

## SPIS TREŚCI

- 3** Zespół metaboliczny w aspekcie zaburzeń związanych z insulinoopornością  
Metabolic syndrome in an aspect of insuline resistance  
*Grażyna Sygitowicz, Dariusz Sitkiewicz*
- 9** Grelina – czyli przez żołądek do serca  
Ghrelin: through the stomach to the heart  
*Dariusz Sitkiewicz, Grażyna Sygitowicz, Sławomir Biątek, Błażej Grodner*
- 15** Diagnostyka laboratoryjna ludzi i zwierząt – perspektywy i bariery integracji  
Laboratory diagnostics of humans and animals – perspectives and barriers of integration  
*Ryszard Drożdż*
- 24** Przydatność diagnostyczna i metody oznaczania transferyny ubogowęglowodanowej (CDT)  
The diagnostic usefulness and methods of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) determination  
*Bogdan Cylwik, Lech Chrostek, Maciej Szmitkowski*
- 30** Wskazania do mikroskopowej oceny rozmazu krwi obwodowej i aktualne możliwości przeprowadzania kontroli jakości tego badania  
Indications for microscopic peripheral blood smear examination and present applicability of quality control of this method  
*Krzysztof Lewandowski*
- 34** Warto wiedzieć

**Wydawca** IN VITRO EXPLORER

**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](http://www.horiba-abx.com.pl)

**Redaktor koordynujący:** Justyna Głowienka-Korzeń

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

**Redakcja:** Maria Domagała, Marta Domagała

**Projekt graficzny:** Aleksandra Król

**Skład i łamanie:** Zych Studio

ISSN 1732-9752

Nakład: 3000 egz.

wrzesień 2010

Zasady publikowania prac w IN VITRO EXPLORER

do wglądu u p. Renaty Polkowskiej

e-mail: [renata.polkowska@horiba.com](mailto:renata.polkowska@horiba.com)

# ZESPÓŁ METABOLICZNY W ASPEKCIE ZABURZEŃ ZWIĄZANYCH Z INSULINOOPORNOŚCIĄ

METABOLIC SYNDROME IN AN ASPECT OF INSULINE RESISTANCE

Grażyna Sygitowicz, Dariusz Sitkiewicz

## Streszczenie

Zespół metaboliczny (ZM) to konstelacja szeregu nieprawidłowości metabolicznych, prowadzących do wzrostu ryzyka chorób sercowo-naczyniowych i cukrzycy typu 2. Na przestrzeni ostatnich 20 lat obserwujemy niemal epidemię ZM, narastającą wraz z wiekiem. Otyłość brzuszna i zjawisko insulinooporności są głównymi determinantami rozwoju zespołu metabolicznego. Otyłość związana jest ze stanem zapalnym w następstwie generacji prozapalnych adipokiny i wolnych kwasów tłuszczowych. Interakcja tych molekuł ze szlakiem przekazywania sygnałów po aktywacji receptora insulinowego prowadzi do zjawiska insulinooporności. Insulinooporność, definiowana jako słabsza reakcja tkanek na stężenie hormonu, jest głównym patomechanizmem cukrzycy typu 2. Znajomość molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za insulinooporność jest warunkiem opracowania i wdrożenia postępowania, ograniczającego dysfunkcję śródbłonna naczyniowego i zaburzenia metaboliczne, a tym samym pozwalającego na redukcję ryzyka chorób sercowo-naczyniowych.

## Słowa kluczowe

Zespół metaboliczny, insulinooporność, otyłość, cukrzyca typu 2, ryzyko sercowonaczyniowe.

## Summary

The metabolic syndrome is a cluster of metabolic abnormalities leading to increased risk for cardiovascular diseases and diabetes type 2. Its prevalence is increasing with aging. There exists actually an epidemic of metabolic syndrome. Visceral obesity and the resulting insulin resistance are the major determinant in the development of metabolic syndrome. Abdominal obesity results in a low grade inflammation mediated by pro-inflammatory molecules as well as free fatty acids by interfering with the normal insulin signaling pathway leading to insulin resistance. Insulin resistance is defined as a less than expected biological response to a given concentration of the hormone and it plays a pivotal role in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. The characterization of molecular mechanisms involved in the pathogenesis of insulin resistance may help to design efficacious pharmacological molecules to treat endothelial and metabolic dysfunction associated with insulin resistance states to reduce the cardiovascular risk.

## Keywords

Metabolic syndrome, insulin resistance, obesity, diabetes type 2, cardiovascular risk.

Zespół metaboliczny (ZM) to konstelacja szeregu nieprawidłowości metabolicznych, które coraz częściej obciążają organizm ludzki, zwłaszcza w dobrze sytuowanym społeczeństwie. Obraz współwystępujących zaburzeń charakterystycznych dla zespołu metabolicznego kształtował się na przestrzeni ostatnich 20, a nawet 30 lat. Te zaburzenia metaboliczne ściśle wiążą się ze zwiększonym ryzykiem występowania cukrzycy typu 2 oraz częstością incydentów sercowo-naczyniowych, czyli obciążeniem kardiometabolicznym.

Na czynniki ryzyka zaburzeń układu sercowo-naczyniowego dogłębnie spojrzął w 1988 roku Reaven (1). Uznał on, iż współwystępowanie sześciu czynników, takich jak hiperinsulinemia, insulinooporność, upośledzona tolerancja glukozy, dyslipidemia, nadciśnienie tętnicze oraz choroba wieńcowa, istotnie zwiększa ryzyko zgonu sercowego i nazwał ten zespół zaburzeń „zespołem X” ze względu na niejasne jeszcze wówczas wzajemne związki. Wysunął również przypuszczenie, że wspólnym stanem patofizjologicznym związanym

zarówno z zaburzeniami lipidowym, tak istotnymi dla zespołu metabolicznego (hipetriglicerydemia oraz niskie stężenie cholesterolu frakcji HDL), jak i z nadciśnieniem tętniczym jest oporność na insulinę.

Kolejne lata przyniosły pewne modyfikacje ówczesnego rozumienia pojęcia ZM, poszerzając jego definicję o istotne cechy kliniczne, takie jak zwiększona skłonność do zakrzepów oraz środowisko prozapalne. Jednakże prawdziwą rewolucją w podejściu do tego zaburzenia było wysunięcie na pierwszy plan często występującej u pacjentów nadmiernej masy ciała w postaci nadwagi czy otyłości, a szczególnie otyłości brzusznej. Powyższe zmiany w charakterystyce zespołu metabolicznego znalazły odzwierciedlenie w kryteriach rozpoznawania ZM.

W 1998 roku Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) po raz pierwszy precyzyjnie określiła kryteria rozpoznania ZM. Jednak ze względu na trudności w ocenie oporności na insulinę w praktyce klinicznej przyjęto kliniczną definicję Narodowego Programu Edukacji Cholesterolowej Stanów Zjednoczonych (Adult Treatment Panel III – ATP III). Najnowsze kryteria ZM przedstawione przez grupę konsultacyjną International Diabetes Federation (IDF), które uwzględniają patofizjologiczne podłoże obserwowanego współwystępowania nieprawidłowości metabolicznych, pochodzą z czerwca 2005 roku. Zgodnie z definicją zaproponowaną przez IDF zespół metaboliczny diagnozuje się u osób, które cechuje:

- otyłość brzuszna definiowana jako obwód w talii u kobiet 80 cm, zaś u mężczyzn 90 cm (w populacji europejskiej)

oraz występują dwa z czterech następujących czynników:

- zwiększone stężenie triglicerydów  $> 150$  mg/dl (u obojga płci),
- zmniejszone stężenie cholesterolu frakcji HDL (kobiety  $< 50$  mg/dl, mężczyźni  $< 40$  mg/dl),

- nadciśnienie tętnicze (RR  $> 130/85$  mm Hg),
  - zwiększone stężenie glukozy na czczo  $> 100$  mg/dl,
  - lub wcześniej rozpoznana cukrzyca typu 2
- lub osoby te są leczone z powodu wyżej wymienionych zaburzeń.

