neutropenia with evidence of leukemic transformation. *Bone Marrow Transplant* 2005; 35: 473-477.
 23. Friedman MH, Alter BP. Risk of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia in congenital neutropenia. *Semin Hematol* 2002; 39: 128-133.
 24. Filipovich AH. Hematopoietic cell transplantation for correction of primary immunodeficiencies. *Bone Marrow Transplant* 2008; 42: S49-S52.

Tabela 1. Wrodzone zespoły przebiegające z neutropenią

Jednostka chorobowa	Zaburzenie genetyczne	Sposób dziedziczenia	Dodatkowe objawy
SCN1	ELANE	AD	
SCN2	GFI1	AD	monocytoza, limfopenia,
SCN3	HAX1	AR	+/- objawy neurologiczne
SCN4	G6PC3	AR	wady układu sercowo-naczyniowego, moczowo-płciowego, niskorosłość, widoczne żyły powierzchowne
SCN5	VPS45	AR	Mielofibroza
XLN	WAS	XL	Monocytopenia
Zespoły bez hipopigmentacji:			
WHIM	CXCR4	AD	myelokathexis, niedobór IgG, brodawki
Hiper-IgM	CD40L	XL	niedobór IgA, IgG, IgE
Glikogenoza t.1b	G6PT	AR	hipoglikemia, kwasica mleczanowa
Zespół Schwachmana-Diamonda	SBDS	AR	niewydolność wewnątrzwydzielnicza trzustki, niskorosłość, wady szkieletu, niedokrwistość, trombocytopenia
Zespół Bartha	Taz1	XL	miopatia, kardiomiopatia rozstrzeniowa, niskorosłość, enzymopatia mitochondrialna
Reticular dysgenesis	AK2	AR	Ciężki złożony niedobór odporności, niedosłuch odbiorczy
Zespoły z hipopigmentacją:			
Zespół Griscelli t.2	RAB27a	AR	Częściowy albinizm, niedobór IgG, hemofagocytoza
Zespół Chediaka-Higashiego	CHS	AR	Albinizm, zaburzenia chemotaksji limfocytów T/NK
Zespół Hermanskigo-Pudlacka	AP3B1	AR	Częściowy albinizm, niskorosłość, niedobór IgG, skłonność do krwawień
Niedobór p14	p14	AR	Częściowy albinizm, niskorosłość, niedobór IgG

SCN - ciężka wrodzona neutropenia; XLN - neutropenia sprzężona z chromosomem X; AD - autosomalny dominujący; AR - autosomalny recesywny; XL - sprzężony z chromosomem X



Ryc. 1. Proponowany algorytm diagnostyczny wrodzonej neutropenii

Początkowe etapy diagnostyki izolowanej leukopenii

FIRST DIAGNOSTIC STEPS OF ISOLATED LEUKOPENIA

Kazimierz Sułek, Anna Torska

Streszczenie

Pierwszym etapem diagnostyki leukopenii jest ustalenie wpływu na nią linii komórkowej, drugim – czasu trwania oraz nasilenia cytopenii i próba określenia jej patogenezy, co ma znaczenie dla rokowania i postępowania medycznego. W przypadku obu cytopenii (granulocytopenii lub limfocytopenii) mechanizm obejmuje zaburzenia wytwarzania krwinek, przyspieszone niszczenie, niewłaściwe rozmieszczenie na obwodzie lub upośledzone uwalnianie ze szpiku. W diagnostyce granulocytopenii mogą być bardzo pomocne: test hydrokortyzonowy i wysiłkowy. Diagnostyka limfocytopenii jest znacznie trudniejsza i powinna sprowadzać się do ustalenia, która subpopulacja limfocytów jest za nią odpowiedzialna oraz czym może skutkować w odniesieniu do stanu odporności.

Słowa kluczowe:

Granulocytopenia – Limfocytopenia – Patogeneza – Diagnostyka

Summary

First diagnostic step of leukopenia is analysis of the lineage responsible for decrease of total WBC, next step is history of the abnormality and determination of pathogenesis. In both cytopenias (granulocytopenia and lymphocytopenia) mechanism comprises impairment of production, accelerated peripheral consumption, improper peripheral distribution or insufficient release from bone marrow. For diagnostic purposes in case of granulocytopenia hydrocortisone test and exercise test can be very useful. Diagnostics of lymphocytopenia is much more difficult and should aim at establishing which subpopulation of lymphocytes is responsible and what are the clinical consequences of a decrease in the number of these cells.

Keywords:

Granulocytopenia – Lymphocytopenia – Pathogenesis – Diagnosis

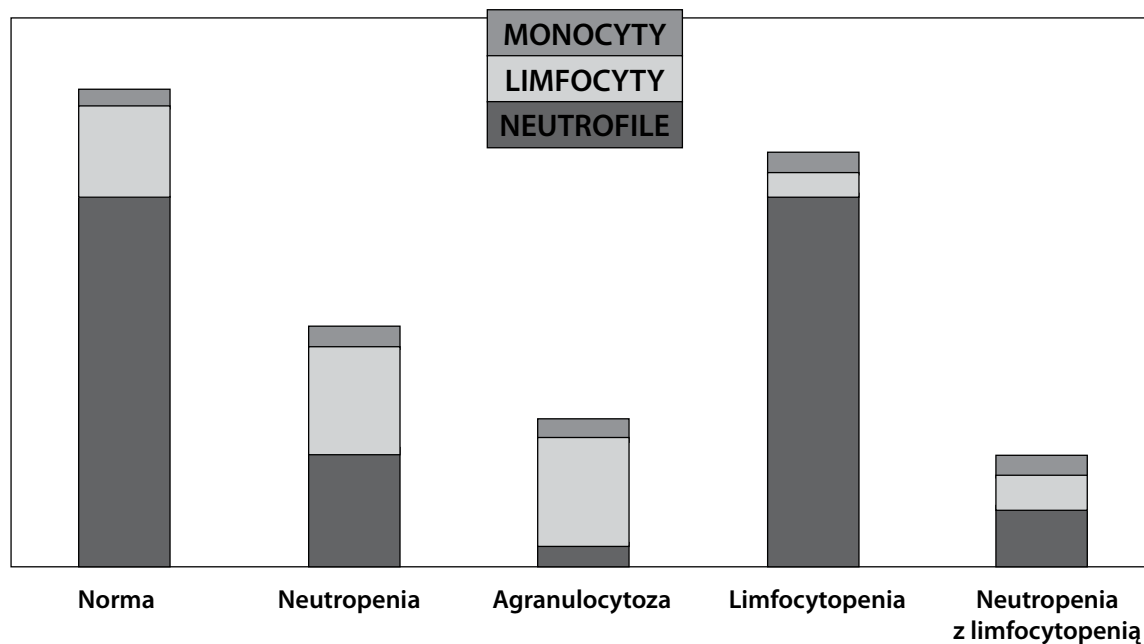
Prawidłowa liczba krwinek białych mieści się w granicach 4 - 10 G/l; z krzywej Gausa wynika jednak, że 5% populacji nie mieści się w tym zakresie i ma wartości wyższe lub niższe. Dlatego wynik poniżej 4,0 G/l nie zawsze należy uważać za nieprawidłowy. Może on być po prostu przykładem osoby zdrowej, której wynik nie mieści się wśród pozostałych 95% członków populacji. W każdym przypadku „nieprawidłowej” liczby leukocytów należy ocenić rozmaz krwi metodą mikroskopową w celu wykrycia potencjalnych przyczyn tego odchylenia.

Poniższy tekst dotyczy przede wszystkim izolowanej leukopenii (czyli bez niedokrwistości i/lub małopłytkowości), wykrytej przypadkowo w trakcie wykonanego rutynowego badania morfologicznego krwi.

Kolejne etapy tego postępowania w przypadku leukopenii są następujące:

Adres kontaktowy:
Klinika Hematologii Wojskowego Instytutu
Medycznego
ul. Szaserów 128
04-141 Warszawa
tel./fax 22 610-83-90

1. Ustalenie, która linia komórkowa jest przyczyną leukopenii: granulocyty czy limfocyty; za istotną klinicznie granulocytopenię przyjmuje się wartość $<1,5$ G/l, natomiast dla limfocytów ta granica wynosi $<1,0$ G/l.
2. Porównanie z poprzednimi wynikami, o ile są dostępne. Jeśli wskazują one na długotrwałość granulocytopenii albo oscylację wartości od mieszczących się w pobliżu dolnej granicy normy (podawanej zwykle przez podręczniki jako wyższe niż 2,0 G/l) do 1,5 G/l, nie ma potrzeby weryfikacji i należy przejść do pkt. 4 niniejszego algorytmu.
3. Jeśli pacjent nie dysponuje żadnymi wcześniejszymi wynikami i obecny wynik jest dla niego zaskoczeniem, ponieważ nie ma żadnych objawów ani nie podlegał działaniu czynników toksycznych, to proponuje się wykonanie kilku kolejnych badań morfologii krwi w odstę-



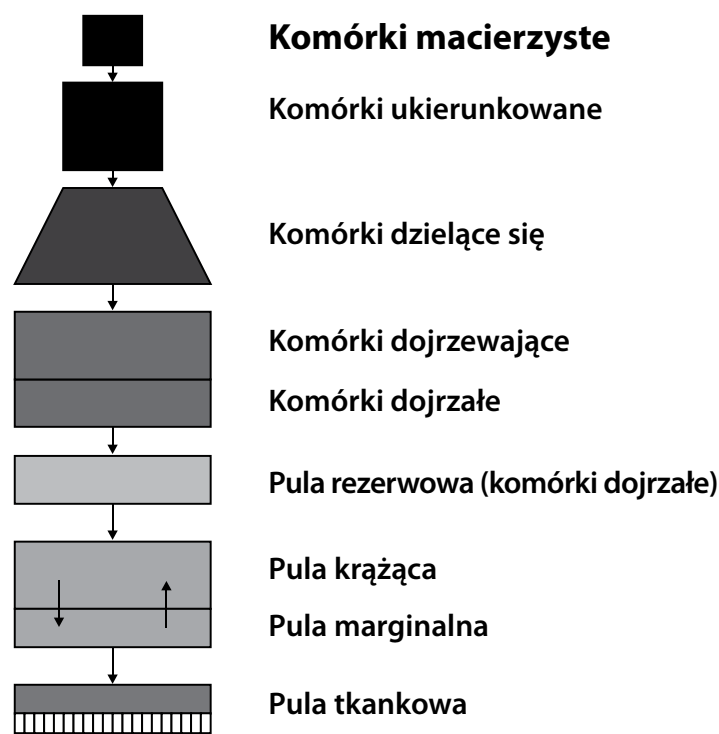
Ryc. 1. Postacie leukopenii

pach 2-3 tygodniowych i następnie poddanie wyników krytycznej interpretacji.

4. Rozważenie możliwej patogenyzy, w tym:
 - zaburzenie wytwarzania granulocytów,
 - niewłaściwe ich rozmieszczenie we krwi,
 - przyspieszone niszczenie lub zużywanie się granulocytów we krwi,
 - upośledzone uwalnianie granulocytów ze szpiku.
5. Wstępne określenie patogenyzy granulocytopenii poprzez ocenę pozostałych linii komórkowych (izolowana, dwu- albo trójliniowa cytopenia) w wyniku badania morfologicznego krwi oraz szczegółowy wywiad dotyczący:
 - pseudoneutropenii,
 - przebytych zakażeń (zwłaszcza wirusowych),
 - stosowania leków,
 - chorób tkanki łącznej i innych o podłożu autoimmunizacyjnym,
 - alkoholizmu i niedożywienia.

Za zaburzeniami wytwarzania może przemawiać wywiad (przebyte choroby, stosowanie leków i oddziaływania czynników toksycznych) oraz głębokość uszkodzenia. Jeśli granulocytopenia ma charakter przewlekły – wszystkie wyniki liczby granulocytów są poniżej normy.

Dopiero teraz przychodzi pora na uzupełnienie dotychczasowych rozważań badaniami dodatkowymi. W sukurs temu postępowaniu przychodzi znajomość fizjologii układu krwiotwórczego i hierarchii oraz kinetyki poszczególnych grup komórek. Przedstawia je w uproszczeniu rycina 2.



Ryc. 2. Hierarchie i pule granulocytów

PULE KOMÓREK UKŁADU GRANULOCYTARNEGO

Istotne klinicznie zaburzenia wytwarzania można wykluczyć przy pomocy oceny wielkości puli rezerwowej (magazynowej) granulocytów w szpiku. Służy temu test hydrokortyzonowy. Wzrost liczby granulocytów po podaniu pacjentowi 3 mg/kg wagi ciała o 2,5 G/l w 3, 4 lub 5 godzinie świadczy o wystarczającej puli i prawidłowej produkcji granulocytów. Taki wynik mówi o tym, że mamy do czynienia raczej z zaburzeniem uwalniania granulocytów ze szpiku i wystarczy silniejszy bodziec (w tym przypadku

– hydrokortyzon), aby granulocyty zostały przesunięte ze szpiku do puli krążącej. W przypadku infekcji rolę czynnika uwalniającego granulocyty ze szpiku do krwi odgrywają m.in. toksyny bakteryjne, np. lipopolisacharydy. Z punktu widzenia interesów ustroju, prawidłowy wynik testu hydrokortyzonowego jest okolicznością pozytywną, bo przemawia za tym, że w razie potrzeby pula rezerwowa zostanie uruchomiona i granulocyty będą przesunięte do krwi w celu walki z infekcją (a to właśnie jest głównym ryzykiem granulocytopenii).

Niewłaściwe rozmieszczenie granulocytów jest bardzo częstym mechanizmem granulocytopenii nazywanej w tej sytuacji pseudoneutropenią. Nie jest ona chorobą, ale stanem niewłaściwego rozmieszczenia granulocytów we krwi (zwiększenie tzw. puli marginalnej granulocytów, które nie krążą we krwi, a jedynie zalegają przy ścianach naczyń lub w śledzionie) – można je „uruchomić” i zmusić do krążenia, np. próbą wysiłkową, próbą z paleniem papierosów lub jeśli tylko nie ma przeciwwskazań – podaniem adrenaliny. W tych przypadkach wzrost odsetka granulocytów o 50 procent w stosunku do wartości wyjściowej pozwala na rozpoznanie zwiększonej „marginalizacji”. Warto dodać, że taki stan czyli pseudoneutropenia nie stwarza ryzyka infekcji, bo granulocyty są obecne we krwi obwodowej, ale z powodu zwiększonej adhezji do ścian śródbłonna naczyniowego (pula marginalna) – nie znajdują się w oczekiwanej liczbie w krążeniu. Przyspieszone niszczenie lub zużywanie granulocytów we krwi jest trudne do laboratoryjnego udowodnienia i zwykle pozostaje w sferze roboczych hipotez. Dochodzi do niego w czasie poważnych zakażeń zwłaszcza bakteryjnych oraz w przypadkach splenomegalii i w mechanizmie autoimmunizacji w wielu chorobach lub nawet bez nich (granulocytopenia autoimmunizacyjna). Brak przeciwciał przeciw-granulocytarnych nie zawsze wyklucza ten patomechanizm.

Upośledzone uwalnianie krwinek ze szpiku zwykle nie wiąże się z poważniejszymi konsekwencjami, ponieważ takie czynniki jak stres, cytokiny lub toksyny bakteryjne są w stanie uruchomić pulę magazynową granulocytów szpikowych. Poniższa tabela prezentuje skróconą diagnostykę patogenetyczną granulocytopenii (patrz tabela str. 12).

Powyższe rozważania wskazują, że możliwe jest uzyskanie dość wysokiej wiarygodności diagnostyki granulocytopenii w trybie ambulatoryjnym bez konieczności uciekania się do inwazyjnych badań, jak np. biopsja aspiracyjna lub trepanobiopsja szpiku kostnego.

Ostatnim etapem postępowania z pacjentem leukopenicznym jest refleksja nad dalszą diagnostyką granulocytopenii, a przede wszystkim rozstrzygnięcie, który pacjent wymaga skierowania do hematologa. Ta decyzja powinna dotyczyć pacjentów z:

- morfologicznymi lub czynnościowymi nieprawidłowościami granulocytów (przede wszystkim wrodzone defekty ujawniające się we wczesnym dzieciństwie, jak: zespoły Shwachmana-Diamonda, Chediak-Higashi, Kostmana, WHIM, rodzinna łagodna neutropenia, neutropenia cykliczna),
- dwu- lub trójukładową cytopenią,
- nieprawidłowościami krwinek czerwonych (autoimmunizacyjne cytopenie),
- obecnością nieprawidłowych limfocytów w rozmazie (ryzyko chorób układu chłonnego, infekcji wirusowej),
- granulocytopenią i obecnością młodych form (reakcje polekowe lub możliwość nowotworowej choroby krwi),
- podejrzeniem stanu dysfunkcji immunologicznej i obecności przeciwciał przeciwkrwinkowych.

Drugą postacią obwodowej leukopenii może być limfocytopenia (monocytopenia ze względu na niewielki odsetek tego szeregu komórek w praktyce nie przyczyna się do obniżenia ogólnej liczby leukocytów).

Gdy leukopenia wynika z limfocytopenii (za istotną klinicznie limfocytopenię uważa się wartość $<1,0$ G/l) szczegółowa diagnostyka jest znacznie trudniejsza, aczkolwiek i w tym przypadku mogą wchodzić w grę podobne mechanizmy, jak:

- upośledzone wytwarzanie (niedobory immunologiczne pierwotne i wtórne),
- przyspieszone niszczenie (radio- i chemioterapia, immunosupresja, SLE, utrata limfocytów),
- nieprawidłowe gromadzenie limfocytów (splenomegalia, zakażenia, oparzenia, sterydoterapia),
- inne.

Niestety brak jest dotąd testów dla weryfikowania tych mechanizmów limfocytopenii.

W patologii osób dorosłych wyraźną przewagę mają przyczyny związane z poważnymi chorobami infekcyjnymi oraz nowotworami krwi i narządów litych. Diagnostyka ta z reguły wymaga zaangażowania hematologa. Z uwagi na rolę limfocytów, pierwszym krokiem w przypadkach ich niedoboru jest wykonanie badania poziomu immunoglobulin, a kolejnym powinna być ocena subpopulacji limfocytów B, T oraz NK. Uszczegółowieniem tej analizy mogłaby być ocena limfocytów cytotoksycznych (CD3+/CD8+) i pomocniczych (CD3+/CD4+).