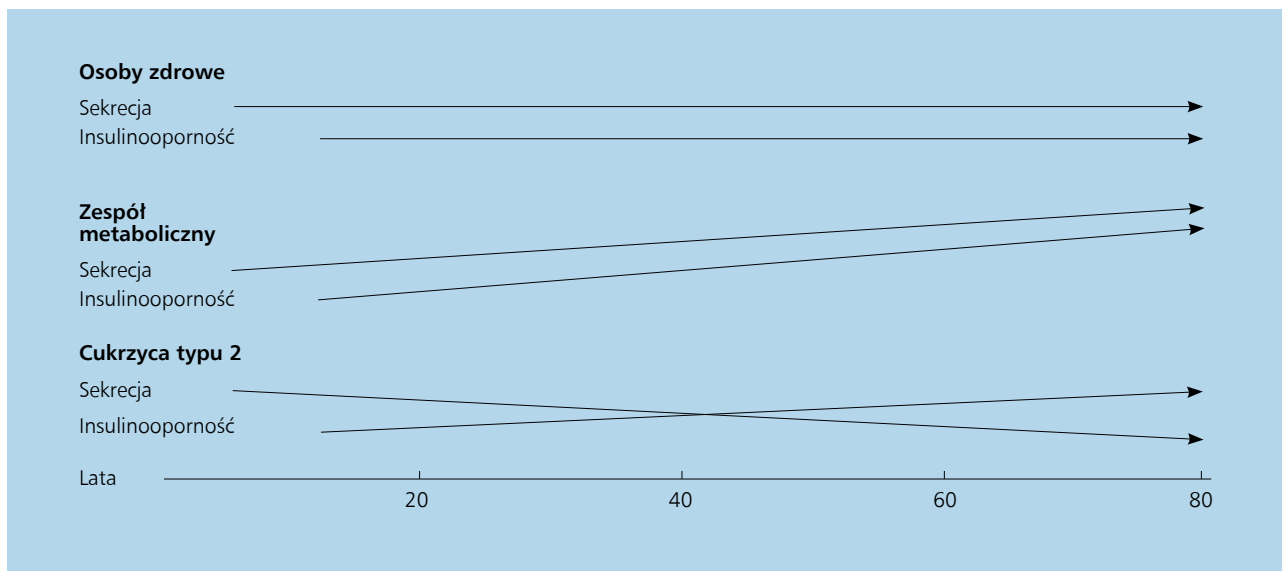
Amerykańskie Stowarzyszenie Endokrynologów Klinicznych (AACE) w 2003 roku zwróciło uwagę na dodatkowe elementy ZM, takie jak wiek  $> 40$  r.ż., niealkoholowe stłuszczenie wątroby, przewlekła obturacyjna choroba płuc, dodatni wywiad rodzinny w kierunku chorób układu krążenia, siedzący tryb życia czy pochodzenie etniczne.

Jest znamienne, że nomenklatura zespołu metabolicznego jest tak bogata i często zmieniana. ZM jest z pewnością zespołem zaburzeń metabolicznych, ale ciągłe modyfikacje jego definicji wprowadzają niemały zamęt wśród klinicystów.

Definicja IDF wskazuje otyłość jako niezwykle istotny czynnik ryzyka incydentów sercowo-naczyniowych. Niemniej zwraca uwagę również na fakt, że pozostałe składowe zespołu metabolicznego mogą również występować u osób z prawidłową masą ciała. Aktualnie uważa się, że jednak wspólnym mianownikiem składowych ZM jest insulinooporność, w patogenezie której ważną rolę ma odgrywać niewydolność wewnątrzwydzielnicza tkanki tłuszczowej (2). Wśród innych czynników patogenetycznych ZM wyróżniamy: czynniki genetyczne, środowiskowe i nieprawidłowości w życiu płodowym (3).

Niezależnie od zastosowanej definicji obecność ZM wiąże się z dwukrotnym wzrostem całkowitego ryzyka sercowo-naczyniowego, natomiast współistnienie pięciu składowych ZM zwiększa ryzyko czterokrotnie w porównaniu z populacją ogólną. Najwyższa korelacja łączy zespół metaboliczny z ryzykiem wystąpienia cukrzycy typu 2 (4).

Insulinooporność jest to stan obniżonej wrażliwości tkanek na działanie insuliny pomimo jej prawidłowego



**Ryc. 1.** Wzajemne zależności pomiędzy insulinoopornością a sekrecją insuliny w powstawaniu zespołu metabolicznego (5).

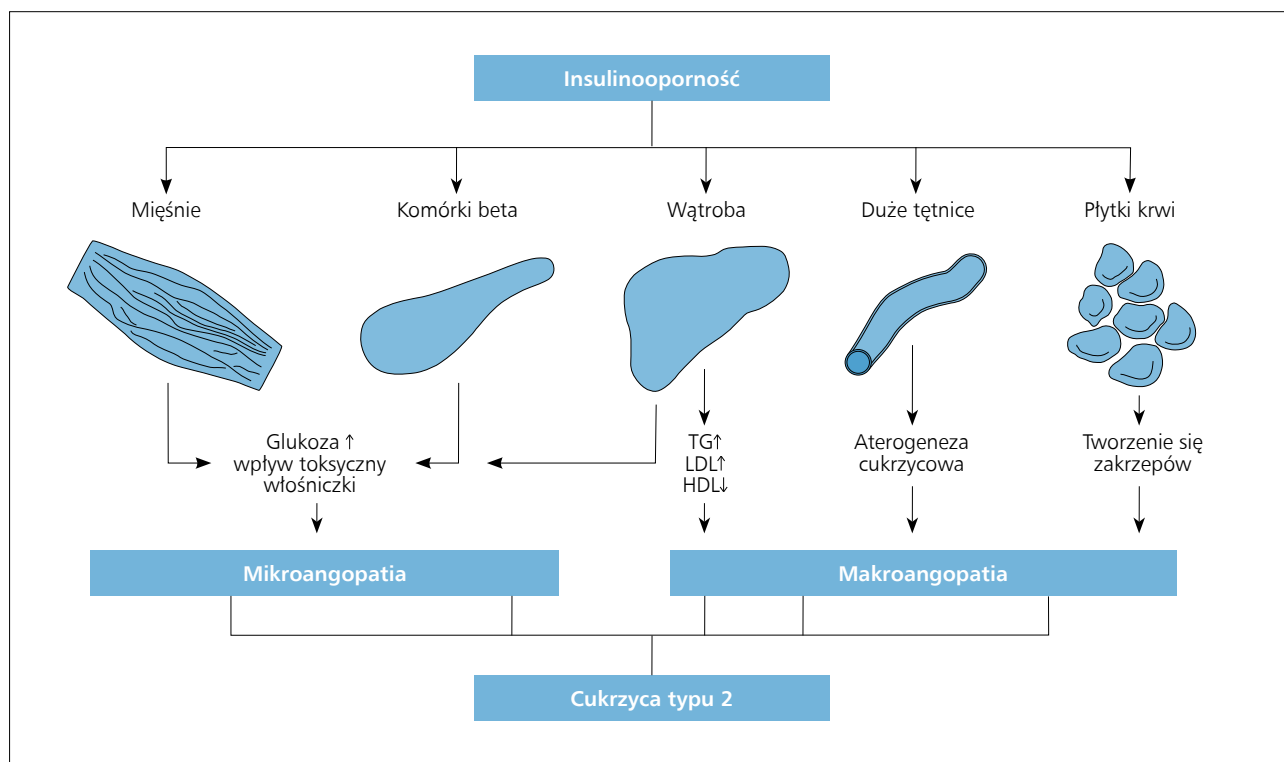
lub podwyższonego stężenia w surowicy krwi. Może być uwarunkowana genetycznie lub mieć charakter nabyty, rozwijać się w sposób utajony lub ujawniać się poprzez zaburzenia, takie jak upośledzona tolerancja glukozy, cukrzyca typu 2, hipercholesterolemia, hipertriglicydemia, otyłość typu centralnego (brzuszna), nadciśnienie tętnicze czy hiperurykemia (6).