SCHEMAT DIAGNOSTYKI				
PATOGENEZA	ZABURZENIE WYTWARZANIA	NADMIERNY ROZPAD/ ZUŻYCIE NA OBWODZIE	NIEPRAWIDŁOWE ROZMIESZCZENIE	ZABURZENIE UWALNIANIA ZE SZPIKU
PULA REZERWOWA SZPIKU	brak	prawidłowa/ zmniejszona	prawidłowa	prawidłowa
PULA MARGINALNA	prawidłowa	zwykle zmniejszona	zwiększona	zmniejszona
PULA KRĄŻĄCA	zmniejszona	zmniejszona	zmniejszona	zmniejszona
LICZBA GRANULOCYTÓW	stale niska	stale niska	duże wahania	niska
OBRAZ SZPIKU	ubogi w granulocyty	prawidłowy/ubogi w granulocyty	bogaty w granulocyty	bogaty w granulocyty

Tabela 1. Skrócona diagnostyka patogenetyczna granulocytopenii

Piśmiennictwo:

1. Sułek K., Szulkowska E., Pacjent z leukopenią. W książce pt.: Hematologia w praktyce. Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa, 2008; s. 60.
2. Watts R. G., Neutropenia. W książce pod red. J. P. Greer i wsp. Wintrobe's Clinical Hematology. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia 2004; s. 1777.
3. Christopher M.J, Link D.C. Regulation of neutrophil homeostasis. Curr. Opin. Hematol. 2007; 14: 3-8.
4. Dinanuer M.C., Newburger P.E. The phagocyte system and disorders of granulopoiesis and granulocyte function. W książce pod red. S.H. Orkin i wsp. pt.: Nathan and Oski Hematology of Infancy and Childhood. Saunders Elsevier, 2009; s. 1109.

Szpiczak plazmocytowy IgE?

IGE MULTIPLE MYELOMA?

Anna Rodziewicz-Lurzyńska, Dagna Bobilewicz

Szpiczak plazmocytowy z obecnym białkiem monoklonalnym w klasie IgE jest bardzo rzadką postacią gammapatii monoklonalnych. Obecnie na świecie opisano jedynie kilkadziesiąt przypadków. Dlatego też przedstawienie każdego przypadku wydaje się być celowe.

Opis przypadku

We wrześniu 2013 roku do poradni hematologicznej Centralnego Szpitala Klinicznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w Warszawie został skierowany 65 letni mężczyzna. Jest to chory dializowany, jego wyniki w dniu przyjęcia przedstawiały się następująco:

kreatynina 6,67 mg/dl (590,23 umol/l) [0,50-1,10 mg/dl],

sód 138,4 mmol/l [137,0-149,0],

potas 4,93 mmol/l [3,6-5,0],

fosforany 1,57 mmol/l [0,81-1,45],

wapń 2,37 mmol/l [2,15-2,60],

OB 32 mm [< 8],

białko całkowite 6,6 g/dl [6,2-8,2],

IgA 17 mg/dl [70-400],

IgG 426 mg/dl [700-1600],

IgM 33 mg/dl [40-240].

W kolejnych badaniach stwierdzono białkomocz 3100 mg/dl (w badaniu ogólnym), który stopniowo się obniżał (890 mg/dl, dobowe wydalanie 7,12 g/24 h).

W proteinogramie surowicy stwierdzono hipogammaglobulinemię (A/G 1,79) oraz obecność słabego, dodatkowego prążka we frakcji gamma-globulin.

Adres kontaktowy:

Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej Wydziału Nauki o Zdrowiu

Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

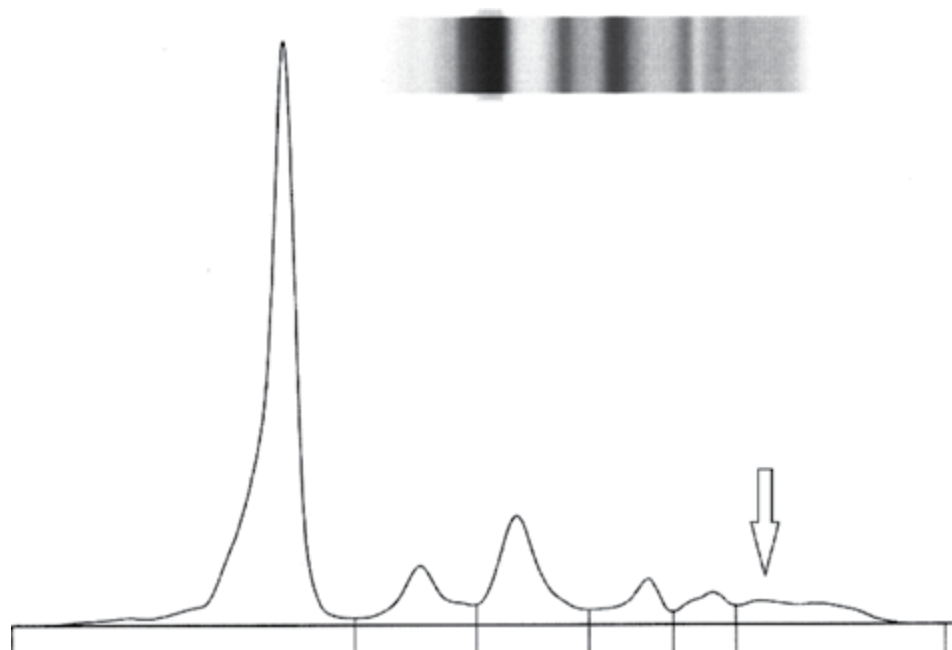
ul. Banacha 1a

02-097 Warszawa

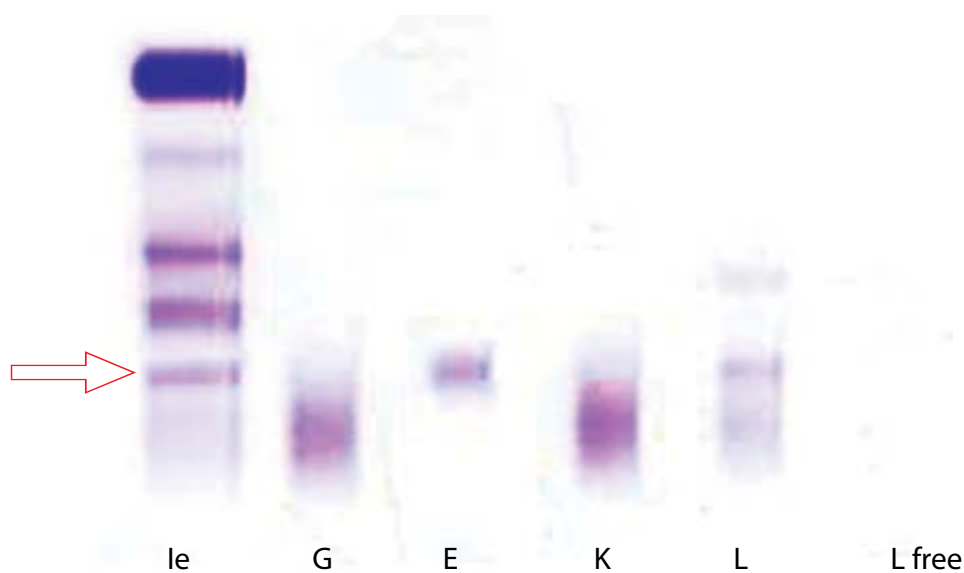
tel. 22 599-24-05

Immunofiksacja potwierdziła obecność białka monoklonalnego IgE typu lambda oraz bardzo małe ilości wolnych lekkich łańcuchów typu lambda. Stosunek wolnych lekkich łańcuchów kappa do lambda w surowicy był obniżony i wynosił 0,27 ($K=69,53$ mg/l, $L=255,53$ mg/l) przy dolnej wartości odniesienia dla pacjentów z niewydolnością nerek 0,37. W moczu stwierdzono obecność małych ilości białka monoklonalnego klasy IgE. Oznaczono również stężenie IgE całkowite, które było podwyższone i wynosiło 268 IU/ml (< 120). Stwierdzono także wysokie stężenie beta 2-mikroglobuliny 27,22 mg/l (0,81-2,19) uznawanej za czynnik prognostyczny szpiczaka.

Pacjent nadal jest dializowany a jego stan ogólny nie ulega pogorszeniu. Natomiast obserwuje się wzrost stężenia IgE w surowicy obecnie 749 IU/ml. W celu dalszej diagnostyki ma zaplanowaną trepanobiopsję.



Ryc. 1. Elektroforeza białek surowicy. Obecny dodatkowy słabo wysycony prążek we frakcji gammaglobulin.



Ryc. 2. Immunofiksacja białek surowicy. Białko monoklonalne w klasie IgE typu lambda oraz bardzo małe ilości białka monoklonalnego wolne lekkie łańcuchy typu lambda.

Gamma-glutamylotranspeptydaza (GGTP) - czy tylko marker w diagnostyce schorzeń wątroby?

GAMMA-GLUTAMYLTRANSPEPTIDASE (GGTP) - ONLY A MARKER IN DIAGNOSIS OF LIVER DISEASES OR SOMETHING ELSE?

Aneta Mańkowska-Cyl, Grażyna Odrowąż-Sypniewska

Streszczenie

Gamma-glutamylotranspeptydaza występuje głównie w komórkach wątroby, natomiast różne czynniki mogą spowodować uwolnienie i wzrost aktywności tego enzymu we krwi. Enzym ten jest szeroko stosowany jako wskaźnik zaburzeń funkcji wątroby i znacznik nadużywania alkoholu. Ponadto może być uważany za „biomarker” stresu oksydacyjnego związany z metabolizmem glutationu i ewentualnie wskaźnik promujący zmiany miażdżycowe ze względu na jego pośredni udział w biochemicznym szlaku utleniania lipoprotein. GGTP może stać się ważnym elementem w wieloczynnikowej ocenie ryzyka sercowo-naczyniowego. Zwiększona aktywność znaczników enzymatycznych zaburzeń funkcji wątroby, w tym niealkoholowego stłuszczenia wątroby (NAFLD), a przede wszystkim GGTP jest obserwowana w zespole metabolicznym i jego powikłaniach. Zatem podwyższona aktywność GGTP nie zawsze musi wskazywać na zwiększone spożycie alkoholu, zapalenie czy zaburzenia funkcji wątroby, ale może również sugerować istnienie zespołu metabolicznego z jego szkodliwymi konsekwencjami. Włączenie GGTP do algorytmu diagnostycznego może stanowić wartość dodaną w stratyfikacji ryzyka sercowo-naczyniowego w nadziei na możliwość zapobiegania niepotrzebnym zdarzeniom sercowym i zgonom w przyszłości.

Adres kontaktowy:

Katedra i Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej
Collegium Medicum UMK w Bydgoszczy
ul. M. Skłodowskiej-Curie 9
85-094 Bydgoszcz,
tel. 52 585-44-90; fax 52 585-36-03

Słowa kluczowe:

gamma-glutamylotranspeptydaza, choroby wątroby, otyłość, zespół metaboliczny, ryzyko sercowo-naczyniowe

Summary

Gamma-glutamyltranspeptidase is found mainly in the liver cells and various factors can cause the release and increase in the activity of this enzyme in the circulation. Serum GGTP has been widely used as an index of liver dysfunction and marker of alcohol intake. Moreover, it may be considered a biomarker for „oxidative stress” associated with glutathione metabolism and possibly a „proatherogenic” marker due to its indirect contribution to low-density lipoprotein cholesterol oxidation. GGTP is becoming an important addition to the multimarker approach in cardiovascular risk evaluation. Elevations of enzymatic markers of liver dysfunction, including non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), such as gamma-glutamyltranspeptidase, are considered as part of the metabolic syndrome and related complications. Therefore, elevated levels of GGTP may not always indicate increased alcohol consumption, hepatitis and fatty liver disease, but may also suggest the existence of the metabolic syndrome with its subsequent deleterious consequences. It is suggested to consider GGTP may potentially add diagnostic value in stratifying patient’s cardiovascular risk with hope of preventing unnecessary cardiac events and deaths in the future.

Keywords:

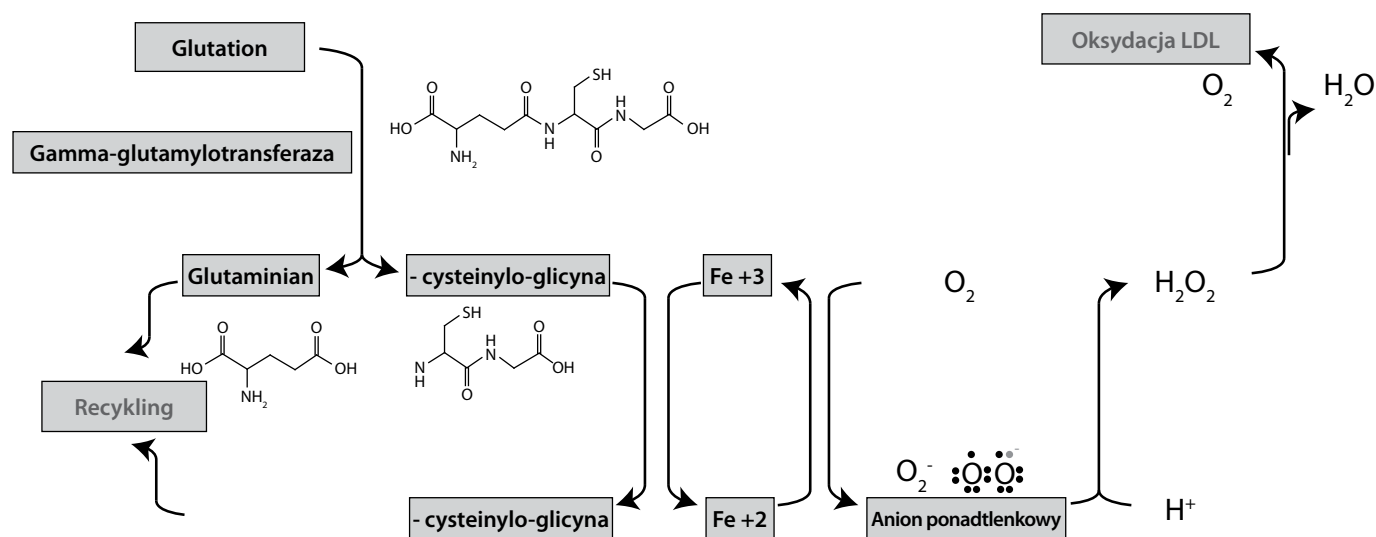
gamma-glutamyltranspeptidase, liver diseases, obesity, metabolic syndrome, cardiovascular risk

G GTP i jej biologiczna rola

Gamma-glutamylotranspeptydaza (w skrócie GGTP, GGT lub γ -GT) to enzym, który odpowiada za transport aminokwasów przez błony komórkowe. Jego głównym zadaniem jest przenoszenie reszty γ -glutamylowej z glutationu na aminokwasy czy małe peptydy. Glutathion to substancja zbudowana z kwasu glutaminowego, cysteiny i glicyny. Jego cechą charakterystyczną jest to, że reszta glutaminianu jest spięta z resztą cysteiny poprzez grupę karbo-

ksylową znajdującą się w pozycji gamma (a nie alfa, jak to ma miejsce we wszystkich innych połączeniach peptydowych). Glutathion poza wieloma różnymi zadaniami pełni bardzo ważną funkcję, chroniąc organizm przed wolnymi rodnikami, jako antyoksydant neutralizuje wolne rodniki w wątrobie. Wytwarzany jest wewnątrz komórek, gdy wydostanie się na zewnątrz komórki ulega rozkładowi. W rozpadzie zewnątrzkomórkowego glutathionu uczestniczy GGTP. Transferaza ta jest zaczepiona w membranach różnych komórek a jej

centrum aktywne wystaje na zewnątrz. GGTP rozdziela to nietypowe wiązanie zespalaające glutaminian i cysteinę, natomiast kwas glutaminowy zostaje powiązany z innym aminokwasem i w tej formie jest przemieszczany do komórek (gdzie ulega recyklingowi, czyli może zostać jeszcze raz włączony do kolejnej cząsteczki glutationu) (Ryc. 1).



Ryc. 1. Etapy reakcji enzymatycznej gamma-glutamylotransferazy oraz jej związek z utlenianiem lipoprotein o małej gęstości (LDL) [3]

GGTP występuje głównie w komórkach wątroby, a różne czynniki mogą spowodować uwalnianie i wzrost aktywności tego enzymu we krwi [1, 2].

GGTP w chorobach wątroby i dróg żółciowych

Jak wspomniano powyżej, transferaza ta jest związana z błonami plazmatycznymi (siateczka śródplazmatyczna) komórek, występującymi głównie w okolicy wątroby (nabłonek wewnątrzwątrobowych dróg żółciowych oraz błona komórkowa bieguna kanalikowego hepatocytów), nerek (komórki proksymalnych kanalików nerkowych), trzustki (komórki zrazików oraz przewodów), jelit, płuc, śledziony i innych tkanek. Uważa się, że enzym ten jest najbardziej czułym wskaźnikiem w diagnostyce schorzeń wątroby i dróg żółciowych z czułością wynoszącą 95%. GGTP przeważnie jest pierwszym enzymem, którego wzrost aktywności obserwuje się w wyniku zablokowania odpływu żółci przez przewody żółciowe (cholestaza spowodowana kamicą żółciową lub nowotworem). Jednak jego wadą jest to, iż często stwierdza się podwyższoną aktywność we krwi pomimo braku procesu chorobowego w wątrobie. Swoistość w stosunku do osób zdrowych wynosi 96%, a w stosunku do chorych na choroby pozawątrobowe jedynie 74%. Z tego też powodu GGTP jest wykorzystywana do określenia źródła podwyższonej aktywności fosfatazy zasadowej (ALP) w osoczu. Jeśli dochodzi

do jednoczesnego wzrostu obu wskaźników ALP i GGTP, wówczas można założyć, że źródłem zwiększonej aktywności ALP są drogi żółciowe [4, 5]. W przypadku zaburzeń metabolizmu kości wzrasta aktywność ALP całkowitej. Zatem jeżeli u osoby z podwyższoną aktywnością ALP, GGTP jest prawidłowa, przyczyną jest najpraw-

dopodobniej nasilony metabolizm tkanki kostnej (np. w osteoporozie). Znaczny wzrost aktywności GGTP obserwuje się przede wszystkim w przypadku upośledzenia wydzielania enzymu z żółcią (żółtaczka zastoinowa, cholestaza wewnątrzwątrobową i zewnątrzwątrobową), w intensywnym nowotworzeniu się tkanek, czyli intensywnych przemianach aminokwasów i białek (nowotwory o dużej dynamice wzrostu, w przerzutach nowotworowych do wątroby) oraz w przypadku indukcji enzymów mikrosomalnych wątroby substancjami takimi jak leki (zwłaszcza neuroleptyczne i barbiturany) czy alkohol. GGTP nie jest natomiast swoistym wskaźnikiem do różnicowania uszkodzeń wątroby, dlatego wówczas zaleca się również oznaczanie aktywności aminotransferaz oraz ALP [5, 6].