Nasilona lipoliza prowadzi nie tylko do wzrostu stężenia wolnych kwasów tłuszczowych oraz triglicerydów w tkankach wrażliwych na insulinę (mięśniach, wątrobie). Dochodzi również do rozwoju przewlekłej reakcji zapalnej, gdyż otyłość uruchamia kaskadę czynników prozapalnych (7, 8). Zwiększona akumulacja tłuszczu trzewnego i podskórnego wiąże się z wysokim stężeniem markerów stanu zapalnego, jak np. białko C-reaktywne (CRP).

Adipocyty trzewne są wrażliwe na stymulację lipolizy przez katecholaminy, a odporne na antylipolityczne działanie insuliny. Jest bezspornym faktem, że adipocyty stanowią czynny endokrynnie organ. Komórki tłuszczowe są miejscem produkcji hormonów, cytokin i czynników wzrostu oraz markerów hemostazy i fibrynolizy (9). Gdy są one produkowane w fizjologicz-

nych stężeniach, to pełnią istotną fizjologiczną rolę. W przypadku nadmiernego wzrostu masy tkanki tłuszczowej dochodzi do nadmiernej produkcji tych substancji. Tak więc przerost tkanki tłuszczowej jest przyczyną wzrostu stężenia niekorzystnych mediatorów: czynnika martwicy guza alfa (TNF- $\alpha$ ), interleukiny-6 (IL-6), prozakrzepowego inhibitora aktywatora plazminogenu-1 (PAI-1), ale także spadku stężenia adiponektyny. Nadmierne gromadzenie się tkanki tłuszczowej w części centralnej organizmu przyczynia się do rozwoju zaburzeń lipidowych, nadciśnienia tętniczego, dysregulacji metabolizmu glukozy oraz aktywności prozakrzepowej. Tkanka tłuszczowa kryje więc w sobie wiele tajemnic, wśród których ważne miejsce zajmuje rozwój ZM.

Według hipotezy, którą zaproponował Randle [8], wolne kwasy tłuszczowe (WKT) i ich nadmierne utlenianie blokują prawidłowy metabolizm glukozy w mięśniach poprzez hamowanie aktywności heksokinazy, będącej kluczowym enzymem na szlaku glikolizy. Dochodzi również do zwiększenia produkcji wątrobowej glukozy w wyniku wzrostu ilości substratów oraz aktywności katalitycznej enzymów



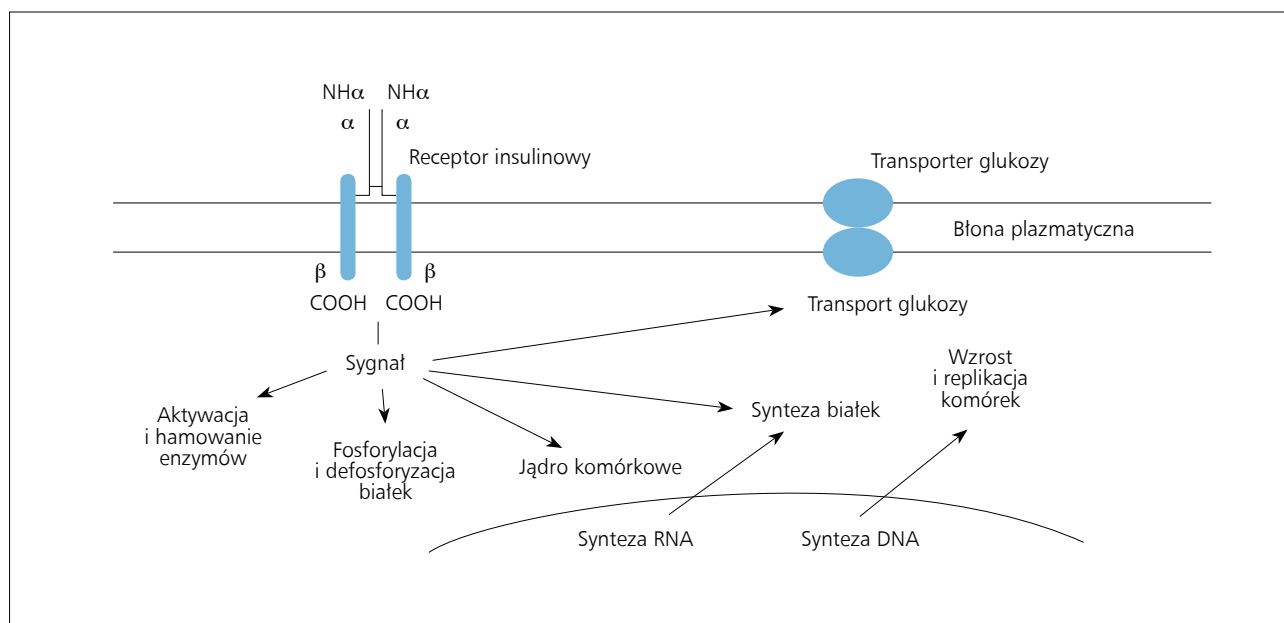
Ryc. 2. Wpływ insulinooporności na uszkodzenia różnych narządów (10).

glukoneogenezy na drodze oksydacji WKT w wątrobie. Istnieją podejrzenia, że przyczyną insulinooporności miocytów w warunkach nasilonego metabolizmu glukozy i nadprodukcji ATP jest głównie hamowanie aktywności kinazy białkowej, aktywowanej przez monofosforan adenozy (AMPK).

W konsekwencji dochodzi do nadprodukcji malonylo-CoA i zmniejszenia utleniania kwasów tłuszczowych. W mięśniach szkieletowych nasilone gromadzenie kwasów tłuszczowych i triglicerydów wiąże się z aktywacją kinazy białkowej C oraz z bezpośrednim hamowaniem transportera glukozy 4 (GLUT-4) (7, 8). Zauważono także, że im większa masa komórek tłuszczowych, tym większa jest insulinooporność, co prowadzi do zmian czynnościowych i strukturalnych receptora insulinowego (insulinooporność receptorowa i postreceptorowa) oraz wielu cząstek zaangażowanych w procesie przekazywania sygnałów w komórce (8). W wyniku przyłączenia insuliny do podjednostek alfa

receptora insulinowego dochodzi do autofosforylacji podjednostek beta receptora insulinowego i wyzwolenia jednego bądź kilku sygnałów. Są one początkiem szlaku przemian – odpowiedzi komórki na działanie hormonu oraz internalizacji receptora. Internalizacja jest to zagłębienie receptorów do wnętrza komórki i ogólnie rzecz biorąc jest to mechanizm regulujący liczbę receptorów insulinowych. Zjawisko down-regulation, czyli zmniejszenie liczby receptorów, występuje w przypadku hiperinsulinemii i polega na redukcji liczby receptorów insulinowych, co w konsekwencji powoduje obniżenie wrażliwości tkanek na insulinę. Insulina, będąca hormonem anabolicznym, wywołuje efekt metaboliczny poprzez łączenie się ze swoistym receptorem, a po jego przekształceniu i internalizacji wywołuje ona liczne efekty postreceptorowe (11), które obrazuje rycina 4.

Wyróżnia się trzy mechanizmy prowadzące do rozwoju insulinooporności: przedreceptorowy, receptorowy

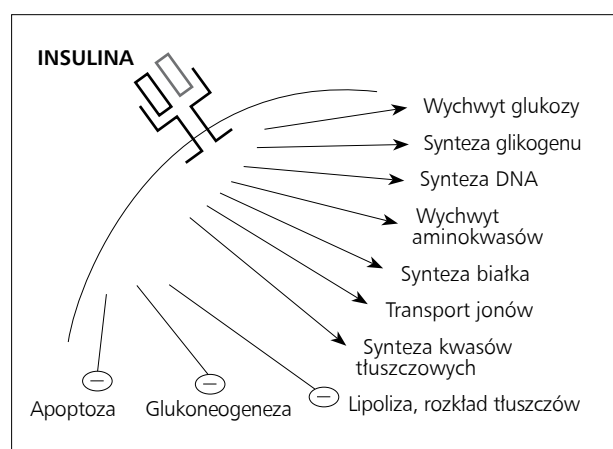


Ryc. 3. Budowa i działanie receptora insulinowego (6).

i postreceptorowy. W patogenezie cukrzycy istotne znaczenie mają dwa ostatnie mechanizmy. Za oporność receptorową odpowiedzialne jest zjawisko down-regulation lub zmniejszenie powinowactwa receptorów do insuliny. Zmiany czynnościowo-morfologiczne w receptorach mogą być również spowodowane przez mutacje. Typowa dla stanów hiperinsulinemii internalizacja, choć częsta, nie odgrywa zasadniczej roli w patofizjologii insulinooporności. Wykazano, że wysycając 10% receptorów, insulina wywołuje swój maksymalny efekt w tkankach obwodowych. Oporność postreceptorowa z kolei wiąże się najczęściej z zaburzeniami w procesach sygnalizujących przyłączenie insuliny do receptora insulinowego, ze zmianami w budowie i działaniu transporterów glukozy do wnętrza komórki oraz z przypadkami nasilonej lipolizy, kiedy to zwiększa się ilość WKT, a ich nadmierna oksydacja jest odpowiedzialna za hamowanie procesu glikolizy (6).

Molekularne mechanizmy insulinooporności są analogiczne do występujących w reakcji zapalnej. Większość adipokyn (rezystyna, IL-6, TNF- $\alpha$ , leptyna, adiponektyna i wisfatyna), wykazujących istotną rolę w rozwoju

insulinooporności, ma równocześnie działanie metaboliczne i immunologiczne. Kinaza białkowa C (PKC) łączy zaburzenia metaboliczne z procesem immunologicznym. Aktywacja PKC prowadzi do wzrostu produkcji aktywnego czynnika jądrowego kappa B (NF- $\kappa$ B), prozapalnych cytokin, białek ostrej fazy, reaktywnych form tlenu (stres oksydacyjny). Następnie dochodzi do zaburzeń interakcji pomiędzy komórkami odpowiedzi zapalnej i śródbłonna, co skutkuje wytworzeniem patologicznego fenotypu śródbłonna, predysponującego



Ryc. 4. Efekty działania insuliny (1).

do chorób układu sercowo-naczyniowego (7, 8, 12). Udowodniono, że stopień insulinooporności bezpośrednio wpływa na wzrost częstości występowania zawału serca, udaru mózgu i miażdżycy naczyń obwodowych (13).

W fizjologicznych stężeniach insulina działa wazodilatacyjnie oraz antyaterogennie, co jest związane z aktywacją syntezy tlenku azotu (NO) w komórkach endotelium. Natomiast w warunkach insulinooporności synteza tlenku azotu ulega zahamowaniu (inhibicja aktywności kinazy fosfatydyloinozytolu-3, PI-3) (14), insulina pobudza wytwarzanie związków stymulujących mitogenezę, zwiększa się także produkcja wolnych rodników tlenowych (WRT) (15).

Hiperinsulinemia zmienia metabolizm związków lipidowych, działa prozakrzepowo i sprzyja nadciśnieniu tętniczemu (7).

Podsumowując należy podkreślić, że zespół metaboliczny to zaburzenie, które nadal budzi wiele żywych dyskusji. Wydaje się, że niedostatecznie poznane są powiązania patogenetyczne i mechanizmy molekularne, leżące u podłoża zespołu metabolicznego, w tym zjawiska insulinooporności. Poznanie tych mechanizmów może przyczynić się do opracowania optymalnej strategii postępowania, prowadzącej do ograniczenia ryzyka sercowo-naczyniowego związanego z zespołem metabolicznym.

#### *Piśmiennictwo:*

1. Reaven G.M.: Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988; 37: 1595–1607.
2. Sieradzki J., Szopa M.: Patofizjologia zespołu metabolicznego – rola tkanki tłuszczowej [w:] Mamczarz A. (red.): Zespół metaboliczny. Warszawa, Medical Education Sp.z o.o. 2008; 25–36.
3. Cituk M., Jeznach-Steinhagen A., Sińska B.: Zespół metaboliczny – zmiany w kryteriach rozpoznawania. *Przew. Lek.* 2007; 5: 58–62.
4. Lau D.C.W.: Metabolic Syndrome: Perception or Reality? *Curr. Atheroscler. Rep.* 2009, 11: 264–271.
5. Sieradzki J.: Zespół metaboliczny – pojęcie, patofizjologia, diagnostyka i leczenie. *Diabetol. Prakt.* 2002; 3 (4): 187–195.
6. Grzesiuk W., Szydłarska D., Jóźwik K.: Insulinooporność w endokrynopatiach. *Endokr. Otyłość* 2008; 5 (1): 38–44.
7. Jasik M., Karnafel W.: Aspekty patofizjologiczne wpływu insuliny na układ sercowo-naczyniowy i zachowanie ciśnienia tętniczego. *Przegl. Kardiol.* 2009; 1: 25–29.
8. Zozulińska D.: Historia naturalna i leczenie cukrzycy typu 2. *Przew. Lek.* 2006; 3: 30–39.
9. Vazquez-Vela M., Torres N., Tovar A.: White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Arch. Med. Res.* 2008; 39 (8): 715–728.
10. Tatoń J., Czech A., Bernas M.: Patogeneza i diagnostyka insulinooporności [w:] Tatoń J., Czech A., Bernas M.: *Diabetologia kliniczna*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2008.
11. Isomaa B., Henricsson M., Almgren P., Tuomi T. et al.: The metabolic syndrome influences the risk of chronic complications in patients with Type II diabetes. *Diabetologia* 2001; 44: 1148–1154.
12. Yudkin J.: Inflammation, obesity, and the metabolic syndrome. *Horm. Metab. Res.* 2007; 39 (10): 707–709.
13. Fuller J.H., Stevens L.K., Wang S.L. and the WHO Multinational Study Group: Risk factor for cardiovascular mortality and morbidity: The WHO multinational study of vascular disease in diabetes. *Diabetologia* 2001; 44 (suppl. 2), S54–S64.
14. Derzhko R., Witkowska M.: Glucose Metabolism Disturbances and the Risk of Cardiovascular Diseases. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2006; 15 (5): 911–916.
15. Kannel W.B., Mc Gee D.L.: Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham Study. *JAMA* 1979; 241: 2035–2038.

**dr n.farm. Grażyna Sygitowicz**

**prof. dr hab. Dariusz Sitkiewicz**

*Katedra i Zakład Biochemii i Chemii Klinicznej*

*Warszawski Uniwersytet Medyczny*



# GRELINA – CZYLI PRZEZ ŻOŁĄDEK DO SERCA

GHRELIN: THROUGH THE STOMACH TO THE HEART

Dariusz Sitkiewicz, Grażyna Sygitowicz, Sławomir Białek, Błażej Grodner

## Streszczenie

Grelina, 28-aminokwasowy peptyd oktanoilowany w pozycji 3 seryny jest syntetyzowany przez komórki okładzinowe żołądka. Początkowo został zidentyfikowany jako endogenny ligand receptora stymulującego syntezę hormonu wzrostu. Ostatnie badania wskazują, że zarówno grelina, jak i jej receptory są syntetyzowane nie tylko w podwzgórzu i przysadce mózgowej, lecz także w innych tkankach, w których mogą wywoływać auto- i parakryne efekty – poza stymulacją syntezy hormonu wzrostu, stymulacją apetytu i spożycia pokarmu. Poza tymi podstawowymi efektami grelina reguluje kurczliwość przewodu pokarmowego, wydzielanie kwasu, a także wpływa na układ sercowo-naczyniowy, wykazuje działanie przeciwzapalne oraz moduluje proliferację komórek i aktywność wydzielniczą trzustki wpływając na metabolizm glukozy i lipidów. Coraz więcej danych wskazuje, że grelina jest zaangażowana w patogenezę wielu chorób, w tym również zaburzeń sercowo-naczyniowych. Artykuł podsumowuje dostępne dane o działaniu greliny na układ sercowo-naczyniowy oraz jej potencjalne znaczenie w leczeniu niewydolności serca, nadciśnienia tętniczego i choroby niedokrwiennej serca.

## Słowa kluczowe

Grelina, homeostaza energetyczna, patogenezę chorób sercowo-naczyniowych.