GGTP w monitorowaniu abstynencji

Kolejnym powszechnym zastosowaniem GGTP w diagnostyce jest ocena aktywności enzymu w celu kontroli abstynencji u alkoholików poddawanych leczeniu. Silnym bodźcem wzrostu aktywności tej transferazy jest spożycie alkoholu. Metaboliczne skutki nadużywania alkoholu obejmują wzrost konwersji acetylo-CoA do triglicerydów (TG), które są wydzielane do krwi w postaci lipoprotein o bardzo niskiej gęstości (VLDL), nagromadzenie tłuszczu w wątrobie

z nadmiarem produkcji TG i wzrost GGTP oraz innych enzymów wątrobowych, jak również przyrost masy ciała w wyniku nadmiaru spożywanej energii pochodzącej z alkoholu (ok. 29 kJ/g). Osoby przewlekłe i umiarkowanie nadużywające alkoholu mają podwyższoną aktywność GGTP we krwi w porównaniu do abstynentów. Należy również pamiętać, że nawet niewielkie ilości alkoholu spożyte w ciągu 24 godz. przed pobraniem krwi mogą spowodować wzrost aktywności GGTP. W takim przypadku wskazane jest powtórzenie badania [7]. W przewlekłym nadużywaniu alkoholu (indukcja enzymu lub choroba wątroby) obok wzrostu aktywności GGTP obserwowane bywa również podwyższenie stężenia bilirubiny we krwi oraz wzrost aktywności ALP, które nasuwają podejrzenie współistniejącej cholestazy [8]. Zatem pomiar aktywności GGTP jest pomocny w śledzeniu abstynencji u alkoholików podczas terapii odwykowej. Abstynencja powoduje normalizację aktywności GGTP w ciągu 2-5 tygodni, aktywność enzymu spada o połowę w ciągu ok. 3 tygodni, co wynika z czasu półtrwania enzymu [4].

GGTP jako wskaźnik ryzyka sercowo-naczyniowego

Najnowsze badania skupiają większą uwagę nad użytecznością oznaczania GGTP jako czynnika prognostycznego w chorobach układu krążenia. Jak podano wcześniej, GGTP hydrolizuje glutation do glutaminianu i dipeptydu cysteinylo-glicyny, a wewnątrz komórek aminokwasy są następnie ponownie wykorzystane do produkcji dodatkowych ilości zredukowanego glutationu. Jednakże, na błonie komórkowej i w przestrzeni pozakomórkowej grupy w postaci cysteinylo-glicyny mogą działać jako silny środek redukujący żelazo, zdolny do jednoczesnego generowania Fe^{2+} , wraz ze stopniowym rozwojem anionu ponadtlenkowego i nadtlenku wodoru. Oba oksydanty mogą powodować utlenianie lipoprotein o niskiej gęstości (LDL) do formy ox-LDL, odgrywającej istotną rolę w nasileniu procesu miażdżycowego i prawdopodobnie innych procesów, takich jak aktywacja metaloproteinaz, proliferacja komórek i apoptoza (Ryc. 1, 2). Uczestnictwo cząsteczek ox-LDL w tworzeniu zmian miażdżycowych w ścianie naczyń stanowi podłoże chorób układu sercowo-naczyniowego [3, 9]. Stąd też w przebiegu zawału mięśnia sercowego obserwuje się niewielki wzrost GGTP, który może być związany z zastojem krążenia w wątrobie [4]. Aktywność GGTP może też wzrastać w niewydolności serca. Badania wykazują, że u osób z podwyższoną aktywnością GGTP występuje wyższe ryzyko zgonu z powodu chorób serca, lecz nie ustalono jeszcze dokładnie

przyczyny tej zależności.

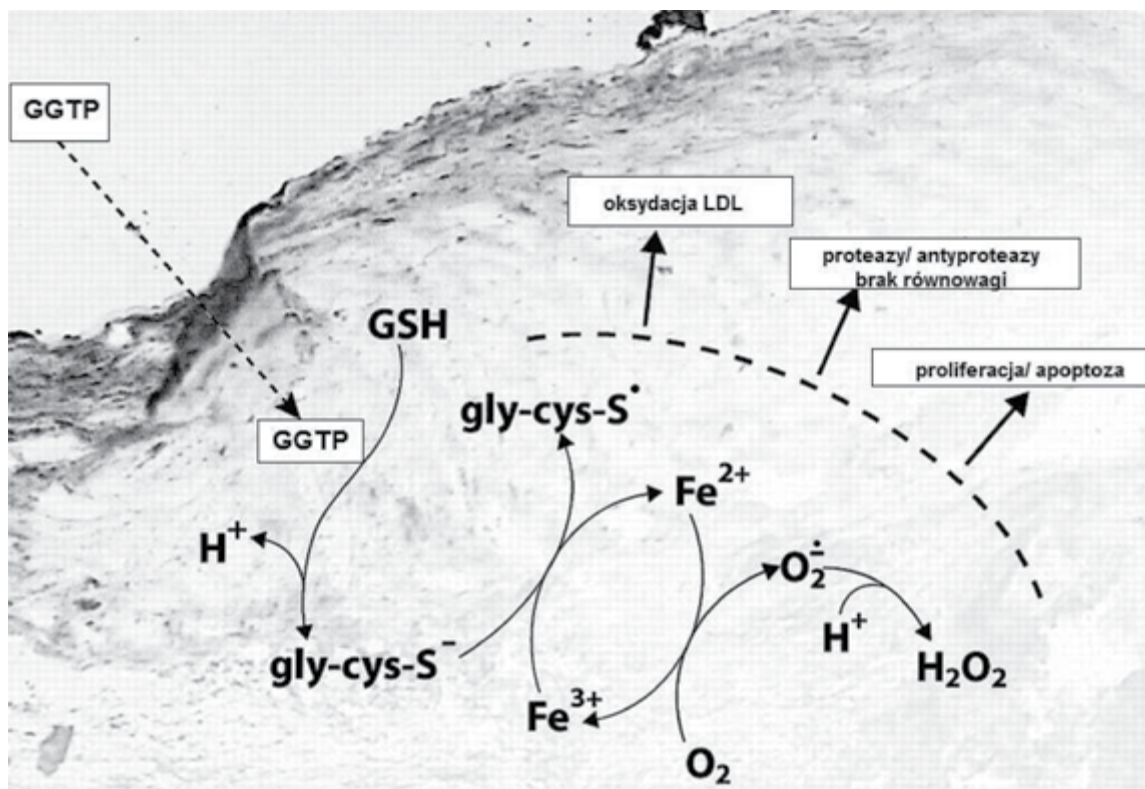
Inne doniesienia sugerują, iż podwyższona aktywność GGTP może być traktowana jako kolejny marker zagrożenia zawałem mięśnia serca. Jak wiadomo, do wzrostu aktywności GGTP dochodzi m.in. w warunkach zwiększonego spożycia alkoholu, uszkodzenia wątroby, także w przebiegu jej stłuszczenia. Opisywany związek aktywności enzymu z ryzykiem zawału mięśnia serca jest najprawdopodobniej elementem większej całości, czyli występowania zespołu metabolicznego, jako czynnika ryzyka rozwoju chorób układu krążenia. Dlatego stwierdzenie u pacjenta wzrostu aktywności GGTP powinno skłonić lekarza do przeprowadzenia dokładnej oceny ryzyka sercowo-naczyniowego [10].

Jak podkreślają Mason i wsp. GGTP może być uważana za „biomarker” stresu oksydacyjnego związany z metabolizmem glutationu i ewentualnie wskaźnik promujący zmiany miażdżycowe ze względu na jej pośredni udział w biochemicznym szlaku utleniania LDL. GGTP może stać się ważnym elementem w wieloczynnikowej ocenie ryzyka sercowo-naczyniowego i markerem prognostycznym. Autorzy sugerują uznanie GGTP jako cennego dodatkowego wskaźnika w stratyfikacji ryzyka pacjentów i w doborze właściwego leczenia, w nadziei na możliwość zapobiegania niepotrzebnym zdarzeniom sercowym i zgonom w przyszłości [3].

GGTP a związek z zaburzeniami metabolicznymi

Jednym z poważniejszych zadań współczesnej medycyny jest walka z otyłością, która jest ogólnoustrojową chorobą metaboliczną i jej powikłaniami. Wiele badań z ostatnich lat dowodzi, iż nieprawidłowej masie ciała, szczególnie współwystępującej wraz z innymi zaburzeniami, jak insulinooporność, dyslipidemia i nadciśnienie tętnicze w obrazie zespołu metabolicznego, często towarzyszy podwyższona aktywność GGTP we krwi [11, 12, 13, 14]. Mechanizm zależności między insulinoopornością i dyslipidemią w zespole metabolicznym a wzrostem aktywności GGTP nie został jeszcze do końca wyjaśniony.

Suh i wsp. zwracają uwagę na dodatnią zależność pomiędzy występowaniem otyłości a aktywnością GGTP. Badanie to, przeprowadzone w dużej grupie osób sugeruje, iż wzrost aktywności GGTP we krwi może być wczesnym markerem predykcyjnym otyłości. Co więcej, związek ten pozostaje istotny po uwzględnieniu wielu podstawowych zmiennych towarzyszących. Stwierdzono także istotny związek GGTP z rozwojem ciężkiej otyłości i otyłości brzusznej. Po raz kolejny zwrócono uwagę na fakt, iż



Ryc. 2. Udział GGTP w metabolizmie glutationu w płycie miazdżycowej i jego konsekwencje. GSH- glutation [9]

osoby z podwyższoną aktywnością GGTP powinny być traktowane jako chorzy podwyższonego ryzyka [15].

Doniesienia Onat i wsp. wskazują również na związek GGTP z wieloma zaburzeniami metabolicznymi. Jakkolwiek wzrost aktywności GGTP jest istotnie związany ze stresem oksydacyjnym i stłuszczeniem wątroby, jej kliniczna użyteczność w określaniu ryzyka incydentów sercowych, wystąpienia zespołu metabolicznego czy cukrzycy typu 2 musi być jeszcze poddana dalszym badaniom [16]. Badania własne, których wyniki są obecnie przygotowywane do publikacji, przeprowadzone w grupie młodych otyłych kobiet i kobiet z prawidłową masą ciała, potwierdzają zwiększoną częstość występowania podwyższonej aktywności GGTP u kobiet otyłych (17,1%), zwłaszcza u otyłych ze zwiększonym ryzykiem zaburzeń metabolicznych. Mając na uwadze związek podwyższonej aktywności GGTP z insulinoopornością i otyłością, zaobserwowaliśmy również słabą, ale znaczącą korelację GGTP ze wskaźnikiem HOMA i stężeniem insuliny oraz parametrami antropometrycznymi w grupie kobiet otyłych. U tych kobiet w surowicy aktywność GGTP powyżej 17 U/L okazała się być predyktorem, odpowiednio: podwyższonego stężenia apolipoproteinyB, współczynników aterogenności TG/HDL-C, TC/HDL-C lub ApoB/ApoA-I z ilorazem szans 8.7, 5.9, 3.8 i 3.5 odpowiednio. Co więcej, wykazaliśmy, że wzrost aktywności GGTP pozwala przewidzieć wystąpienie insulinooporności i podwyższonego ciśnienia rozkurczowego

krwi (iloraz szans 2.6 i 2.9, odpowiednio). Wyniki te sugerują możliwość wnioskowania, że zwiększenie aktywności enzymów wątrobowych, szczególnie GGTP, może odzwierciedlać zmiany metaboliczne oraz może służyć jako kliniczny wskaźnik oporności na insulinę. Podsumowując całość naszych badań, wyniki wskazują, że u młodych otyłych kobiet GGTP jest związana nie tylko z insulinoopornością i niekorzystnym profilem lipoprotein, ale może również być pomocna w odróżnieniu osób otyłych metabolicznie „zdrowych” od osób otyłych z ryzykiem zaburzeń metabolicznych. Oznaczenie GGTP wydaje się być przydatne do oceny ryzyka wystąpienia zaburzeń metabolicznych związanych z otyłością.

Występowanie nadmiernej masy ciała bywa często nieślusnie bagatelizowane. Otyłość polegająca na zwiększeniu masy tkanki tłuszczowej w organizmie, w szczególności zlokalizowanej centralnie, może doprowadzić do zaburzeń w działaniu wielu narządów. Otyłość ściśle wiąże się z występowaniem wielu zaburzeń, o których wspomniano powyżej, jednak poważnym powikłaniem jest stłuszczenie wątroby. Niewielu dorosłych ma świadomość, że stłuszczenie wątroby związane z otyłością jest przewlekłym uszkodzeniem wątroby, przypominającym alkoholowe zapalenie wątroby u alkoholików. Ta choroba może postępować aż do marskości wątroby, jej niewydolności, a nawet powstania nowotworu. Otyłość ściśle związana z insulinoopornością, która ma

największe znaczenie w rozwoju stłuszczenia wątroby, uważana jest jako czynnik ryzyka niealkoholowego stłuszczenia wątroby (NAFLD) [17, 18]. NAFLD ściśle związane z otyłością i odkładaniem tłuszczu w okolicy trzewnej, jest obecnie uważane za cechę zespołu oporności na insulinę. Obecność zwiększonej masy trzewnej tkanki tłuszczowej znacznie zwiększa ryzyko wystąpienia cukrzycy typu 2. Dlatego też według najnowszych doniesień zwiększona aktywność znaczników enzymatycznych zaburzenia funkcji wątroby i NAFLD, takich jak chociażby opisywana GGTP, może być uznawana jako jedno z kryteriów zespołu metabolicznego [19].

Podsumowanie

Wysoka aktywność GGTP we krwi jest przydatna w oce-

nie funkcji wątroby i toksyczności alkoholu, zaburzeń funkcji dróg żółciowych, stłuszczenia wątroby czy zapalenia wątroby.

Ponadto GGTP jest uznawana jako biomarker stresu oksydacyjnego oraz czynnik promujący zmiany miażdżycowe ze względu na jej pośredni związek z utlenianiem lipoprotein o niskiej gęstości. GGTP jest również uważana za niezależny marker ryzyka rozwoju chorób sercowo-naczyniowych. Sugeruje się więc, że jest potencjalnie cennym dodatkiem do rosnącej listy dostępnych badań laboratoryjnych przydatnych w stratyfikacji ryzyka pacjentów.

Poza tym wartości GGTP, zwłaszcza w górnym zakresie przedziału referencyjnego, są silnym niezależnym biomarkerem zespołu metabolicznego.

Piśmienictwo:

1. Murray RK: Biochemia Harpera. Warszawa: PZWL, 2005.
2. Whitfield JB. Gamma-glutamyl transferase. Crit Rev Clin Lab Sci. 2001; 38: 263–355.
3. Mason JE, Starke RD, Van Kirk JE: Gamma-glutamyl transferase: a novel cardiovascular risk biomarker. Prev Cardiol. 2010; 13(1): 36–41.
4. Dembińska-Kieć A, Naskalski JW: Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej. Wrocław: Elsevier Urban & Partner Wydawnictwo, 2009.
5. Neumeister B, Besenthal I, Liebich H: Diagnostyka laboratoryjna. Wrocław: Książka Medyczne Urban & Partner, 2003.
6. Tomaszewski J: Diagnostyka laboratoryjna. Warszawa: PZWL, 2001.
7. Haren MT, Li M, Petkov J, McDermott RA: Alcohol, metabolic risk and elevated serum gamma-glutamyl transferase (GGT) in Indigenous Australians. BMC Public Health. 2010; 3(10): 454.
8. Szymańska M, Prystupa A, Koprianiuk-Sowińska A, Schabowski J, Mosiewicz J: Alkoholowa choroba wątroby w praktyce lekarskiej. Medycyna Ogólna i Nauki o Zdrowiu, 2011; 17(3): 148–154.
9. Emdin M, Pompella A, Paolicchi A. Gamma-glutamyltransferase, atherosclerosis, and cardiovascular disease: triggering oxidative stress within the plaque. Circulation. 2005; 112: 2078–2080.
10. Emiroglu MY, Esen OB, Bulut M, Karapinar H, Kaya Z, Akcakoyun M, Kargin R, Aung SM, Alizade E, Pala S, Esen AM: GGT levels in type II diabetic patients with acute coronary syndrome (does diabetes have any effect on GGT levels in acute coronary syndrome?). Acta Diabetol. 2013; 50(1): 21–5.
11. Banderas DZ, Escobedo J, Gonzalez E, Liceaga MG, Ramirez JC, Castro MG: γ -Glutamyl transferase: a marker of nonalcoholic fatty liver disease in patients with the metabolic syndrome. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2012; 24(7): 805–10.
12. Kang YH, Min HK, Son SM, Kim IJ, Kim YK: The association of serum gamma glutamyltransferase with components of the metabolic syndrome in the Korean adults. Diabetes Res Clin Pract. 2007; 77(2): 306–13.
13. Lee MY, Koh SB, Koh JH, Nam SM, Shin JY, Shin YG, Kong ID, Ryu SY, Lee TY, Park JK, Chung CH: Relationship between gamma-glutamyltransferase and metabolic syndrome in a Korean population. Diabet Med 2008, 25(4): 469–75.
14. Shin JY, Chang SJ, Shin YG, Seo KS, Chung CH: Elevated serum gamma-glutamyltransferase levels are independently associated with insulin resistance in non-diabetic subjects. Diabetes Res Clin Pract. 2009; 84(2): 152–7.
15. Suh YJ, Park SK, Choi JM, Ryoo JH: The clinical importance of serum γ -glutamyltransferase level as an early predictor of obesity development in Korean men. Atherosclerosis. 2013; 227(2): 437–41.
16. Onat A, Can G, Örnek E, Çiçek G, Ayhan E, Doğan Y: Serum γ -glutamyltransferase: independent predictor of risk of diabetes, hypertension, metabolic syndrome, and coronary disease. Obesity (Silver Spring). 2012 Apr; 20(4): 842–8.
17. Fatani S, Itua I, Clark P, Wong Ch, Naderali E: The effects of diet-induced obesity on hepatocyte insulin signaling pathways and induction of non-alcoholic liver damage. Int J Gen Med. 2011; 4: 211–219.
18. Banderas DZ, Escobedo J, Gonzalez E, Liceaga MG, Ramirez JC, Castro MG: γ -Glutamyl transferase: a marker of nonalcoholic fatty liver disease in patients with the metabolic syndrome. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2012; 24 (7): 805–10.
19. Finelli C, Tarantino G. What about non-alcoholic fatty liver disease as a new criterion to define metabolic syndrome? World J Gastroenterol. 2013; 6: 3375–3384.