## Summary

Ghrelin, a 28. amino acid peptide containing n-octanoylated serine 3 residue that is essential for its activity is produced mainly by the stomach. Originally, ghrelin was identified as the endogenous ligand of the growth hormone secretagogue (GHS) receptor. Ghrelin might also be synthesized in other organs, where it might have autocrine or paracrine effects. GHS receptors are present in tissues other than the hypothalamus and pituitary, which indicates that ghrelin has other effects in addition to stimulating the release of growth hormone and stimulation of appetite and food intake. Besides this main actions, ghrelin regulates gastric motility and acid secretion, exerts cardiovascular and anti-inflammatory effects, modulates cell proliferation and influences endocrine and exocrine pancreatic secretion, as well as glucose and lipid metabolism. Recently, it has been suggested that ghrelin might be involved in the pathogenesis of many diseases including cardio-vascular disorders. We summarise here the current evidence surrounding the cardiovascular action of gherlin as therapeutic agent in common conditions such as heart failure, hypertension and ischemic heart disease.

## Keywords

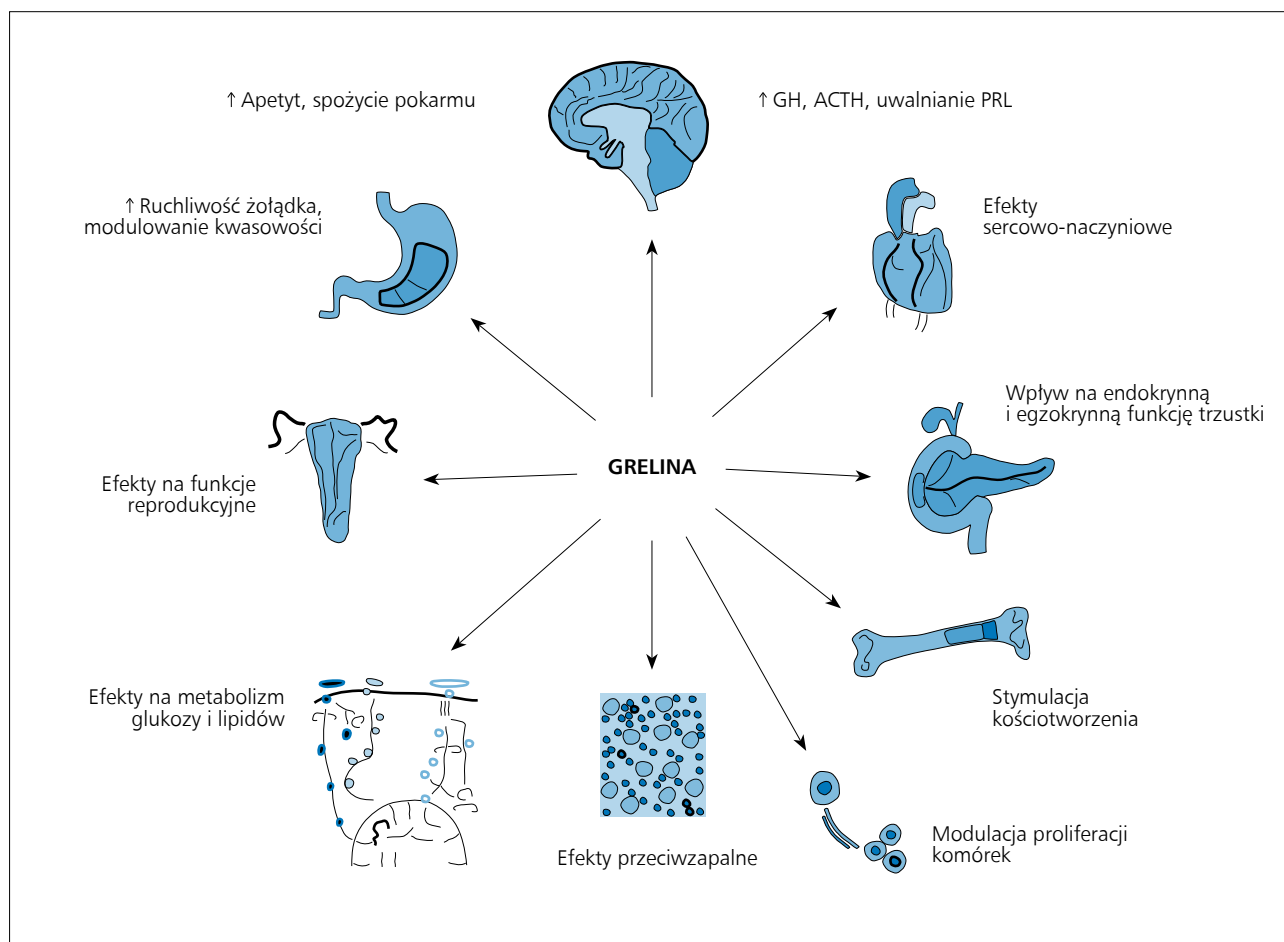
Ghrelin, orexigenic peptide, cardiovascular disorders.

## Wstęp

Grelina jest niedawno odkrytym hormonem syntetyzowanym w żołądku, który zidentyfikowano jako naturalny ligand receptora indukującego sekrecję hormonu wzrostu typu 1a (GHS-R1a). Grelina silnie stymuluje uwalnianie hormonu wzrostu (GH) zarówno u zwierząt, jak i ludzi. Związane z biał-

kiem G receptory GHS są obecne w podwzgórzu i przysadce mózgowej, co związane jest z regulacją syntezy hormonu wzrostu (1).

Receptory te są także obecne w innych regionach ośrodkowego układu nerwowego oraz tkankach obwodowych, co może świadczyć, iż grelina odpowia-



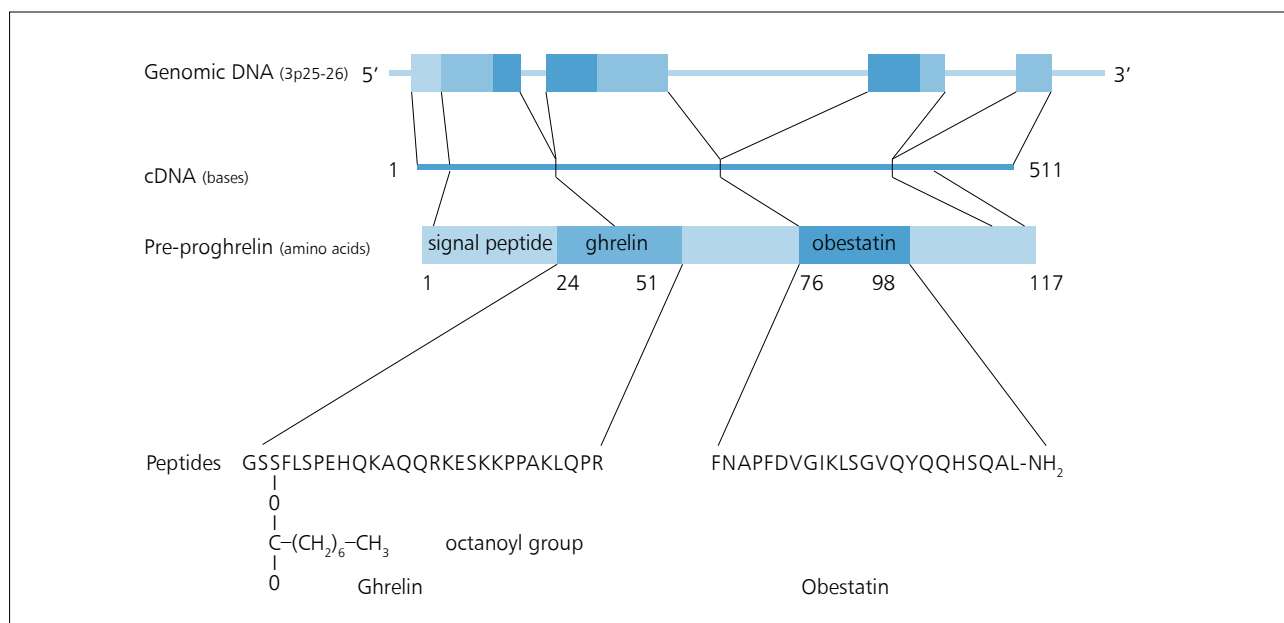
Ryc. 1. Biologiczna rola greliny.

da także za inne efekty poza stymulacją syntezy GH. I tak wykazano modulujące działanie greliny na apetyt, homeostazę energetyczną (wpływ na metabolizm glukozy i lipidów), działanie na układ sercowo-naczyniowy i pokarmowy, na układ odpornościowy, na proliferację komórek i metabolizm kostny (ryc. 1).

### Struktura, synteza i działanie biologiczne greliny

Gen ludzkiej greliny jest zlokalizowany na chromosomie 3 (3p25–26). Zawiera on cztery egzony i trzy introny i koduje mRNA o długości 511 bp. Tylko egzony 1 i 2 kodują dojrzały peptyd greliny (ryc. 2). W wyniku translacji grelinowego mRNA powstaje prekursor (preprogrelina) składający się ze 117

aminokwasów i zawierający peptyd sygnałowy (23 aminokwasy). Następnie powstaje progrelina (94 aminokwasy). Progrelina zawiera sekwencję greliny (28 aminokwasów) oraz 66-aminokwasowy fragment, który jest prekursorem obestatyny – peptydu odkrytego w 2005 roku przez Zhanga (2). Pod wpływem niezidentyfikowanej dotychczas acyltransferazy 28-aminokwasowy peptyd ulega unikalnej reakcji estryfikacji przez kwas oktanowy w pozycji 3 seryny (ryc. 3). Oktanoilacja peptydu jest niezbędna do wiązania greliny z jej receptorem GHS-R1a (3). Dwie trzecie krążącej greliny syntetyzowane jest przez komórki okładzinowe żołądka. Żołądek płodu nie syntetyzuje greliny. Dopiero po urodzeniu następuje ekspresja tego peptydu nie tylko przez żołądek,



Ryc. 2. Struktura genu greliny.

ale także przez jelito cienkie i grube. Grelina nie jest wydalana do światła przewodu pokarmowego, ale bezpośrednio do światła naczyń krwionośnych. Stężenie krążącej greliny oznaczane swoistym testem radioimmunologicznym wynosi 700 pg/ml (0,2 nM) w stanie głodu i spada do 300 pg (0,09 nM) po spożyciu pokarmu (4).

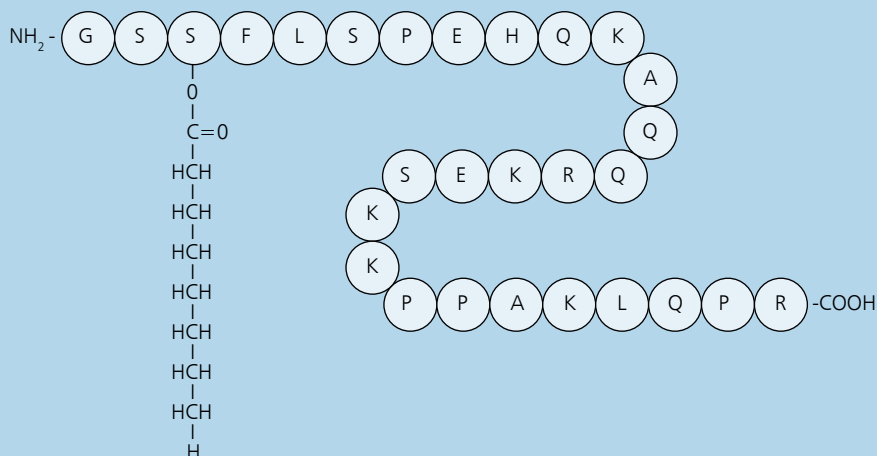
Zawartość greliny w ośrodkowym układzie nerwowym jest bardzo niska. Metodami immunohistochemicznymi wykazano obecność greliny w komórkach jądra łukowatego podwzgórza, a więc regionu mózgu odpowiedzialnego za kontrolę apetytu, co sugeruje jej udział w regulacji pobierania pokarmów poprzez aktywację syntezy neuropeptydu Y (NPY) (5). Obecność receptorów greliny w komórkach hipokampu skłania niektórych autorów do stawiania hipotezy, iż odgrywa ona także rolę w regulacji procesu zapamiętywania (6).

Poziom krążącej greliny jest silnie ujemnie skorelowany z indeksem masy ciała (BMI). Sekrecja greliny wzrasta w anoreksji psychogennej i kacheksji nowotworowej i obserwowanej w ciężkiej niewy-

dolności serca, podczas gdy jest obniżona w otyłości. Zmiany w stężeniu greliny zależne od stanu odżywienia są odwrotne do zmian stężenia leptyny, co sugeruje udział obu tych hormonów jako sygnałów do ośrodkowego układu nerwowego, regulujących równowagę energetyczną (ryc. 4). Badania na zwierzętach i ludziach wskazują na korzystny wpływ greliny na układ sercowo-naczyniowy (7, 8). Dołączenie greliny podanej dożylnie do standardowej terapii stosowanej w niewydolności serca powoduje zwiększenie zarówno masy, jak i frakcji wyrzutowej lewej komory, ale także obniżenie końcowej objętości skurczowej (9).

### Grelina a ciśnienie krwi

Dożylne podanie greliny powoduje zmniejszenie obwodowego oporu naczyniowego skutkującego spadkiem ciśnienia tętniczego. Do osiągnięcia tego efektu konieczne jest jednak blisko 8-krotnie wyższe stężenia greliny niż obserwowane w stanie głodu (10). Proponowane są przynajmniej trzy mechanizmy wyja-



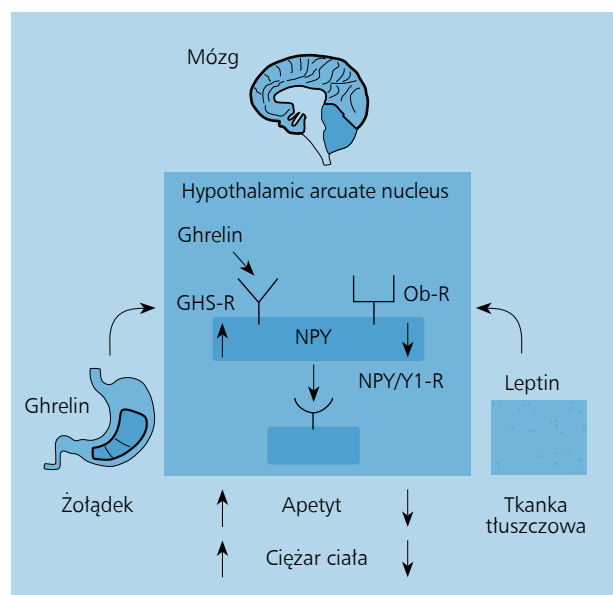
Ryc. 3. Struktura greliny

śniające obniżenie ciśnienia tętniczego: bezpośredni wpływ greliny na śródbłonek naczyniowy (11), wpływ na komórki mięśni gładkich naczyń (12), obwodowe działanie obniżające aktywność układu sympatycznego przypominające efekt stymulacji receptora adrenergicznego  $\alpha_2$  przez klonidynę (13). Działanie na śródbłonek naczyniowy polega prawdopodobnie na hamowaniu zarówno podstawowej, jak indukowanej TNF- $\alpha$  syntezy chemotaktycznych cytokin, zwiększaniu biodostępności tlenu azotu poprzez stymulację ekspresji śródbłonkowej syntazy NO, a także na hamowaniu indukowanej angiotensyną II migracji komórek śródbłonka naczyniowego (14). Hemodynamiczne efekty greliny zarówno bezpośrednie, jak i pośrednie wydają się bardzo złożone i nie do końca poznane.

Wysokie stężenia greliny konieczne do uzyskania efektu hipotensyjnego ograniczają jej zastosowanie w leczeniu nadciśnienia tętniczego. Jednak niskie stężenia greliny obserwowane w otyłości i stanach insulinooporności zdają się sugerować jej udział w kaskadzie molekularnych zaburzeń prowadzących zarówno do nadciśnienia tętniczego, jak i cukrzycy typu 2 – istotnych komponentów zespołu metabolicznego.