Nadmierna glikacja białek krwi – objaw czy aktywny uczestnik patomechanizmów cukrzycy

HYPERGLYCATION OF BLOOD PROTEINS – SYMPTOM OR ACTIVE PARTICIPANT OF DIABETIC PATHOMECHANISMS

Andrzej Szutowicz

Streszczenie

Stany przewlekłej hiperglikemii niezależnie od typu cukrzycy wywołują nadmierną nieenzymatyczną glikację wszystkich białek przestrzeni wodnej zewnątrz i wewnątrzkomórkowej. Zjawisko to jest użyteczne w diagnozowaniu stopnia długoczasowego wyrównania glikemii u pacjentów z cukrzycą. Hiperglikacja może jednak zmieniać właściwości biologiczne wielu białek, przyczyniając się przez to do upośledzenia funkcji i struktury wielu narządów w przebiegu cukrzycy.

Słowa kluczowe:

hiperglikaemia, glikacja białek

Adres kontaktowy:

Zakład Medycyny Laboratoryjnej

Katedra Biochemii Klinicznej

Gdański Uniwersytet Medyczny

ul. Dębinki 7 bud. 27

80-211 Gdańsk

tel. 058 349-17-71, fax 058 349-27-84

Summary

States of chronic hyperglycaemia, irrespective of the diabetes type evoke excessive glycation of several proteins in extra and intracellular compartments of the body. This property is employed for assessment of degree of long term control of glycaemia in diabetic patients. However hyperglycaemia may change biological properties of several proteins thereby contributing to functional and structural impairment of several organs in the course of diabetes.

Keywords:

hyperglycemia, protein glycation

Glikacje nieenzymatyczne

Glikacja jest nieenzymatyczną reakcją powstawania wiązań kowalencyjnych między cząsteczkami cukrów takich jak glukoza lub fruktoza a cząsteczkami białek i lipidów. Jest to proces odmienny od katalizowanych przez enzymy reakcji glikozylacji, które stanowią jeden z elementów potranslacyjnej modyfikacji białek mających na celu powstanie ostatecznej biologicznie aktywnej formy tych cząsteczek. Natomiast glikacja, dotycząca łańcuchów bocznych lizyny, prowadzi zwykle do patologicznej modyfikacji białek, powodującą utratę części lub całości ich aktywności biologicznej. Dużo mniej wiadomo na temat fruktozylacji, jako że stany hiperfruktozemii występują bardzo rzadko, i są związane ze specyficznymi, genetycznie uwarunkowanymi mutacjami białek metabolizmu fruktozy. Z hiperglikemią skorelowany jest również wzrost poziomu metyloglioksalu, będącego dwualdehydową pochodną kwasu pirogronowego. Jego głównym źródłem jest

cykl glikolityczny. Metyloglioksal jest niezwykle toksyczny – tworzy trwałe wiązania z resztami aminowymi argininy i lizyny oraz sulfhydryłowymi cysteiny. Wzrost syntezy metyloglioksalu w cukrzycy jest uważany za główny element glikacyjno-oksydacyjnego patomechanizmu miażdżycy naczyń u cukrzyków.

Hemoglobina glikowana, a w szczególności jej podfrakcja HbA1c jest powszechnie stosowanym retrospektywnym wskaźnikiem wyrównania cukrzycy w okresie 2-3 miesięcy poprzedzających badanie. Frakcyjna zawartość HbA1c wykazuje prostoliniową zależność od średniego poziomu glukozy w tym okresie. W związku z tym sugeruje się, że podwyższona frakcyjna zawartość HbA1c może być również wartościowym markerem w diagnostyce i badaniach przesiewowych w kierunku cukrzycy, ponieważ odpowiada średniemu poziomowi glikemii w długim okresie czasu.

Podobnym, lecz sięgającym tylko 14 dni wstecz, markerem kontroli glikemii jest glikowana albumina – fruktozami-

na. Jednak należy pamiętać, że w niewyrównanej cukrzycy nadmiernej glikacji ulegają wszystkie białka z N-końcowymi resztami L-lizyny. Co więcej, śladowe ilości metali takich jak Fe^{2+} lub Cu^{1+} mogą powodować dalszą modyfikację tych białek poprzez ich oksydację. Połączenie obu patologicznych modyfikacji nasila te procesy, prowadząc do powstawania trwałych końcowych produktów glikacji (advanced, glycation end-products, AGE).

W cukrzycy nadmiernej glikacji podlegają w różnym stopniu wszystkie białka przestrzeni pozakomórkowej, jak i wewnątrzkomórkowej. U pacjentów ze słabo kontrolowaną cukrzycą, z poziomami HbA1c 12-19%, wykazano 19% glikację immunoglobulin G (zdrowi ok. 5%), 6% fibrynogenu (zdrowi około 2%), 6% dopełniacza C3 (zdrowi ok. 2.5%), 5.5% transferryny, zdrowi około 1.5%) oraz 16% albuminy (zdrowi około 1.5%) [1]. Wydaje się, że podatność na glikację zależy od biologicznego czasu półtrwania poszczególnych białek. IgG i albumina, które mają stosunkowo długie czasy półtrwania (14-30 dni) wykazywały jednocześnie największy stopień glikacji [1]. Również białka bardziej zasadowe wykazywały większą glikację niż białka kwaśne. Glikacja zachodzi przy każdym poziomie glukozy, w tempie proporcjonalnym do jej stężenia. W tkankach istnieją receptory dla zaawansowanych produktów glikacji (receptor advanced glycation end-products – RAGE), które wiążą i internalizują glikowane nieenzymatycznie białka (AGE). Poza AGE, wiążą one niektóre białka S100, amyloid- β , antygen makrofagów-1 (Mac-1, CD11b/CD18) oraz fosfatydyloserynę. W cukrzycy dochodzi do zwiększonego wiązania AGE i nadmiernej aktywacji związanych z nim dróg wewnątrzkomórkowego przekazu sygnału [2].

GLIKACJE W PRZESTRZENI POZAKOMÓRKOWEJ

Glikowane lipoproteiny

Dzięki powszechnemu stosowaniu statyn i fibratów poziom cholesterolu całkowitego u osób z cukrzycą jest podobny lub niższy niż u skorelowanej wiekowo populacji ludzi zdrowych [3, 4]. Jednak u osób z hiperglikemią zarówno apolipoproteiny, jak i komponenty lipidowe lipoprotein podlegają glikacji i peroksydacji, co zmienia zasadniczo ich właściwości biologiczne. Wykazano, że uszkodzenie LDL przez glioksalację-glikację może kilkakrotnie zwiększać ryzyko zmian miażdżycowych naczyń krwionośnych, niezależnie od zwiększonego stosunku stężeń [cholesterol LDL]/[cholesterol HDL] [5]. Glikowane VLDL wykazują dłuższy czas pobytu w osoczu i są gorszymi substratami dla lipazy lipoproteinowej niż cząstki nieglikowanych VLDL [5]. Wykazano, że glikowane LDL modyfikują skład i funkcję płytek krwi. Gli-

kowane LDL zwiększały ponad dwukrotnie syntezę NO, aktywowały Ca-ATP-azę płytkową. Z drugiej strony w ponad 50% hamowały aktywność NaKATP-azy, co ułatwiało napływ Ca do płytek. Mechanizm ten może tłumaczyć wzrost aktywności płytek krwi u pacjentów z cukrzycą. Również glikacja LDL *in vitro* przez metyloglioksal powodowała zmniejszenie rozmiaru tych cząstek oraz wzrost ich aterogenności mierzonej jej wiązaniem do proteoglikanów powierzchni komórek i następczą agregacją. Może to wynikać z faktu, że duża frakcja glioksalowanych LDL jest zatrzymywana w ścianie aorty [6]. Glikowane apoB traciło zdolność rozpoznawania LDL-R. Nie przekraczająca 24 godzin ekspozycja hodowlanych komórek endotelium naczyń wieńcowych świni na glikowane LDL powodowała inhibicję kilkunastu enzymów cyklu kwasów trójkarboksylowych i łańcucha oddechowego, w tym reduktaz cytochromów kompleksów I-IV, jak również spadek zużycia tlenu, obniżenie stosunku $[\text{NAD}^+]/[\text{NADH}]$, obniżenie kontroli oddechowej i potencjału błon mitochondrialnych. Wzrastała natomiast synteza wolnych rodników i nadtlenku wodoru [7].

Z kolei glikacja każdej z izoform apoE w głównym miejscu Liz^{75} , nie zmieniała ich siły wiązania z LDL-R oraz „scavenger” receptorem A. Zmniejszała natomiast maksymalną zdolność wiązania apoE2, 3 i 4 z immobilizowaną heparyną i siarczanem heparanu o 20-23% [5]. Glikacja apoE znajdujących się w przestrzeni śródmiaższowej mózgu może utrudniać transport cholesterolu i lipidów do błon plazmatycznych neuronów, przyczyniając się do ich uszkodzenia, stymulacji amyloidogennej przemiany białka prekursorowego amyloidu- β i rozwoju choroby Alzheimera [5]. Natomiast glikowane HDL, izolowane z surowicy pacjentów z cukrzycą typu 2, traciły swoje właściwości przeciwzapalne, takie jak inhibicja wydzielania czynnika martwicy nowotworów- α (TNF- α), interleukiny-1 β (IL-1 β), przez ludzkie monocyty stymulowane lipopolisacharydami bakteryjnymi. Stopień utraty tej właściwości zależał przy tym od stopnia glikacji HDL [8].

Glikowana albumina

Albumina jest białkiem wielofunkcyjnym, wiążącym szereg ksenobiotyków i związków endogennych, redukując ich cytotoksyczność. Dzięki wysoce-nukleofilowym właściwościom albumina posiada liczne miejsca podatne na glikację w postaci 18 łańcuchów bocznych lizyny, 7 argininy oraz cysteiny. Głównymi miejscami glikacji są łańcuchy boczne Liz^{525} oraz Arg^{410} [9]. Albumina ulega glikacji około 10 razy szybciej niż hemoglobina. Dzięki temu, mimo krótkiego czasu półtrwania względny poziom glikacji albuminy u cukrzyków jest wyższy

niż HbA1c. Albumina glikowana *in vitro* po dodaniu do hodowli pierwotnych komórek śródbłónka żyły pępowinowej powodowała zwiększenie ich aktywności prozapalnej i proagregacyjnej. Zjawisko to obserwowane było już przy niskim 2% poziomie glikacji albuminy. Glikowana albumina (AGE) ma zdolność wiązania z receptorami RAGE, przyczyniając się do nadmiernej syntezy ROS. Uruchamia to wewnątrzkomórkową kaskadę aktywacji białka p21^{RAS}, MAP-kinazy, kinazy ERK, prowadzącą do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF-κB, który wywiera działanie prozapalne poprzez zwiększenie ekspresji genów cytokin prozapalnych.

Opisane oddziaływania glikowanej albuminy na endotelium skutkują zahamowaniem ich metabolizmu energetycznego, proporcjonalnym do stopnia jej glikacji [10]. Ze względu na to, że albumina jest głównym białkiem osocza, jej hiperglikacja ma bardziej istotne, niż hiperglikacja innych białek osocza, znaczenie w powstawaniu uszkodzeń komórek endotelium i generowaniu ich reakcji prozakrzepowych i prozapalnych. Te ostatnie polegają na zwiększonej ekspresji antygenów powierzchniowych, takich jak wewnątrzkomórkowe cząstki adhezyjne-1 (intracellular adhesion molecule-1, ICAM-1), trombomodulina czy czynnik tkankowy [10].

Glikowane białko amyloidu surowicy A

Akumulacja białka amyloidu surowicy A (SAA) w nerkach jest jedną z przyczyn występowania nefropatii cukrzycowej. Postuluje się, że gliko-oksydacyjna modyfikacja SAA przyspiesza jego odkładanie zarówno w kłębkach, jak i w przestrzeni śródmiąższowej nerek. Wykazano, że podawanie glikooksydowanej albuminy (AGE) zdrowym (nie cukrzycowym) myszom powodowało zgrubienie błony podstawnej kłębków nerkowych, ekspansję mezangium, zwłóknienie śródmiąższu około cewkowego, wzrost poziomu kolagenu IV i czynnika wzrostu guza-β (TGF-β) [11]. Podobne zmiany histopatologiczne obserwowano w nerkach chorych z nefropatią cukrzycową.

Glikowane immunoglobuliny

IgG są główną frakcją immunoglobulin zawierającą dużą liczbę reszt lizynowych podatnych na glikację i modyfikację oksydacyjną [1]. Stają się one wysoce immunogenne wskutek powstawania na nich glikowanych, a przez to rozpoznawanych jako obce, epitopów [12]. Powstające przeciwciała przeciw AGE-IgG są mało specyficzne i reagują z glikowanymi epitopami różnych białek komórkowych. Hiperglikacja IgG może odgrywać rolę w patomechanizmie reumatoidalnego zapalenia stawów [12]. Również glikowana IgA1 i inne glikowane

białka osocza stają się immunogenne. W ten sposób uruchamiane jest błędne koło samonapędzających się reakcji autoimmunologicznych odgrywających rolę w patomechanizmach angiopatii, nefropatii i neuropatii cukrzycowej [13].

Glikowany fibrynogen

U pacjentów z niedostateczną kontrolą glikemii całkowity poziom fibrynogenu był podobny jak u osób zdrowych. Jednakże poziom jego glikacji u osób z cukrzycą typu 2, był 2-3 krotnie wyższy niż w grupie kontrolnej [1]. Wykazano, że na swoich trzech łańcuchach αβγ, fibrynogen posiada 12 reszt lizynowych, z których tylko 2 podlegają glikacji, a pozostałe 10 może być acetylowane przez aspirynę. Ten ostatni proces przyspiesza proces degradacji fibrynogenu, co pozostaje w synergii z niezależnym przeciwpłytkowym działaniem tego leku [14]. Z drugiej strony włóknik powstający z glikowanego fibrynogenu jest mniej wrażliwy na działanie plazminy, co może zwiększać gotowość zakrzepową u pacjentów z cukrzycą [15]. Ta oporność na proteolizę może być wykorzystana w leczeniu białaczek i guzów litych. Wiadomo bowiem, że naczynia włosowate w obrębie guza są bardziej niż prawidłowe, przepuszczalne dla fibrynogenu, który po wynaczynieniu ulega konwersji do fibryny. Dlatego też podejmowane są próby stosowania koniugatów metotreksatu z fibrynogenem w celu osiągnięcia wysokiego stężenia tego leku w przestrzeni śródmiąższowej guza i zmniejszenia toksyczności ogólnoustrojowej [15].

TKANKOWE PATOMECHANIZMY HIPERGLIKACJI

Stężenie wolnej glukozy w przestrzeni wewnątrzkomórkowej jest dużo niższe niż w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, wskutek jej konwersji do glukozo-6-fosforanu przez heksokinazę i glukokinazę. Jednak w źle kontrolowanej cukrzycy, zarówno wewnątrzkomórkowe stężenia glukozy, jak i glukozo-6-fosforanu, wzrastają proporcjonalnie do wzrostu glikemii w przestrzeni pozakomórkowej, powodując hiperglikację zarówno hemoglobiny w erytrocytach, jak i innych białek w różnych tkankach insulino-niezależnych [16]. Co więcej, fosforylowane pochodne glukozy i fruktozy: glukozo-6-fosforan oraz fruktozo-6-fosforan są dużo silniejszymi związkami glikującymi niż sama glukoza [17].

Istnieje kilka tysięcy doniesień dotyczących modyfikacji przez hiperglikację funkcji i aktywności białek wewnątrzkomórkowych i związanych z nimi dróg metabolicznych. Przytoczone przykłady pozwolą czytelnikowi zorientować się w podstawowych rodzajach zmian metabolizmu wewnątrzkomórkowego spowodowanych przez tą nieenzymatyczną modyfikację.

Erytrocyty

I tak, w erytrocytach glikacja mutazy 2,3-difosfoglicerynianowej w pozycji Liz¹⁵⁸ powoduje jej inhibicję. Ten wielofunkcyjny enzym wykazuje trzy aktywności: syntetazy 2,3-DPG, mutazy fosfoglicerynianowej oraz fosfatazy 2,3 DPG. Wykazano, że hiperglikemia *in vitro* powodowała glikację 6 reszt lizynowych i ponad 50% inhibicję wszystkich aktywności tego enzymu. Inhibicja enzymu może zakłócać procesy modulacji powinowactwa Hb do tlenu w różnych warunkach fizjologicznych i patologicznych wskutek zwolnienia obrotu metabolicznego 2,3 DPG [18]. Z drugiej strony wyraźna hiperglikemia *in vivo* u ludzi z cukrzycą, na poziomie 9 mmol/L (HbA1c ok. 10%) nie powodowała ani zmian w poziomie 2,3 DPG ani w pO₂/pCO₂ we krwi.

Naczynia krwionośne

W przestrzeni okołonaczyniowej glikowane/utlenione LDL zwiększały wielokrotnie wydzielanie fruktozy, jak również G-6-P i F-6-P z mięśni gładkich naczyń. Powodowało to znaczny wzrost glikacji białek pozakomórkowych w tym mikrokompartmencie i wzrost uwalniania LDH z włókien mięśniowych, świadczący o ich uszkodzeniu [17]. Natywne nieoksydowane LDL nie miały takich właściwości.

Glukoza-6-fosforan poprzez dehydrogenazę glukoza-6-fosforanową i cykl pentozomonofosforanowy jest głównym źródłem NADPH do syntezy glutationu, podstawowego metabolitu chroniącego tkanki przed stresem oksydacyjnym. Homeostaza glutationu ma szczególne znaczenie w komórkach cechujących się wysokim tempem metabolizmu tlenowego takich jak komórki neuronalne, mięśnia sercowego, kanalików zbiorczych rdzenia nerki czy też komórki endotelium naczyniowego. AGE-Albumina powodowała inhibicję aktywności oraz spadek poziomu białka i ekspresji genu dehydrogenazy glukoza-6-fosforanowej oraz wzrost stężenia wolnych rodników tlenowych w komórkach endotelium żył pępowinowych [19]. Obniżenie poziomu glutationu, jak i inhibicja G-6-PDH zwiększają glikację białek i stres oksydacyjny w endotelium naczyniowym, przez co stają się istotnym elementem błędnego koła w patomechanizmie cukrzycowej miażdżycy naczyń. Drugim enzymem dostarczającym NADPH do syntezy glutationu jest dehydrogenaza izocytrynianowa NADP-zależna. Aktywność tego enzymu ulega inhibicji po glikacji domeny Liz²¹², znajdującej się w jego centrum aktywnym. Działanie glukoza-6-fosforanu i fruktozy jest kilkakrotnie silniejsze niż glukozy zarówno w stosunku do enzymu mitochondrialnego, jak i cytoplazmatycznego (Ryc. 1) [20]. Inhibicja obu form ICDH hamuje zarówno metabolizm energetyczny związany z cyklem

kwasów trójkarboksylowych w mitochondriach, jak i syntezę glutationu w przedziale cytoplazmatycznym komórek [20].