### Kardioprotekcyjne działanie greliny

Kardioprotekcyjne działanie greliny było badane na wielu modelach zwierzęcych, w których uszkodzenie mięśnia sercowego indukowano izoproterenolem, znanym agonistą receptorów  $\beta$ -adrenergicznych, lub angiotensyną II. W doświadczeniach tych wykazano, że podanie szczurom izoproterenolu



Ryc. 4. Regulacja apetytu przez grelinę i leptynę. Ob-R – receptor leptynowy, GHS-R – receptor grelinowy, NPY – neuropeptyd Y.

w 12 godzin po ostatnim wstrzyknięciu greliny zmniejszało śmiertelność zwierząt, a także łączyło się ze znacznie mniejszym uwalnianiem LDH oraz niższymi poziomami MDA – końcowego produktu peroksydacji lipidów (15). Jednocześnie w sercach szczurów, którym podawano grelinę i izoproterenol, obserwowano niższe poziomy mRNA endoteliny-1, jednego z najsilniej działających czynników naczynioskurczowych.

W modelu uszkodzenia powodowanego niedokrwieniem i reperfuzją, grelina istotnie zmniejszała obszar zawału (16).

Mechanizm odpowiedzialny za kardioprotekcyjne działanie greliny nie jest do końca wyjaśniony. Ma tu prawdopodobnie miejsce interferencja z aktywnością 5'-AMP, aktywowaną kinazą białkową (AMPK), kluczowym regulatorem szlaków zaangażowanych w zabezpieczenie energetyczne komórki, a także efekt antyapoptyczny. Wydaje się, że greliny są ważnymi elementami tego mechanizmu.

### **Przeciwzapalne działanie greliny**

Grelina jest istotnym modulatorem układu immunologicznego. Sekrecję greliny oraz obecność jej receptorów wykazano w limfocytach T. Zwiększone wydzielanie greliny z ludzkich limfocytów T następuje in vitro po ich aktywacji przez przeciwciała anti-CD3

i osiąga wartości zbliżone do tych obserwowanych w stanach głodu (17). Przeciwzapalne działanie greliny manifestuje się także hamowaniem syntezy prozapalnych cytokin: interleukiny 1- $\beta$ , interleukiny 6 i czynnika martwicy nowotworów – alfa.

Stan zapalny jest istotnym elementem w patogenezie miażdżycy i jej klinicznych powikłań w postaci ostrych zespołów wieńcowych. Wydaje się więc, że grelina może być czynnikiem spowalniającym progresję chorób sercowo-naczyniowych.

### **Podsumowanie**

Odkryta w 1999 roku grelina jest ważnym czynnikiem w regulacji homeostazy energetycznej ustroju. Szerokie spektrum jej biologicznego działania czyni z niej molekułę przyszłości. Szczególne zainteresowanie budzi w środowisku kardiologów, zajmujących się mechanizmami protekcji mięśnia sercowego w różnych stanach klinicznych od zawału do niewydolności serca. Udział greliny w patogenezie zespołu metabolicznego i cukrzycy typu 2 oraz wyraźne działanie przeciwzapalne skłania do badań nad określeniem jej roli jako czynnika ryzyka sercowo-naczyniowego. Poznanie szczegółowych mechanizmów molekularnych działania greliny może także doprowadzić do zdefiniowania jej roli jako celu ewentualnej interwencji farmakologicznej w chorobach układu krążenia.

## Piśmiennictwo:

1. De Kriese C., Delporte C.: Ghrelin: A new peptide regulating growth hormone release and food intake. *Intl. J. Biochem. Cell. Biol.* 2008; 40: 1420–1424.
2. Zhangh J.V., Ren P.G., Assian-Kretchmer O. et al.: Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science* 2005; 310: 996–999.
3. Hosoda H., Kojima M., Kangawa K.: Biological, physiological and pharmacological aspects of ghrelin. *J. Pharmacol. Sci.* 2006; 100: 298–410.
4. Hosoda H., Kojima M., Mizushima T., Kangawa K.: Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major ghrelin forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2000; 279: 903–913.
5. Perboni S., Inui A.: Appetite and gastrintestinal motility : Role of ghrelin-family peptides. *Clin. Nutr.* 2010; 29: 227–234.
6. Bennet P.A., Thomas G.B., Howard A.D. et al.: Hypothalamic growth hormone secretagogue-receptor (GHS-R) expression is regulated by growth hormone in the rat. *Endocrinology* 1997; 138: 4552–4557.
7. Smith R.G., Jiang H., Sun Y.: Developments in ghrelin biology and potential clinical relevance. *Trends Endocrin. Metabol.* 2005; 16: 436–441.
8. Garcia E.A., Korbonits M.: Ghrelin and cardiovascular health. *Cur. Opin. Pgarmacol.* 2006; 6; 142–147.
9. Nagaya M., Moriya J., Yasumura Y. et al. : Effects of ghrelin administration on left ventricular function, exercise capacity, and muscle wasting in patients with chronic heart failure. *Circulation* 2004; 110: 3674–3679.
10. Nagaya M., Kojima M., Uematsu M. et al.: Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2001; 280: R1483–R1487.
11. Okumura H., Nagaya N., Enomoto M., et al.: Vasodilatory effect of ghrelin, an endogenous peptide from the stomach. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2002; 39: 779–783.
12. Wiley K.E., Davenport A.P.: Comparision of vasodilators in human internal mammary artery: ghrelin is potent physiological antagonist of endothelin-1. *Br. J. Pharmacol.* 2002; 136: 1146–1152.
13. Lin Y., Matsumura K., Fukuhara M. et al.: Ghrelin acts at the nucleus of the solitary tract to decrease arterial presure in rats. *Hypertension* 2002; 43: 977–982.
14. Shimizu Y., Nagaya N., Teranishi Y. et al. : Ghrelin improves endothelial dysfunction through growth hormone-independent mechanism in rats. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2003; 310: 830–835.
15. Chang L., Zhao J., Li G.Z. et al.: Ghrelin protects myocardium from isoproterenolinduced injury in rats. *Acta Pharmacol. Sin.* 2004; 25: 1131–1137.
16. Chang L., Ren Y., Liu X. et al. : Protective effects of ghrelin on ischemia/reperfusion injury in the isolated rat heart. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2004; 43: 165–170.
17. Dixit V.D., Schaffer E.M., Pyle R.S. et al.: Ghrelin inhibits leptin – and activationinduced proinflammatory cytokine expression by humans monocytes and T cells. *J. Clin.Invest.* 2004; 114: 57–66.

**prof. dr hab. Dariusz Sitkiewicz**  
**dr n.farm. Grażyna Sygitowicz**  
**dr n.farm. Sławomir Białek**  
**dr n.farm. Błażej Grodner**

*Katedra i Zakład Biochemii i Chemii Klinicznej  
 Warszawski Uniwersytet Medyczny*

# DIAGNOSTYKA LABORATORYJNA LUDZI I ZWIERZĄT – PERSPEKTYWY I BARIERY INTEGRACJI

LABORATORY DIAGNOSTICS OF HUMANS AND ANIMALS – PERSPECTIVES AND BARRIERS OF INTEGRATION

Ryszard Drożdż

## Streszczenie

W ostatnich latach weterynaryjna diagnostyka laboratoryjna ulega dynamicznemu rozwojowi. Następuje szybki transfer technologii i algorytmów diagnostycznych sprawdzonych u ludzi. Podejmowane są próby bezpośredniego zastosowania w weterynarii sprzętu i odczynników używanych w laboratoriach klinicznych. W pracy przedyskutowano możliwości zastosowania w weterynarii automatycznych analizatorów biochemicznych, analizatorów hematologicznych oraz metod oznaczania białek stosowanych do tej pory w laboratoriach klinicznych.

## Słowa kluczowe

Diagnostyka weterynaryjna, analizatory hematologiczne, białka ostrej fazy, elektroforeza.