Mózg

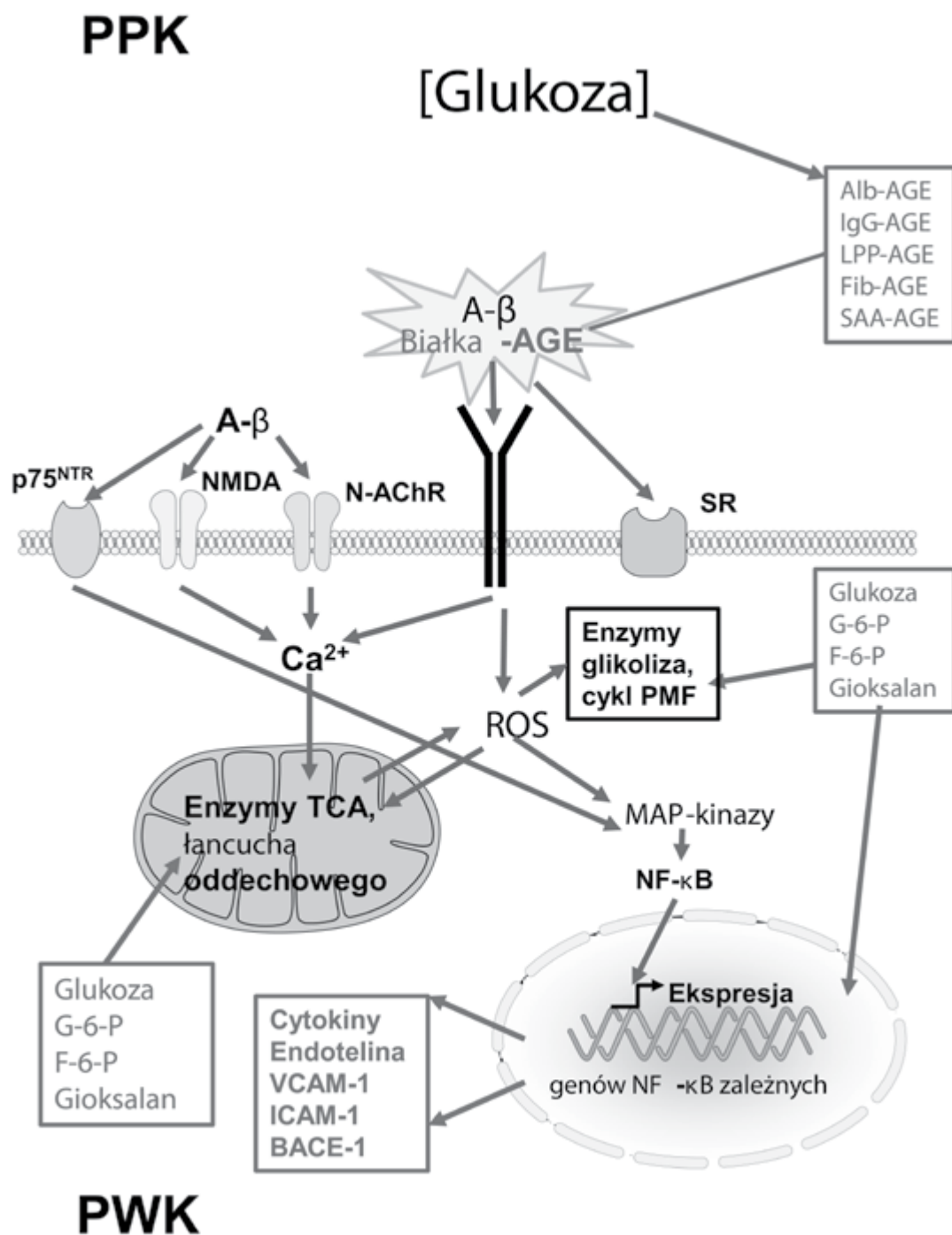
Szczególnym rodzajem śródbłonna naczyniowego są komórki endotelialne mózgu, które wraz z astrocytami tworzą barierę krew-mózg. Zabezpiecza ona przedziały wewnątrz i zewnątrzkomórkowe mózgu przed szkodliwym oddziaływaniem różnych drobno i wielkocząsteczkowych, endo i egzogennych związków cytotoksycznych znajdujących się w przestrzeni pozamózgowej. Metyloglioksal indukował apoptozę tych komórek oraz zwiększał przestrzenie międzykomórkowe wskutek glikacji licznych białek zewnątrzkomórkowej macierzy bariery krew-mózg takich jak laminina, okludyna, fibronektyna oraz białka ZO1-3 [21]. Powodowało to obniżenie oporności elektrycznej błony endotelialnej oraz wzrost jej przepuszczalności. Uszkodzenie to zmniejszało się po zastosowaniu N-acetylocysteiny i innych związków chroniących reszty -SH glutationu, a nasilane przez inhibitory syntezy glutationu [21].

Badania epidemiologiczne na dużych grupach, ponad 600.000 cukrzyków i odpowiedniej liczbowo, wiekowo i pod względem płci grupie kontrolnej wykazały, że cukrzyca zwiększa ryzyko wystąpienia choroby Alzheimera o około 40% [22]. Uszkodzenie bariery krew - mózg przez hiperglikację i AGE wydaje się mieć istotne znaczenie dla tego zjawiska. Wykazano, że już niskie stężenia glikowanej albuminy rzędu 20 mg/L wywoływały u zwierząt doświadczalnych zmiany patologiczne, typowe dla choroby Alzheimera [23].

Glikowane białka – „pamięć metaboliczna” w cukrzycy

Duże próby kliniczne wykazały, że wczesna i rygorystyczna kontrola glikemii redukuje i opóźnia wystąpienie późnych powikłań związanych z makro i mikroangiopatią. Istotną rolę w tym zjawisku odgrywa utrzymanie właściwego poziomu AGE-białek. Długotrwały brak właściwej kontroli glikemii powoduje bowiem powstanie stosunkowo trwałych zmian w poziomie glikacji białek strukturalnych i funkcjonalnych, jak również zmiany epigenetyczne w jądrowym i mitochondrialnym DNA komórek chorych na cukrzycę [24, 25].

Okazało się, że po kilkumiesięcznym okresie hiperglikemii, długotrwała normalizacja poziomu glukozy i HbA1c, nie przywracała do normy wielu parametrów metabolicznych związanych z rozwojem angiopatii. Przy opóźnionej interwencji, pomimo powrotu do ścisłej kontroli glikemii, poziomy potencjalnie szkodliwych związków, takich jak: AGE w mitochondriach, kolagenu w podścielisku tkankowym, NFκB, kaspazy 3, nadtlenków lipidów oraz rodników nitrozylowych pozostawały podwyższone, a poziom glutationu pozostawał obniżony. Przy skróceniu



Ryc. 1. Metabolizm glukozy

okresu niekontrolowanej hiperglikemii, powrót do normoglikemii powodował częściowe odwrócenie opisanych zaburzeń metabolicznych. Dane te tłumaczą zależny od AGE-białek mechanizm powstawania powikłań naczyniowych w cukrzycy. Świadczy to o tym, że wiele zmian wywołanych glikacją ma charakter trwały (epigenetyczny) i nie może być łatwo odwrócona przez późną kontrolę glikemii. Uzasadnia to konieczność jak najszybszego rozpoczęcia terapii cukrzycy i prowadzenia jej w sposób rygorystyczny przez całe życie pacjenta. W grupach ryzyka optymalizacja kontroli metabolicznej powinna być prowadzona jeszcze przed wystąpieniem jawnej cukrzycy [25, 26].

Nie ma dowodu na to, aby HbA1c wykazywała właściwości istotne dla patofizjologii cukrzycy. Jest jednak najłatwiejszym do oznaczenia i dobrze zestandaryzowanym markerem długoczasowej glikacji wewnątrzkomórkowej w cukrzycy. Dzięki długiemu czasowi półtrwania jest markerem „pamięci metabolicznej”. Jej wysoki poziom świadczy o tym, że zarówno w PPK, jak i w PWK doszło już do wielokierunkowych zmian funkcji i aktywności licznych białek biologicznie czynnych, które jeszcze przez długi czas po normalizacji glikemii mogą indukować zmiany patologiczne prowadzące do późnych powikłań narządowych w tej chorobie.

Piśmiennictwo:

1. Austin G.E., Mullins R.H., Morin L.G.: Non-enzymic glycation of individual plasma proteins in normoglycemic and hyperglycemic patients. *Clin. Chem.* 1987, 33, 2220-2224.
2. Hudson B.I., Hofmann M.A., Bucciarelli L., Wendt T., Moser B., Lu Y., Stern D.M., D'Agati V., Yan S.D., Yan S.F., Grant P.J., Schmidt A.M.: Glycation and diabetes: The RAGE connection. *Curr. Sci.* 2002, 83, 1515-1521.
3. Hara K., Omori K., Sumioka Y., Aso Y., Spontaneous platelet aggregation evaluated by laser light scatter in patients with type 2 diabetes: Effects of short-term improved glycemic control and adiponectin. *Transl. Res.* 2012, 159, 15-24.
4. Michno A., Bielarczyk H., Pawelczyk T., Jankowska-Kulawy A., Klimaszewska J., Szutowicz A.: Alterations of adenine nucleotide metabolism and function of blood platelets in patients with diabetes. *Diabetes* 2007, 56, 462-467.
5. Laffont I., Shuvaev V.V., Briand O., Lestavel S., Barbier A., Taniguchi N., Fruchart J.C., Clavey V., Siest G.: Early-glycation of apolipoprotein E: effect on its binding to LDL receptor, scavenger receptor A and heparin sulfates. *Biochim. Biophys. Acta* 2002, 1583, 99-107.
6. Rabbani N., Godfrey L., Xue M., Shaheen F., Geoffrion M., Milne R., Thornalley P.J.: Glycation of LDL by methylglyoxal increases arterial atherogenicity. *Diabetes* 2011, 60, 1973-1980.
7. Sangle G.V., Chowdbury S.K.R., Xie X., Stelmack G.L., Halayko A.J., Shen G.X.: Impairment of mitochondrial respiratory chain activity in aortic endothelial cells induced by glycated low-density lipoprotein. *Free Radic. Biol. Med.* 2010, 48, 781-790.
8. Liu D., Ji L., Zhang D., Tong X., Pan B., Liu P., Zeng Y., Huang Y., Su J., Willard B., Zheng L.: Nonenzymatic glycation of high-density lipoprotein impairs its anti-inflammatory effects in innate immunity. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2012, 28, 186-195.
9. Rondeu P., Bourdon E.: The glycation of albumin: Structural and functional impacts. *Biochimie* 2011, 93, 645-658.
10. Rubenstein D.A., Zahra M., Wen Y.: Glycated albumin modulates endothelial cell thrombogenic and inflammatory responses. *J. Diab. Sci. Technol.* 2011, 5, 700-713.
11. Goh S.Y., Cooper M.E.: The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008, 93, 1143-1152.
12. Ahmad S., Ali M.A.: Immunological studies on glycated human IgG. *Life Sci.* 2012, 90, 980-987.
13. Tanaka M., Seki G., Someya T., Nagata M., Fujita T.: Aberrantly glycosylated IgA1 as a factor in the pathogenesis of IgA nephropathy. *Clin. Devel. Immunol.* 2011, doi:10.1155/2011/470803.
14. Svennson J., Bergmann A.C., Adamson U., Blomback M., Wallen H., Jorneskog G.: Acetylation and glycation of fibrinogen in vitro occur at specific lysine residues in a concentration dependent manner: A mass spectrometric and isotope labeling study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012, 421, 335-342.
15. Kanska U., Omar M.A., Budzynska R., Nevozhay D., Jagiello M., Opolski A., Boratynski J.: Antileukemic activity of glycated fibrinogen-methotrexate conjugates. *Anticancer Res.* 2005, 25, 2229-2234.
16. Duarte J.M.N., Carvahlo R.A., Cunha R.A., Gruetter R.: Caffeine consumption attenuates neurochemical modifications in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Neurochem.* 2009, 111, 368-379.
17. Takeda H., Higashi T., Nishikawa T., Sato Y., Anami Y., Yano T., Kasho M., Kobori S., Shichiri M.: Release of fructose and hexose phosphates from perivascular cells induced by low density lipoprotein and acceleration of protein glycation in vitro. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 1996, 31, 1-8.
18. Fuita T., Suzuki K., Tada T., Yoshihara Y., Hamaoka R., Uchida E., Matuo Y., Sasaki T., Hanafusa T., Taniguchi N.: Human erythrocyte bisphosphoglycerate mutase: Inactivation by glycation *in vivo* and *in vitro*. *J. Biochem.* 1998, 124, 1237-1244.
19. He M.H., Zang Y.: Advanced glycation end products inhibit glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and expression in human umbilical vein endothelial cells. *Acta Physiol. Sinica* 2012, 64, 646-650.
20. Kil I.S., Lee J.H., Shin A.H., Park J.W.: Glycation-induced inactivation of NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase: Implications for diabetes and aging. *Free Radic. Biol. Med.* 2004, 37, 1765-1778.
21. Li W., Maloney R.E., Circu M.L., Alexander J.S., Aw T.Y.: Acute carbonyl stress occluding glycation and brain microvascular endothelial barrier dysfunction: Role for glutathione-dependent metabolism of methylglyoxal. *Free Rad. Biol. Med.* 2013, 54, 51-61.
22. Wang K.C., Woung L.C., Tsai M.T., Liu C.C., Su Y.H., Li C.Y.: Risk of Alzheimer's disease in relation to diabetes: A population-based cohort study. *Neuro-epidemiology* 2012, 38, 237-244.
23. Li X.H., Lv B.L., Xie J.Z., Liu J., Zhou X.W., Wang J.Z.: AGEs induce Alzheimer-like tau pathology and memory deficit via RAGE-mediated GSK-3 activation. *Neurobiol. Aging* 2012, 33, 1400-1410.
24. Ceriello A., Ihnat M.A., Thrope J.E.: The „metabolic memory”: Is more than just tight glucose control necessary to prevent diabetic complications? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2009, 9, 410-415.
25. Ihnat M.A., Thrope J.E., Ceriello A.: Hypothesis: the „metabolic memory”, the new challenge of diabetes. *Diabetic Med.* 2007, 24, 582-586.
26. Aschner P.J., Ruiz A.J.: Metabolic memory for vascular disease in diabetes. *Diabetes Technol. Therap.* 2012, 14, S-68-S-74.

Peptydowe inhibitory enzymu konwertującego angiotensynę I pochodzące z białek żywności

ANGIOTENSIN I – CONVERTING ENZYME INHIBITORY PEPTIDES DERIVED FROM FOOD PROTEINS

Monika Karaś, Anna Jakubczyk

Streszczenie

Białka żywności stanowią źródło peptydów, które mogą pozytywnie wpływać na organizm człowieka, pełniąc w nim funkcje regulacyjne i modulujące, dlatego też mogą być stosowane w profilaktyce zdrowia jako nutraceutyki, funkcjonalne składniki żywności czy też farmaceutyki. W związku z powyższym w ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania identyfikacją i charakterystyką bioaktywnych peptydów, których źródłem są białka pochodzenia roślinnego, jak i zwierzęcego. W zależności od ich konformacji przestrzennej, bioaktywne peptydy wykazują różnorodne często wielofunkcyjne właściwości: przeciwnadciśnieniowe, przeciwnowotworowe, przeciwutleniające, immunomodulujące, przeciwbakteryjne czy też hipocholesterolemiczne. Na podstawie aktualnej literatury przedstawiono dane dotyczące postępu badań w zakresie przeciwnadciśnieniotwórczych peptydów pochodzących z białek żywności.

Słowa kluczowe:

bioaktywne peptydy, inhibitory ACE, białka żywności

Summary

Food proteins are a source of peptides that have regulatory and modulatory functions in humans and can be used for disease prevention as nutraceuticals, functional food ingredients or pharmaceuticals. Therefore, interest in identification and characterization of bioactive peptides derived from animal and plant food proteins has been increasing in recent years. Bioactive peptides depending on their structural properties possess different activities, often multifunctional: antihypertensive, anticancer, antioxidant, immunomodulatory, antimicrobial or hypocholesterolemic. Based on current literature, this work presents a comprehensive account of advances in antihypertensive peptides derived from food proteins.

Keywords:

Bioactive peptides, ACE inhibitory, food proteins

Wykaz skrótów:

ACE – enzym konwertujący angiotensynę I

ACEI – inhibitor enzymu konwertującego angiotensynę I

RAA – układ renina-angiotensyna-aldosteron

Adres kontaktowy:

Katedra Biochemii i Chemii Żywności

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

ul. Skromna 8

20-704 Lublin

tel. 81 462-33-27/28

Choroby układu sercowo-naczyniowego, w tym również nadciśnienie tętnicze, stanowią globalny problem zdrowotny, dotyczący ok. 30% dorosłej populacji w krajach rozwiniętych i rozwijających się. Nadciśnienie jest chorobą wieloczynnikową i pomimo licznych badań jego patogenеза nie została do końca poznana. W fizjologicznej regulacji ciśnienia tętniczego krwi istotną rolę odgrywa działanie układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAA), a zaburzenia na poziomie funkcjonowania poszczególnych czynników tego układu skutkują zaburzeniami ciśnienia tętniczego krwi [1, 2].

Funkcje poszczególnych czynników układu RAA

Pierwszym enzymem układu RAA jest renina, proteaza wytwarzana i magazynowana w komórkach aparatu przykłębuszkowego nerek. Enzym ten katalizuje reakcję odsczepienia od angiotensynogenu deka-peptydu (angiotensyny I), który w następnym etapie jest przekształcany przez enzym konwertujący angiotensynę (ACE) do aktywnego biologicznie okta-peptydu (angiotensyny II). Angiotensyna II wpływa pobudzająco na receptor błonowy angiotensyny I, powodując tym samym zwiększenie ciśnienia tętniczego krwi. Angiotensyna II uwalniana do krążenia systemowego, jak i wytwarzana *in situ* w wielu

tkankach, pobudza sekrecję aldosteronu w korze nadnerczy oraz obkurcza mięśniówkę gładką naczyń krwionośnych, co prowadzi do wzrostu ciśnienia tętniczego krwi, a to w konsekwencji niekorzystnie wpływa na śródbłonek naczyniowy oraz mięsień sercowy.

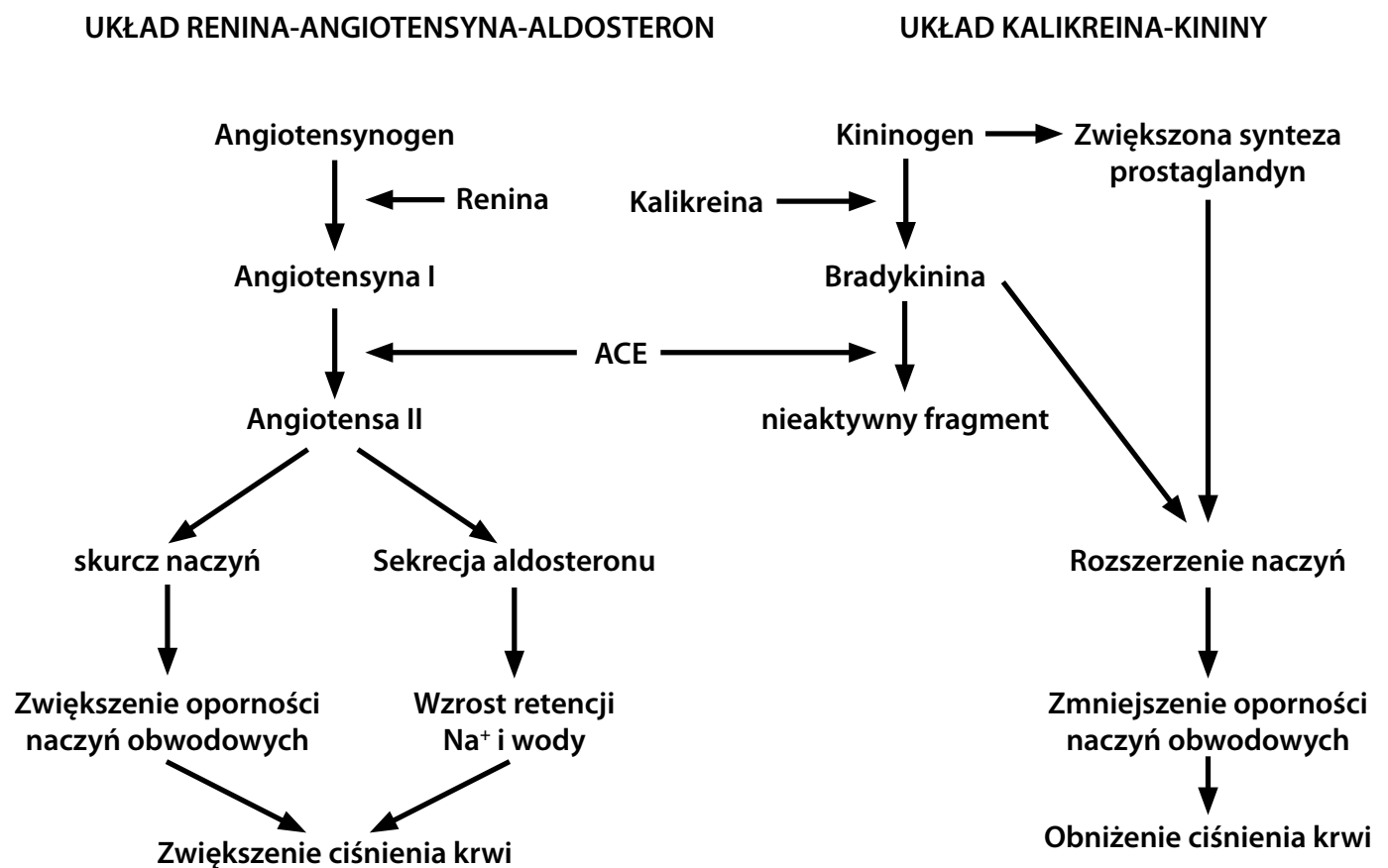
Angiotensyna II powoduje dysfunkcję śródbłonna, nasilenie stresu oksydacyjnego, przyczynia się do pęknięcia blaszki miażdżycowej, przyspiesza też apoptozę komórek mięśnia sercowego. Ponadto przyczynia się do zwiększenia insulinooporności tkankowej [3].

Aldosteron wytwarzany głównie przez warstwę kłębuszkową nadnerczy jest ostatnim ogniwem układu renina-angiotensyna-aldosteron. Hormon ten, oprócz pełnienia istotnej roli w regulacji gospodarki wodno-elektrolitowej, może również dysfunkcyjnie wpływać na układ sercowo-naczyniowy niezależnie od angiotensyny II [4, 5].

a także inaktywuje bradykininę w krwioobiegu. Głównym źródłem tego enzymu w surowicy jest konwertaza angiotensyny I produkowana przez płuca. Hamowanie aktywności enzymów układu RAA jest szeroko wykorzystywane w leczeniu nadciśnienia tętniczego, chorób sercowo-naczyniowych i chorób nerek.

Inhibitory układu renina-angiotensyna-aldosteron

Jedno z najważniejszych osiągnięć współczesnej farmakoterapii nadciśnienia tętniczego to wprowadzenie leków hamujących aktywność ACE, co prowadzi do zmniejszenia stężenia angiotensyny II we krwi. W warunkach fizjologicznych, angiotensyna II podnosi ciśnienie tętnicze krwi, głównie na skutek skurczu mięśni gładkich w ścianie naczyń krwionośnych oraz przez stymulację wydzielania aldosteronu. Zahamowanie wydzielania aldosteronu powoduje zablokowanie resorpcji zwrotnej



Ryc.1. Rola enzymu konwertującego angiotensynę (ACE) w regulacji ciśnienia krwi [6]

Kluczową rolę w regulowaniu ciśnienia krwi odgrywa enzym konwertujący angiotensynę I (ACE, E.C.3.4.15.1) należący do grupy metalopeptydaz cynkowych. ACE katalizuje konwersję angiotensyny I do angiotensyny II, wykazującą silne działanie zwężające naczynia krwionośne,

jonów Na⁺ w kanalikule dalszym nerkę, i co za tym idzie zwiększenie ich wydalania razem z wodą, czyli działanie moczopędne i hipotensyjne. Hamowanie syntezy angiotensyny II powoduje zatem spadek ciśnienia tętniczego. Równocześnie zwiększa się poziom angiotensyny I,

która powoduje zwiększenie rozkurczającego wpływu tlenu azotu na naczynia krwionośne, co warunkuje również działanie przeciwmiażdżycowe i ochronne na naczynia. Działanie inhibitorów ACE powoduje także zahamowanie rozkładu bradykininy (wykazującej działanie rozszerzające naczynia) do nieaktywnych metabolitów. Sugeruje się również, że inhibitory konwertazy angiotensyny I mogą działać modyfikująco na aktywność niektórych genów odpowiedzialnych za onkogenezę, hamować proliferację i inwazję komórek nowotworowych, migrację komórek śródbłonna, angiogenezę, spowalniać wzrost guza i powstawanie przerzutów [7]. W latach 90. na rynku farmaceutycznym pojawiły się leki blokujące receptory angiotensyny II. Zwiększyły one znacząco możliwości terapii nadciśnienia tętniczego ze względu na dużą skuteczność hipotensyjną i bardzo dobrą tolerancję przez pacjentów [8]. Możliwość hamowania aktywności reniny zapoczątkowującej kaskadę procesów enzymatycznych prowadzących do powstania angiotensyny II budziła od wielu lat duże zainteresowanie licznych ośrodków badawczych. Inhibitory ACE odznaczają się nie tylko działaniem hipotensyjnym, antyproliferacyjnym, nefroprotencyjnym, ale również przeciwzakrzepowym. Na podstawie przeprowadzonych badań zaobserwowano również, że zastosowanie peptydowych inhibitorów ACE u chorych z nadciśnieniem tętniczym zwiększa wrażliwość na insulinę, zmniejsza też ryzyko wystąpienia cukrzycy u osób z chorobą serca [3]. Ich właściwości wynikają ze skomplikowanego mechanizmu działania i wpływu na jeden z najistotniejszych układów hormonalnych w układzie krążenia. Niezwykle ważnym argumentem przemawiającym za udziałem układu RAA w patogenezie samoistnego nadciśnienia tętniczego są efekty lecznicze uzyskane blokerami tego układu [9].

Obecnie na rynku farmaceutycznym istnieje szereg syntetycznych inhibitorów ACE stosowanych w leczeniu nadciśnienia tętniczego, w tym leki moczopędne, inhibitory receptorów adrenergicznych, leki rozszerzające naczynia krwionośne, blokery kanału wapniowego, angiotensyny II, jak również inhibitory konwertazy angiotensyny (inhibitory ACE). Pomimo, iż nadciśnienie może być regulowane przez liczne środki farmakologiczne, takie jak: kaptopryl, lizinopryl czy enalapril, to substancje te mogą powodować niepożądane efekty uboczne, takie jak: kaszel, zaburzenia smaku, zaburzenia czynności nerek, obrzęk naczyniopochodnych, hiperkaliemia, hipotonia ortostatyczna oraz zawroty głowy [10]. Dlatego też prowadzone są badania nad nowatorskimi, bezpiecznymi

i ekonomicznymi inhibitorami ACE, które również jako składniki diety mogą przyczynić się do przeciwdziałania i leczenia chorób układu krążenia [11]. Wśród tych związków szczególną rolę z uwagi na ich wysoką skuteczność i niską toksyczność, pełnią peptydy o właściwościach przeciwnadciśnieniowych [12].

Peptydowe inhibitory konwertazy angiotensyny I (ACEI)

W zależności od sposobu hamowania enzymu konwertującego angiotensynę I, w warunkach *in vitro*, peptydowe inhibitory można podzielić na cztery grupy. Peptydy pochodzące z białek żywności są najczęściej inhibitorami kompetycyjnymi ACE, ale mogą również wykazywać niekompetycyjny, akompetycyjny czy też mieszany charakter inhibicji. Natomiast w zależności od rezultatów otrzymanych w oparciu o zmiany w aktywności hamującej ACE po hydrolizie peptydów przez ACE lub po trawieniu w przewodzie pokarmowym *in vivo*, peptydy hamujące ACE mogą być typu: prawdziwy inhibitor (aktywność hamująca ACE pozostaje niezmienną), pro-lek (zwiększona aktywność hamująca ACE) lub substrat (zmniejszona aktywność hamująca ACE). Badania poświęcone wpływowi struktury peptydów na ich aktywność hamującą wobec ACE wykazały, że oddziaływanie enzym-inhibitor silnie zależy od konformacji peptydu, jak i udziału aminokwasów hydrofobowych w C-końcowej sekwencji (np. Pro, Trp, Phe i Tyr) jak i aminokwasów alifatycznych w N-końcowym fragmencie peptydów (np. Leu, Ile, Val). Ponadto, aminokwasy z dodatnim ładunkiem przy grupie ε-aminowej (np. Arg i Lys) w znacznym stopniu przyczyniają się do hamowania ACE [13].

Peptydowe inhibitory ACE stanowią dość liczną grupę związków, otrzymywanych w wyniku hydrolizy białek żywności pochodzenia roślinnego (np. białka grochu, fasoli, ciecierzycy), zwierzęcego (np. kazeina mleka, lakalbumina, białko jaja kurzego, białko mięśni łososia) czy też morskich [14]. Najlepiej poznanym ich źródłem są białka mleka, roślin strączkowych, jak również organizmów morskich [15, 16, 17, 18]. Ze względu na działanie przeciwnadciśnieniowe, przeciwcukrzycowe, przeciwkrzepliwie, hipocholesterolemiczne, obniżające masę ciała oraz antyoksydacyjne oczyszczone, biologicznie aktywne peptydy mogą znaleźć zastosowanie w profilaktyce i leczeniu chorób układu sercowo-naczyniowego jako składniki żywności funkcjonalnej oraz farmaceutyków.

Piśmiennictwo:

1. Kearney P.M., Whelton M., Reynolds K., Whelton P.K., He J.: Worldwide prevalence of hypertension: a systematic review. *J. Hyperten.* 2004, 22, 11-19.
2. Kokot F., Ficek R.: Rola układu reninowo-angiotensynowo-aldosteronowego (RAA) w patogenezie nadciśnienia tętniczego. *Postępy Nauk Medycznych* 2002, 2-3, 117-122.
3. Ostergren J.: Renin-angiotensin-system blockade in the prevention of diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 2007, 76, 13-21.
4. Januszewicz W., Januszewicz A.: Aldosteron – hormon o wielu obliczach. *Postępy Nauk Medycznych* 2009, 10, 751-756.
5. Szczepańska-Sadowska E., Cudnoch-Jędrzejewska A.: Układ renina-angiotensyna-aldosteron główny układ hormonalny w rozwoju nadciśnienia tętniczego. Nadciśnienie tętnicze. [w:] Januszewicz A., Januszewicz W., Szczepańska-Sadowska E., Sznajderman M. *Medycyna Praktyczna*, 2007.
6. Li G.H., Le G.W., Shi Y.H., Shrestha S.: Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. *Nut. Res.* 2004, 24, 469-486.
7. Molteni A., Ward W.F., Ts'ao C.H., Taylor J., Small W., Brizio-Molteni L., Veno P.A.: Cytostatic properties of some angiotensin I converting enzyme inhibitors and of angiotensin II type I receptor antagonists. *Curr. Pharm. Des.*, 2009, 9, 751-61.
8. Januszewicz A., Januszewicz W., Rużyło W.: Antagoniści receptora angiotensyny II w leczeniu chorób układu sercowo-naczyniowego. *Medycyna Praktyczna*, Kraków 2006.
9. Januszewicz A., Januszewicz W., Rużyło W.: Inhibitory konwertazy angiotensyny w leczeniu chorób układu sercowo-naczyniowego. *Medycyna Praktyczna*, Kraków 2005.
10. Libby P., Bonow R.O., Mann D.L., Zipes D.P. Braunwald's Heart Disease: A textbook of cardiovascular Medicine (8th ed.). Philadelphia: Saunders, 2008.
11. De Leo F., Panarese S., Gallerani R., Ceci L.R.: Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides: production and implementation of functional food. *Curr Pharm Des.* 2009, 15, 3622-43.
12. Martínez-Maqueda D., Miralles B., Recio I., Hernández-Ledesma B.: Antihypertensive peptides from food proteins: a review. *Food Funct.* 2012, 3, 350-61.
13. Ketnawa S., Rawdkuen S.: Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from aquatic and their processing by-products: a review. *IJSID*, 2012, 2, 185-199.
14. Hernández-Ledesma B., Contreras M.D.M. and Recio I.: Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Adv. Col. Interface Sci.* 2011, 165, 23-35.
15. Phelan, M., Kerins, D.: The potential of milk-derived peptides in cardiovascular disease. *Food & Function*, 2011, 2, 153-167.
16. Jakubczyk A., Karaś M., Baraniak B., Pietrzak M.: The impact of fermentation and in vitro digestion on formation angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from pea proteins. *Food Chem.* 2013, 15, 3774-80.
17. Lin L., Lv S., Zhang X., Lu J., Ye Y., Jiang S.: ACE inhibitory peptides derived from aquatic protein. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2013, 14, 235-241.
18. Wijesekara I., Kim S.K.: Angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitors from marine resources: prospects in the pharmaceutical industry. *Marine Drugs*, 2010, 8, 1080-1093.

Czynniki wpływające na wiarygodność oznaczeń lipidowych

FACTORS INFLUENCING RELIABILITY OF LIPID TESTING

Wiesław Piechota

Streszczenie

Znaczenie dokładnych pomiarów lipidów jest dobrze poznane ze względu na ich rolę jako czynników ryzyka choroby niedokrwiennej serca i innych chorób o podłożu miażdżycowym. Stężenie cholesterolu całkowitego i cholesterolu LDL jest mocno skorelowane z częstością występowania chorób sercowo-naczyniowych w populacji ogólnej. Oznaczenia cholesterolu są także wykorzystywane w monitorowaniu leczenia statynami. Istnieje wiele czynników mających wpływ na wiarygodność oznaczeń lipidowych. Dominują czynniki przed-analityczne powodujące 2/3 całkowitej zmienności stężeń lipidów. Jeśli czynniki te nie zostaną wyeliminowane lub znacznie ograniczone, wówczas wyniki oznaczeń lipidowych nie będą przydatne do oceny ryzyka sercowo-naczyniowego. Najważniejszymi czynnikami są dobór właściwego czasu pobierania krwi oraz procedury pobierania (szczególnie jeśli do analiz mają być wykorzystane próbki pobrane na czczo). Wybór czasu jest ważny, ponieważ zachodzą zmiany w homeostazie lipidowej związane z chorobami o ostrym przebiegu lub stresem, ciążą, zmianami diety powodującymi szybki spadek lub wzrost masy ciała, zmianami spożycia nasyconych kwasów tłuszczowych. Spoczynek przed pobraniem krwi, pozycja ciała, czas użycia stazy mogą wywierać znaczny wpływ na stężenie lipidów w surowicy (osoczu) i powinny być wystandaryzowane. W próbkach pobranych nie na czczo występuje poposiłkowa hipertriglicerydemia. Endogenna hipertriglicerydemia także stwarza trudności, kiedy stosuje się metodę pośrednią (wzór Friedewalda) do obliczania stężenia LDL-C, fałszywie obniżając stężenie LDL-C, co skutkuje niedoszacowaniem ryzyka sercowo-naczyniowego. Błąd ten może być wyeliminowany przez zastosowanie bezpośrednich metod oznaczania LDL-C. Inne substancje endogenne takie jak bilirubina, hemoglobina (hemoliza) nie wpływają istotnie na wyniki generowane przez współczesne metody enzymatyczne. Hormony tarczycy, hormony płciowe i alkohol wyraźnie wpływają na metabolizm lipidów. Zmienność analityczna i błąd systematyczny, każdy do wielkości 4%, nie powodują powstania niedopuszczalnego błędu całkowitego oznaczenia LDL-C. Bezpośrednie metody oznaczania cholesterolu LDL powinny być stosowane u pacjentów z wysokim ryzykiem, szczególnie tych z hipertriglicerydemią.

Adres kontaktowy:

Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej
Wojskowy Instytut Medyczny w Warszawie
ul. Szaserów 128
04-141 Warszawa
tel. 22 681-72-51

Abstract

Factors influencing reliability of lipid testing

The importance of accurate lipid determination is well established because of their role as risk factors of ischemic heart disease and other atherosclerotic conditions. Serum total cholesterol and LDL-cholesterol are strongly correlated with frequency of the cardiovascular diseases in general population. Cholesterol determinations are also used in monitoring therapy with statins. There are many factors that influence reliability of lipid testing. Pre-analytical factors dominate as they cause about 2/3 of total variation in lipid levels. If these factors are not eliminated or significantly reduced they may render results unsuitable for the risk evaluation. The most important factors are timing of blood collection, and procedures used for this purpose (especially if fasting samples are to be used for analysis). Timing is important because physiological changes occur when the individual's steady-state concentrations change, through acute illness or stress, pregnancy, dietary changes that result in quick weight loss or gain, or changes in saturated fatty acids intake. Rest before taking blood, posture, and time of applying stasis can all exert significant influence on serum (plasma) lipids and should be standardized. Nonfasting samples are influenced by postprandial hypertriglyceridemia. Endogenous hypertriglyceridemia can also pose a problem when indirect method (Friedewals formula) is used for LDL-C calculation, falsely lowering LDL-C levels which results in underestimation of cardiovascular risk. Such an error can be eliminated by using direct methods of LDL-C determination. Other endogenous factors such as bilirubin, haemoglobin (haemolysis) do not affect significantly results generated by modern enzymatic methods. Thyroid hormones, sex hormones, and alcohol distinctly influence lipid metabolism. Analytical variation and systematic error up to 4% each do not cause unacceptable total error of LDL cholesterol determination. Direct methods for LDL cholesterol measurements should be used in high risk patients, especially those with hypertriglyceridemia.

Waga oznaczeń lipidów w surowicy krwi jest znana i doceniana od dawna ze względu na udowodnioną ponad wszelką wątpliwość aterosclerogenną rolę niektórych z nich, a przede wszystkim cholesterolu. Stężenie cholesterolu całkowitego w surowicy krwi jest wyraźnie dodatnio skorelowane z częstością występowania cho-

roby wieńcowej oraz innych chorób sercowo-naczyniowych o podłożu miażdżycowym. Od wielu dekad też wiadomo, iż to frakcja lipoprotein o niskiej gęstości LDL, zawierająca najwięcej cholesterolu (rzędu 70% cholesterolu całkowitego) jest najbardziej miażdżycorodna. Zatem cholesterol tej frakcji należy także brać pod uwagę w ocenie ryzyka sercowo-naczynio-

wego. Istniejące algorytmy oceny tego ryzyka i rekomendacje dotyczące jego redukcji uwzględniają cholesterol całkowity i/lub cholesterol LDL (LDL-C). W zależności od nasilenia innych czynników ryzyka interpretuje się stężenie cholesterolu całkowitego i cholesterolu LDL jako pożądane (optymalne) lub w przeciwnym przypadku formułuje się wartość stężenia docelowego (w przypadku leczenia). Algorytmy szacowania ryzyka sercowo-naczyniowego z udziałem stężeń cholesterolu w surowicy krwi i wynikające z nich zalecenia publikowane są przez kardiologiczne towarzystwa naukowe [1, 2].

Cholesterol oznaczany jest także rutynowo w innej frakcji lipoprotein – w lipoproteinach o wysokiej gęstości (HDL). Zawartość cholesterolu tej frakcji (HDL-C) zależy od szeregu złożonych procesów związanych z tzw. odwrotnym transportem cholesterolu (tj. z tkanek na obwodzie do wątroby). Wysokie stężenie cholesterolu tej frakcji w surowicy krwi związane jest z obniżonym ryzykiem miażdżycy i chorób układu krążenia na jej podłożu i odwrotnie. Ten znany od dawna z badań epidemiologicznych fakt uwzględniony został ostatnio przez Europejskie Towarzystwo Kardiologiczne w ocenie 10-letniego ryzyka zgonu z powodu chorób sercowo-naczyniowych o podłożu miażdżycowym w postaci dodatkowych tabel ryzyka (SCORE) zawierających różne stężenia tego analitu [3].

Innym składnikiem lipidowym oznaczanym rutynowo w laboratoriach medycznych są triglicerydy. Ich znaczenie, jako niezależnego czynnika ryzyka choroby wieńcowej, jest mniejsze niż cholesterolu. Triglicerydy, chociaż są uznawane za niezbyt mocny predyktor choroby niedokrwiennej serca, odgrywają rolę jako marker zaburzeń gospodarki lipidowej – pierwotnych i wtórnych hipertriglicerydemii. Te ostatnie są znacznie częstsze w populacji, choćby dlatego, że obecne są w zespole metabolicznym i cukrzycy typu 2. Hipertriglicerydemii bardzo często towarzyszy obniżone stężenie cholesterolu HDL.

Wiarygodność oznaczeń lipidów ma istotne znaczenie zarówno w prewencji pierwotnej jak i wtórnej miażdżycy i jej klinicznych konsekwencji, głównie w postaci choroby niedokrwiennej serca i zawału mięśnia sercowego. Nieoptymalny wynik oznaczenia cholesterolu (w Polsce około połowa populacji ma stężenia powyżej granicznej wartości 200 mg/dl) oznacza, przy racjonalnym postępowaniu, odpowiednie ograniczenia dietetyczne oraz u niemałego odsetka osób leczenie hipolipemizujące statynami praktycznie przez całe życie (podobnie jak nadciśnienia tętniczego). Leczeniu statynami podlegają praktycznie wszyscy pacjenci z rozpoznaną chorobą niedokrwinną serca i innymi chorobami układu krążenia spowodowanymi miażdżycą. Intensywność leczenia statynami (ich dawkowanie) tych pacjentów zakłada uzyskanie docelowych stężeń cholesterolu LDL

70 mg/dl lub mniejszych, a jeśli to niemożliwe zaleca się obniżenie stężenia LDL-C o 50% wartości wyjściowej.

Czynniki przedlaboratoryjne i przedanalityczne

Wiarygodność oznaczeń lipidów zależy od wielu czynników, z których na poczesne miejsce wysuwają się czynniki przedlaboratoryjne i przedanalityczne. Znaczenie tych czynników jest w pewnej mierze uzależnione od stosowanych metod oznaczania lipidów i celów, jakim te oznaczenia służą. Jeśli celem jest diagnostyka zaburzeń lipidowych (hiperlipidemii, dyslipidemii) wówczas oznacza się kompletny profil lipidowy, tj. cholesterol całkowity, triglicerydy oraz cholesterol HDL.

Wykonanie pełnego profilu lipidowego wymaga 12 godzinnej przerwy w spożywaniu pokarmów poprzedzającej pobranie krwi. Pacjent powinien być na czczo, aby uniknąć poposiłkowej hipertriglicerydemii. Po standardowym posiłku (ok. 700 kcal) stężenie triglicerydów w osoczu krwi wzrasta około 50%. Najdogodniejszym czasem pobrania są zatem godziny poranne (np. między 7:00 i 9:00). Pozycja ciała pacjenta powinna być wystandaryzowana ze względu na różnice stężeń lipidów – w pozycji siedzącej stężenia te są około 10% wyższe niż w leżącej. Przebywanie w określonej pozycji (najlepiej siedzącej) powinno trwać pewien czas – minimum 5 minut a idealnie około 15 minut; jest to trudne do osiągnięcia, ale możliwe przy dobrej organizacji (z wyłączeniem oczywiście pacjentów stale leżących). W czasie pobierania krwi nie należy zbyt długo utrzymywać ucisku stazy (najlepiej do 1 minuty); wzrost stężenia lipidów w próbce po kilkuminutowej aplikacji stazy jest rzędu kilku procent. Nie należy pobierać próbki z żyły łokciowej ramienia, na którym przed chwilą mierzono ciśnienie tętnicze.

Nieodpowiedni okres czasu, w którym pobiera się próbki na badania lipidowe może także obniżać wartość interpretacyjną wyniku, nawet jeśli wynik jest poprawny analitycznie. Przykładem tego jest przejściowe obniżenie stężenia cholesterolu i triglicerydów w pierwszych dobach po zawału mięśnia sercowego. Pomiary lipidów wówczas co prawda wiarygodnie określają stężenia lipidów, jednak nie szacują właściwie ryzyka, które wystąpi i może trwać po ostrej fazie ostrego zespołu wieńcowego (po kilku tygodniach). Obecnie ma to nieco mniejsze znaczenie, gdyż leczenie statynami u pacjentów hospitalizowanych z powodu zawału mięśnia serca rozpoczyna się niezwłocznie niezależnie od stężeń lipidów. Ogólną zasadą jest pobieranie próbek od pacjenta stabilnego metabolicznie, tj. z wykluczeniem ostrej choroby lub stresu, ciąży, zmian dietetycznych powodujących szybką zmianę masy ciała oraz szybką zmianę zawartości kwasów nasyconych w diecie [4]. Wiarygodnie

analitycznie wyniki, ale nie w pełni miarodajne w ocenie efektów leczenia, można uzyskać skutek zbyt wcześnie, po rozpoczęciu leczenia, wykonaniu analiz lipidowych (miarodajna ocena w przedziale 4-12 tygodni od początku leczenia lub zmiany dawki leku). Dotyczy to w jeszcze większym stopniu wdrożonego leczenia dietetycznego.

Na wyniki oznaczeń lipidów mogą mieć wpływ substancje egzogenne, głównie leki. Wpływ ten może polegać na działaniu bezpośrednim – in vitro lub na pośrednim – poprzez wpływ na metabolizm. Poza oczywistym wpływem leków hipolipemizujących jak statyny, fibraty, kwas nikotynowy inne leki, głównie hormonalne, mają określony wpływ na stężenia lipidów. Doustnie podawane estrogeny obniżają stężenie LDL-C i zwiększają stężenia HDL-C oraz triglicerydów. Androgeny i progestageny obniżają stężenie HDL-C [5]. Tyroksyna obniża stężenie cholesterolu całkowitego i LDL-C [6]. Oczywiście są także interferencje z oznaczeniami lipidów powstałe w toku leczenia pozajelitowego (wpływ egzogennych lipidów np. Intralipid). Potencjalny wpływ kwasu askorbinowego (jako reduktora działającego bezpośrednio) jest nieistotny aż do jego stężenia 3 mg/dl. Diuretyki tiazydowe powodują wzrost stężenia cholesterolu całkowitego i LDL-C. Niektóre beta-blokery wywołują wzrost stężenia cholesterolu całkowitego i zmniejszenie poziomu cholesterolu HDL. Etanol jest częstym czynnikiem egzogennym wpływającym na stężenia lipidów we krwi: zwiększa stężenie triglicerydów oraz, przy przewlekłym spożywaniu, cholesterolu HDL.

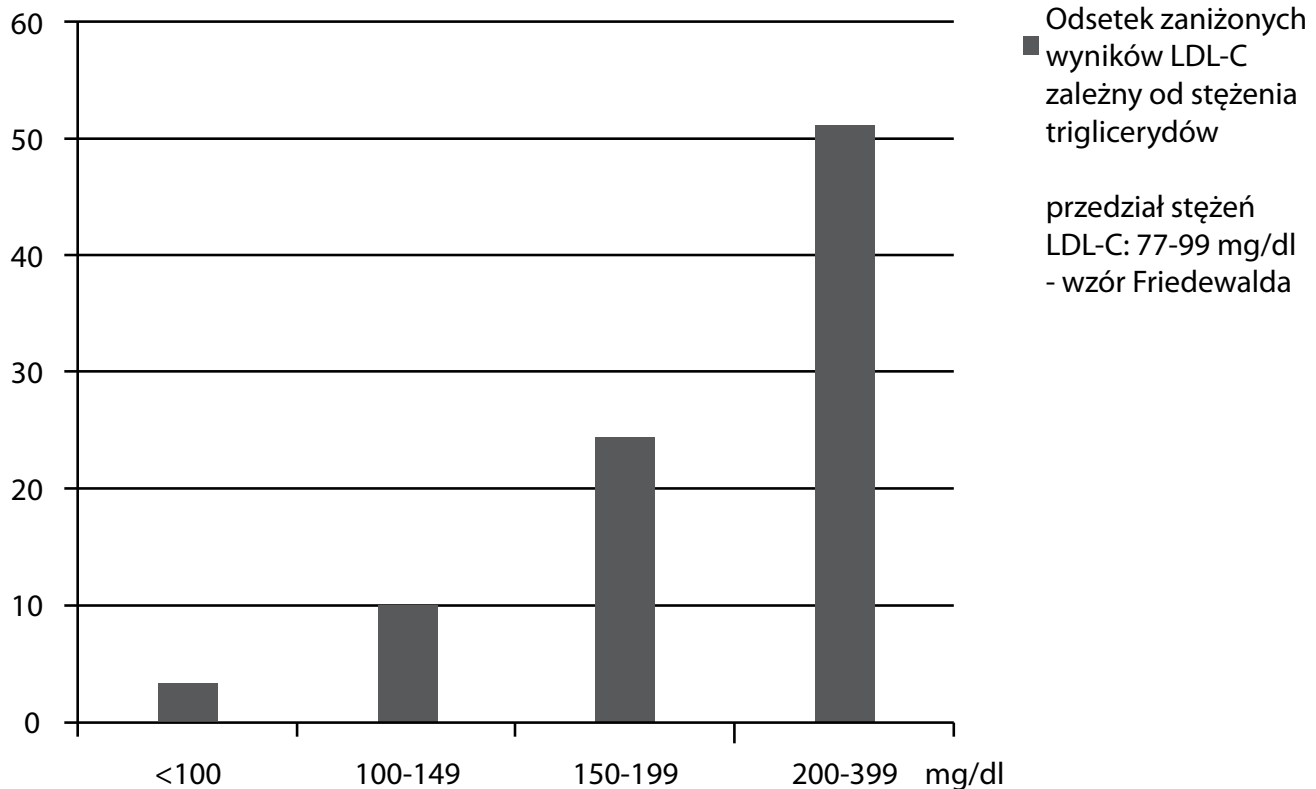
Rekomendowanym materiałem do oznaczeń lipidów jest surowica uzyskana po minimum 30 minutach wykrzepiania w temperaturze pokojowej i odwirowaniu próbki. Dopuszczalnym materiałem jest także osocze (pobranie do probówki z EDTA), ale wówczas, aby uzyskać wyniki do porównań z rekomendacjami (odnoszącymi się do surowicy) należy je przemnożyć przez faktor 1,03. Dotyczy to cholesterolu, LDL-C i triglicerydów, i występuje skutek efektu osmotycznego wywieranego przez EDTA na krwinki (efekt rozcieńczenia). Osocze powinno być uzyskane przez możliwie najszybsze odwirowanie pobranej próbki krwi. Jeśli w tej samej próbce zlecona jest glukoza, oddzielenie krwinek od osocza powinno nastąpić nie później niż 20-35 minut od pobrania krwi. Oznaczenia lipidów najlepiej wykonać w dniu pobrania próbki. Dopuszczalne jest przechowywanie od 3 do 4 dni przed wykonaniem analizy w temperaturze 4°C pod warunkiem zabezpieczenia próbki przed parowaniem (szczelne zamknięcie). W temperaturze – 20°C lipidy w próbce stabilne są przez wiele miesięcy a w temperaturze -70°C przez wiele lat [4] (należy zabezpieczyć próbkę przed liofilizacją).

Wpływ substancji endogennych na wiarygodność oznaczeń lipidowych wykonywanych metodami enzymatycznymi z pomiarem spektrofotometrycznym lub kolorymetrycznym jest ograniczony [7]. Poza zmętnieniem spowodowanym hipertriglicerydemią, może wystąpić hemoliza wskutek niewłaściwego pobrania lub obchodzenia się z próbką. Jednakże metody enzymatyczne są „odporne” na wpływ hemolizy i nie wywiera ona istotnego wpływu do stężeń hemoglobiny sięgających 5-6 g/l. Powyżej tego progu metody bezpośrednie mogą zawyżać wyniki LDL-C o około 10% [8]. Hiperbilirubinemia nie wywiera istotnego wpływu na wyniki oznaczeń lipidów do stężenia bilirubiny około 40 mg/dl. Powyżej tej wartości oznaczanie stężenia mogą być niższe niż faktyczne o około 5%. Kwas askorbinowy nie przeszkadza w oznaczeniach lipidowych.

Czynniki analityczne

Do niedawna zdecydowana większość laboratoriów medycznych określała stężenie cholesterolu LDL w sposób pośredni, wykorzystując wzór Friedewalda. U pacjentów z hipertriglicerydemią powoduje to z reguły niedoszacowanie LDL-C (co najmniej o około 10%). Takie niedoszacowanie może doprowadzić do zaszeregowania pacjenta do niewłaściwej (niższej) grupy ryzyka [9,10]. W zakresie stężeń triglicerydów 250-400 mg/dl błąd oznaczenia LDL-C uznawano do niedawna za niezbyt duży, ale jego rola rośnie, gdy zawartość cholesterolu w LDL jest w pobliżu wartości decydujących o wdrożeniu leczenia lub jego intensyfikacji (ryc.1). Natomiast powyżej 400 mg/dl niedokładność staje się znacząca. W celu pokonania tej niedogodności opracowano metody bezpośredniego oznaczania LDL-C, bez potrzeby izolowania tej frakcji z badanej próbki. Bezpośrednia metoda zapewnia większą dokładność oznaczania LDL-C również dlatego, iż nie dochodzą tu do głosu nieprecyzyjności określania trzech składników lipidowych potrzebnych w formule Friedewalda. W metodach bezpośrednich stężenie triglicerydów w próbce rzędu 1000-1200 mg/dl nie powoduje istotnej interferencji w oznaczeniu LDL-C. Jeśli stężenie to jest wyższe, próbkę należy rozcieńczyć solą fizjologiczną i po ponownym oznaczeniu przemnożyć wynik przez współczynnik rozcieńczenia.

Znaczna część oznaczeń lipidów służy do monitorowania leczenia lekami hipolipemizującymi, prawie wyłącznie statynami, obniżającymi nasilenie hipercholesterolemii poprzez hamowanie syntezy cholesterolu w wątrobie. Do takiego monitorowania wystarczy oznaczenie cholesterolu LDL metodą bezpośrednią w próbce pobranej w dowolnym czasie. Dotyczy to również próbek, w których zlecone jest



Ryc. 1. Zależność odsetka zaniżonych wyników LDL-C od stężenia triglicerydów w próbce (adaptacja wg Martin S., J Am Coll Cardiol. 2013; 62, 732-739)

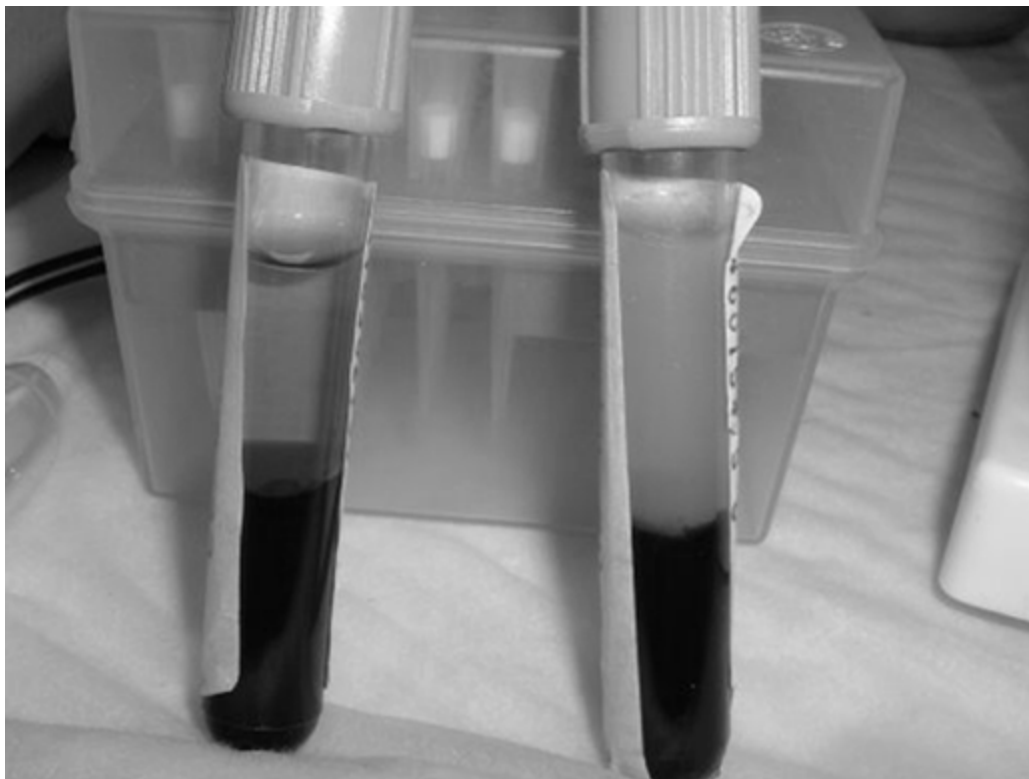
oznaczenie cholesterolu całkowitego i cholesterolu HDL, gdyż zmiany po posiłku i zmienność okołodobowa jest tu nieznaczna i nie wpływa istotnie na interpretację wyników. Ma to praktyczne znaczenie, gdyż niemała liczba pacjentów leczonych w trybie głównie ambulatoryjnym trafia do laboratoriów w godzinach popołudniowych i z reguły nie na czczo. Oznaczanie cholesterolu całkowitego i HDL-C również w próbkach pobranych w dowolnym czasie umożliwia określenie tzw. cholesterolu nie-HDL. Parametr ten zdaje się być bardziej skorelowany z ryzykiem choroby wieńcowej niż LDL-C, ale znajomość jego interpretacji wśród klinicystów jest ograniczona [11]. W roku 2014 brytyjskie towarzystwa naukowe zajmujące się prewencją chorób sercowo-naczyniowych rekomendowały oznaczanie cholesterolu całkowitego i cholesterolu HDL w przygodnych próbkach (niekoniecznie na czczo) oraz szacowanie ryzyka sercowo-naczyniowego na podstawie cholesterolu nie-HDL [12]. Parametr ten jest dobrze skorelowany ze stężeniem apolipoproteiny B (apoB) jedyne białkowe składnika LDL i lepiej odzwierciedla liczbę cząstek LDL niż cholesterol tej frakcji.

Monitorowanie terapii powinno odbywać się z wykorzystaniem tej samej metody. Dokładność oznaczeń LDL-C może się nieco zmienić w toku terapii w związku ze zmianami właściwości lipoprotein w jej toku [13]. Dotyczy to również metod bezpośrednich. Duże zmiany we frakcjach

lipoprotein i dystrybucji lipidów pomiędzy frakcje, np. w hiperlipidemii typu III powodują znaczny błąd oznaczenia LDL-C również metodą bezpośrednią. Niemiernodajne wyniki oznaczenia LDL-C mogą być uzyskane w bardzo rzadkich przypadkach gammapatii, w szczególności monoklonalnej typu IgM (makroglobulinemia Waldenströma).

Na wyniki oznaczeń lipidowych w toku obserwacji tego samego pacjenta wpływa w zauważalny sposób biologiczna zmienność wewnątrzosobnicza. W przypadku cholesterolu całkowitego wynosi ona średnio około 6%, ale u niektórych pacjentów nawet 11% [14].

Wiarygodność oznaczeń lipidów zależy także w oczywisty sposób od precyzji i dokładności odpowiednich metod analitycznych. Metody enzymatyczne oznaczania cholesterolu i triglicerydów poprawiły swoistość analityczną a metody bezpośrednie oznaczania LDL-C i HDL-C umożliwiły automatyzację całego procesu analitycznego i tym samym osiągnięcie dobrej precyzji. Wymagana precyzja oznaczeń cholesterolu całkowitego i frakcji LDL wyrażona współczynnikiem zmienności (CV) wynosi odpowiednio 3% i 4%; te same wartości odnoszą się do błędu systematycznego [15]. Tolerowana nieprecyzność stanowi więc około połowy zmienności biologicznej tych lipidów [16]. Dopuszczalny błąd całkowity



Ryc. 2. Wygląd próbki z hipertriglicydemią (z prawej strony)

wynosi dla cholesterolu 8,9% a dla cholesterolu LDL 12%. Są to wartości osiągalne w laboratoriach wykorzystujących współczesne metody oznaczania lipidów, w tym metody bezpośrednie i automatyczne analizatory. Oznaczanie cholesterolu LDL metodami bezpośrednimi jest najbardziej wskazane u pacjentów z wysokim ryzykiem chorób sercowo-naczyniowych lub ich powikłań, w tym pacjentów leczonych statynami oraz pacjentów z hipertriglicydemią.

Podsumowanie

Zmienność przedanalityczna stanowi około 2/3 zmienności całkowitej obserwowanej w toku badania składników lipidowych surowicy (osocza) krwi. Jej zmniejsze-

nie poprzez odpowiednie przygotowanie pacjenta przed pobraniem krwi i standaryzację warunków pobrania, ma kluczowe znaczenie dla wiarygodności oznaczeń lipidów. Jeśli nie ma potrzeby oznaczania triglicerydów, próbka do oznaczania cholesterolu całkowitego i cholesterolu HDL może być pobrana w dowolnym czasie i pacjent nie musi być na czczo. To samo odnosi się do oznaczania cholesterolu LDL pod warunkiem stosowania metod bezpośrednich. Te ostatnie są szczególnie przydatne do monitorowania leczenia hipercholesterolemii, gdyż zapewniają większą precyzję oznaczania cholesterolu LDL niż wyliczanie go z formuły Friedewalda na podstawie trzech oznaczeń lipidowych. Może to, oprócz zapewnienia większej wygody badanemu, mieć także wymiar ekonomiczny.

Piśmiennictwo:

1. Europejskie wytyczne dotyczące zapobiegania chorobom serca i naczyń w praktyce klinicznej na 2012 rok, Kardiologia Polska, 2012; 70, supl. I: S 1–S 100.
2. Stone N, Robinson J, Lichtenstein A i wsp.: 2013 ACC/AHA Guideline on the Treatment of Blood Cholesterol to Reduce Atherosclerotic Cardiovascular Risk in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. <http://circ.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/01.cir.0000437738.63853.7a/-/DC1>.
3. Reiner Ž, Catapano A, De Backer G i wsp.: ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias. Eur Heart J 2011, 32, 1769–1818.
4. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. Ed.: Burtis C, Ashwood E, Brunis D., W.B. Saunders Company, Philadelphia, 2008.
5. Young D.: Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests, 5th Edition. AACC, 2000.
6. Asranna A, Taneja R, Kulshreshtha B.: Dyslipidemia in sub-clinical hypothyroidism and the effect of thyroxine on lipid

- profile. *Indian J Endocrinol Metab* 2012, 16 (Suppl 2): S347-S349.
7. Ji JZ, Meng QH. Evaluation of the interference of hemoglobin, bilirubin, and lipids on Roche Cobas 6000 assays. *Clin Chim Acta*. 2011, 412 (17-18): 1550-1553.
 8. Nauck M, Warnick G, Rifai N: Methods for Measurement of LDL-Cholesterol: A Critical Assessment of Direct Measurement by Homogeneous Assays versus Calculation. *Clin Chem* 2002; 48, 236-254.
 9. Martin S, Blaha M, Elshazly M I i wsp: Friedewald-estimated versus directly measured low-density lipoprotein cholesterol and treatment implications. *J Am Coll Cardiol*. 2013; 62, 732-739.
 10. Ciach E, Bobilewicz D, Kmin E: Porównanie stężeń cholesterolu frakcji LDL wyliczonych z równania Friedewalda i oznaczonych metodą bezpośrednią. *Diagn Lab* 2011, 47, 419-423.
 11. Cui Y, Blumenthal R, Flaws J i wsp.: Non-high-density lipoprotein cholesterol level as a predictor of cardiovascular disease mortality. *Arch Intern Med* 2001; 161: 1413-1419.
 12. Joint British Societies' consensus recommendations for the prevention of cardiovascular disease (JBS3) *Heart* 2014;100:Suppl 2 ii1-ii67 doi:10.1136/heartjnl-2014-305693.
 13. Davidson M, Liu SX, Barter P i wsp.: Measurement of LDL-C after treatment with the CETP inhibitor anacetrapib. *J Lipid Res* 2013; 54: 467-472.
 14. Rifai N, Dufour D, Cooper G. Preanalytical variation in lipid, lipoprotein, and apolipoprotein testing. In: Rifai N, Warnick GR, Dominiczak MH, eds. *Handbook of Lipoprotein Testing*. 2nd ed. Washington, DC: AACC Press; 2000: 161-187.
 15. Warnick G, Kimberly M, Waymack P i wsp: Standardization of Measurements for Cholesterol, Triglycerides, and Major Lipoproteins. *Labmedicine*, 2008, 39, 481-490.
 16. Minchinela J, Ricós C, Perich C i wsp: Desirable Specifications for Total Error, Imprecision, and Bias, derived from intra- and inter-individual biologic variation. 2014, <http://www.westgard.com/biodatabase1.htm>

Warto wiedzieć

Czy oznaczenia hemoglobiny glikowanej mogą być czynnikiem prognostycznym chorób sercowo-naczyniowych

Wyniki zostały opracowane w oparciu o dane uzyskane z 73 badań prospektywnych, obejmujących 294 998 osób, które w chwili rozpoczęcia obserwacji nie zgłaszały ani cukrzycy, ani chorób sercowo-naczyniowych. Badania prowadzono średnio przez okres 9,9 lat (7,6 – 13,2).

Obserwowano 20 840 incydentów zarówno zakończonych zgonem, jak i powrotem do zdrowia, w tym 13 237 przypadków ostrych epizodów wieńcowych i 7 603 udarów. Wyniki oznaczeń HbA_{1c} dodawane do innych uznanych czynników ryzyka, jak cholesterol, triglicerydy i eGFR nie powodowały istotnych zmian, które znalazłyby odzwierciedlenie w reklasyfikacji według klasycznych kategorii 10 letniego ryzyka (SCORE ang. Systematic COronary Risk Evaluation - skala oceny ryzyka sercowo-naczyniowego). Minimalne zmiany są porównywalne do uzyskanych przy dodaniu jako czynnika ryzyka stężenia glukozy.

Glycated hemoglobin measurement and prediction of cardiovascular disease. JAMA 2014

Non-HDL cholesterol

Cholesterol non-HDL nie jest wyliczany w ramach wyników tzw. profilu lipidowego w Polsce. Stanowi on różnicę pomiędzy stężeniem cholesterolu całkowitego a stężeniem rutynowo oznaczanego cholesterolu HDL i odzwierciedla zawartość cholesterolu we wszystkich aterogennych frakcjach. W skład tych frakcji poza LDL wchodzi również VLDL, Lp(a) a także tzw. frakcje pośrednie. W oparciu o ogromną bazę danych parametrów lipidowych oznaczanych w Stanach Zjednoczonych w latach 2009-2011 (ponad 1 milion) i porównywanych z wynikami uzyskanymi przy rozdziałach frakcji w oparciu o ultrawirowanie wykazano, że w oparciu o non-HDL cholesterol istotny procent pacjentów uległ reklasyfikacji do wyższej klasy ryzyka lub konieczności intensyfikacji terapii. Dotyczyło to osób z relatywnie niskimi wartościami LDL-ch przy podwyższonych stężeniach triglicerydów. Przykładowo 22% pacjentów ze stężeniem LDL-ch poniżej 70 mg/dl i triglicerydów w granicach 150-200 mg/dl miało non-HDL cholesterol powyżej 100 mg/dl. Michael Cobble w artykule publikowanym

w J. Amer. College of Cardiology we wrześniu 2013 zaleca równoległe podawanie zarówno stężenia chol-LDL, jak i non-HDL z zastrzeżeniem, że te ostatnie powinny być zweryfikowane w odniesieniu do potrzeb klinicznych.

LabMedica International, luty-marzec 2014

Czas przeżycia chorych na nowotwory

Czas przeżycia chorych na raka jest jednym z kluczowych parametrów oceniających stan opieki zdrowotnej. Zgodnie z ostatnio publikowanymi danymi programu EURO-CARE-5 (*Lancet Oncology*), obejmującymi 29 krajów, w całej Europie obserwuje się pomyślną tendencję zmian, z tym że są różnice pomiędzy Europą Wschodnią a pozostałymi krajami (brak bardziej sprecyzowanych lokalizacji geograficznych).

W tabeli przedstawiono wzrost odsetka chorych dorosłych przeżywających 5 lat od chwili rozpoznania. Przykładowe wartości średnie dla całej Europy. Wartości dla krajów Europy Wschodniej są o kilka procent niższe.

Umiejscowienie raka	1999-2001	2005-2007
Gruczoł krokowy	73,4%	81,7%
Chłoniaki non-Hodgkin's	53,8%	60,4%
Jelito grube (odbytnica)	52,1%	57,6%

W latach 2005-2007 największy procent 5-letniej przeżywalności (ponad 80%) stwierdzono w przypadkach raka jąder, tarczycy, gruczołu krokowego i ziarnicy złośliwej (Chłoniaki typu Hodgkin's). Najniższy procent (poniżej 15%) dotyczy raka przełyku, wątroby, płuc i trzustki.

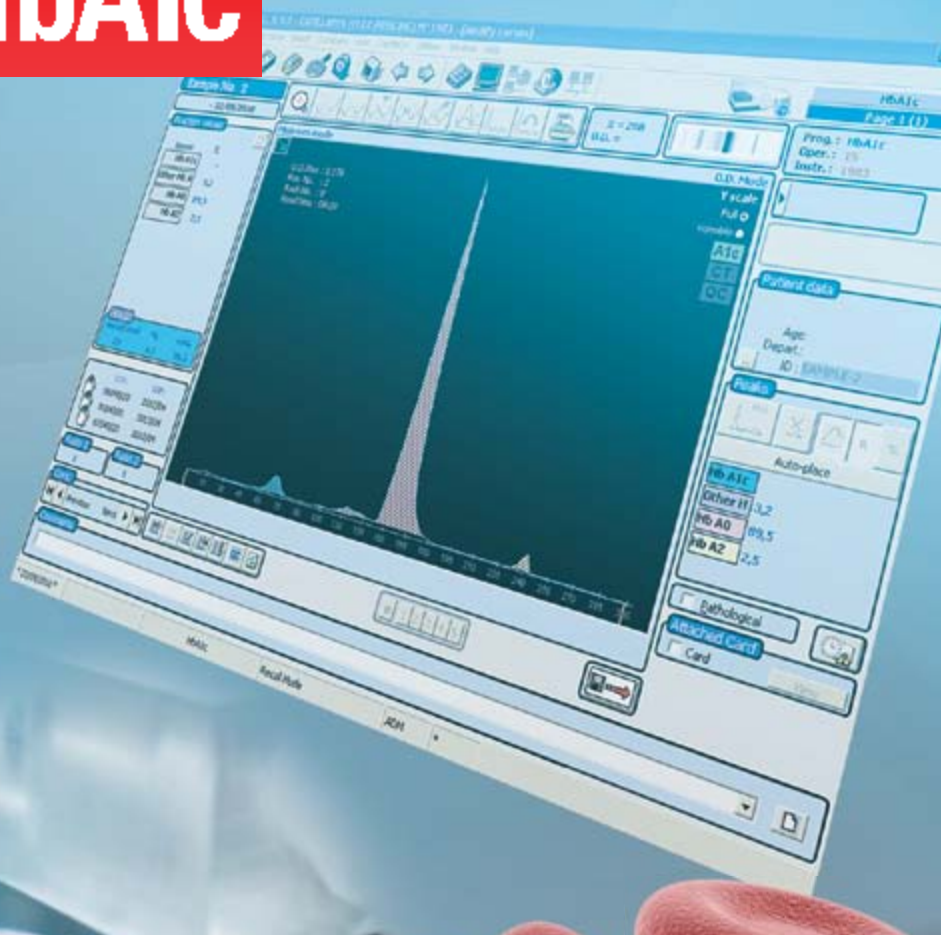
Wartości dla populacji pediatrycznej (0-14 lat) wynoszą 76% (1999-2001) i 79% (2005-2007), z tym że największy wzrost był w krajach Europy Wschodniej od 65% do 70%, jednakże nadal odsetek ten jest niższy w porównaniu do Europy Północnej i Środkowej, gdzie wynosi ponad 80%. Pozytywne zmiany są najbardziej widoczne w odniesieniu do nowotworów krwi u dzieci, które stanowią ponad 1/3 wszystkich nowotworów w tej grupie wiekowej.

Opracowano na podstawie:

Cancer survival: Large disparities in Europe. B. Gouget, LabMedica International, luty-marzec 2014

HbA1c

HORIBA
Medical



HbA1c
pomiar metodą
elektroforezy
kapilarnej

Minicap Flex Piercing

Szybki i precyzyjny
rodział

Rozdział o wysokiej rozdzielczości

Prosta formuła liczenia

Precyzja wyniku

Powtarzalność

Liniowość

Certyfikat IFCC

Formuła liczenia zgodnie z zaleceniami IFCC

$$\text{HbA1c} = \text{HbA1c} / (\text{HbA1c} + \text{HbA0})$$

sebia

ABX Pentra 400

Analizator chemii klinicznej

Od testów rutynowych do specjalistycznych
– wszystko w jednym analizatorze



- Analizator typu „bench top”
- Do 420 testów na godzinę
- Zintegrowany moduł ISE
- 55 parametrów na pokładzie analizatora
- Ekran dotykowy
- Podgląd pracy w czasie rzeczywistym
- Zintegrowana stacja robocza i moduł automatycznego zatwierdzania wyników