## Summary

During recent years veterinary laboratory diagnostics undergoes dynamic evolution. There are many attempts of direct implementation of tests and equipment from human clinical laboratories. Here are discussed possibilities of implementation of automated biochemical analyzers, automated blood cell counters and methods of protein analysis.

## Keywords

Veterinary laboratory diagnostics, cell counters, acute phase proteins, electrophoresis.

W ostatnich 20 latach diagnostyka laboratoryjna, która jest istotnym elementem procesu leczenia, uległa znaczącym zmianom. Wzrastająca ilość badań, rachunek kosztów oraz rozwój technologiczny doprowadziły do szerokiej automatyzacji analiz laboratoryjnych. Towarzyszący rozwojowi różnych dyscyplin medycznych rozwój wiedzy zaowocował wprowadzeniem nowych testów diagnostycznych umożliwiających coraz pełniejszą diagnostykę pacjentów. Rozwój nauki i szeroka dostępność bogatej gamy testów diagnostycznych poprawiły opiekę zdrowotną, której miarą jest wciąż wydłużający się średni czas życia.

Biochemiczne badania laboratoryjne dotyczą jednak nie tylko ludzi. Cały szereg testów biochemicznych

wykonuje się u zwierząt. Badania laboratoryjne wykonywane w weterynarii można podzielić na dwie grupy. Są to mianowicie badania urzędowe, związane z nadzorem nad jakością i zdrowotnością zwierząt w procesie produkcji żywności, i badania diagnostyczne prowadzone w prywatnych ośrodkach weterynaryjnych. Badania wykonywane w pierwszej grupie są ściśle zdefiniowane i nadzorowane przez państwo, a odpowiednie przepisy określają precyzyjnie stosowane procedury. W miarę rozwoju zamożności społeczeństwa rośnie liczba zwierząt domowych trzymanyh przez właścicieli dla przyjemności. Szacuje się, że w Stanach Zjednoczonych hoduje się jako zwierzęta domowe ok. 65 mln psów, 60 mln kotów, 1 mln fretek, papug i wiele innych. Także w Polsce trzymanie zwierząt

domowych jest bardzo popularne. Liczba psów przypadających na jednego mieszkańca należy do najwyższych w Europie. Hodowane przez prywatnych właścicieli zwierzęta potrzebują opieki weterynaryjnej, ta zaś wymaga coraz bardziej zaawansowanego zaplecza diagnostycznego.

Prywatne ośrodki weterynaryjne coraz częściej wyposażone są w bardzo kosztowny sprzęt medyczny, a dla zwierząt tworzone są banki krwi, a nawet ośrodki dializoterapii. Właściciele zwierząt niekiedy decydują się na wdrożenie zaawansowanych i kosztownych procedur leczniczych z zastosowaniem nowoczesnych leków. Lekarze weterynarii skutecznie leczą nowotwory i białaczki. Zaawansowana medycyna weterynaryjna nie miałaby racji bytu, gdyby nie towarzyszyła jej diagnostyka laboratoryjna dysponująca odpowiednim zapleczem.

Istnieje także nurt diagnostyki weterynaryjnej związanej z przemysłem farmaceutycznym, ściśle powiązany z badaniem skuteczności nowych leków lub badaniem procesów chorobowych na modelach zwierzęcych.

Chociaż weterynaryjna diagnostyka laboratoryjna rozwija się bardzo dynamicznie i stanowi coraz większy rynek usług, wprowadzanie nowych technologii następuje w wyniku migracji rozwiązań sprawdzonych w diagnostyce medycznej ludzi. To właśnie szeroko stosowane i przeznaczone dla ludzi rozwiązania i koncepcje diagnostyczne są motorem postępu. Bardzo rzadko stosuje się w odniesieniu do ludzi sprzęt laboratoryjny pierwotnie przeznaczony do użytku w weterynarii; zwykle to rozwiązania sprawdzone w szpitalnych laboratoriach są adaptowane do użytku w ośrodkach weterynaryjnych po wprowadzeniu odpowiednich zmian uwzględniających ich specyfikę.

Warto więc zadać pytanie, w jakim stopniu sprzęt i testy stosowane w medycznej diagnostyce laboratoryjnej można bezpośrednio zaimplementować

w diagnostyce weterynaryjnej. Jakie są możliwości i potencjalne bariery integracji? Czy na przykład psu, który trafił do lecznicy weterynaryjnej, można oznaczyć glukozę, podstawowe parametry morfologii krwi i troponinę T, wykorzystując możliwości medycznego laboratorium diagnostycznego? Czy laboratorium weterynaryjne powinno mieć sprzęt i odczynniki specjalnie przygotowane dla weterynarii, czy też może w jakimś zakresie korzystać z powszechnie dostępnych rozwiązań medycznych? Odpowiadając na te pytania chciałbym przedstawić przykłady trzech grup badań, które dobrze ilustrują możliwości i ograniczenia transferu technologii.

### Podstawowe badania biochemiczne

Istnieje pewna grupa podstawowych badań laboratoryjnych, będących wspólnymi markerami procesów biochemicznych zachodzących w organizmach ssaków (a czasem i innych zwierząt), które bez większych problemów można oznaczać na analizatorach stosowanych w diagnostyce medycznej z wykorzystaniem powszechnie dostępnych zestawów odczynnikowych. W tej grupie znajdują się: glukoza, mocznik, jony sodowe, potasowe, chlorkowe, aktywności enzymów ASPAT, ALAT, LDH.

Stężenie glukozy we krwi psa czy kota może być oznaczane tą samą metodą i na tym samym sprzęcie jak stężenie glukozy u ludzi. W tej grupie badań jedynym ograniczeniem są zakresy wartości referencyjnych, które u różnych zwierząt mogą być różne. Istotne jest, aby analizator biochemiczny miał możliwość pobierania próbek niewielkich objętości, gdyż w przypadku małych zwierząt, których waga wynosi czasem zaledwie kilkadziesiąt gramów, objętość dostępnego materiału jest niewielka (1).

Należy także pamiętać, że niektóre odległe filogenetycznie od człowieka zwierzęta wykształciły własne



szlaki metaboliczne i procesy biochemiczne związane z odwodnieniem lub niedożywieniem. Anatomiczne i biochemiczne różnice pomiędzy ptakami i ssakami wpływają na wartości referencyjne podstawowych parametrów biochemicznych i ich ocenę. U ptaków głównym produktem przemian azotowych jest kwas moczowy, a poziom mocznika i kreatyniny może być niższy niż limity detekcji w testach stosowanych u ludzi. U wielu gatunków ptaków średnie stężenie glukozy wynosi 44 mmol/l, jest więc ośmiokrotnie większe niż u człowieka i wypada w obszarze końca zakresu liniowości niektórych systemów pomiarowych (zwłaszcza tych o uproszczonej konstrukcji).

U ptaków stężenie białka całkowitego jest zwykle dwukrotnie mniejsze niż u człowieka (35 g/l), niższy jest także poziom albuminy 15 – 20 g/l (2). Istotne jest więc, aby w raporcie końcowym umieszczone były właściwe dla gatunku zakresy wartości referencyjnych i znaczniki wartości alarmowych. Zwykle wymaga to odpowiedniego oprogramowania laboratoryjnego systemu informatycznego.

### **Badania podstawowych parametrów hematologicznych**

Wprowadzenie zautomatyzowanych analizatorów hematologicznych było jednym z czynników zmieniających sposób pracy i jakość wyników wytwarzanych w laboratoriach diagnostycznych. Automatyczne analizatory hematologiczne mierzące w krótkim czasie parametry dziesiątek tysięcy komórek krwi spowodowały znaczny wzrost wiarygodności wyników i obniżenie kosztów. Kiedy liczba badań w ośrodkach weterynaryjnych zaczęła wykładniczo rosnąć, pojawiły się pytania, czy stosowane w laboratoriach szpitalnych analizatory hematologiczne można bezpośrednio zastosować w weterynarii – czy możliwa jest adaptacja do użyt-

ku weterynaryjnego sprzętu stosowanego do pomiarów morfologii krwi.

Odpowiedź na to pytanie jest znacznie bardziej skomplikowana niż w przypadku analizatorów biochemicznych. Wynika to z faktu, że szczegółowe rozwiązania techniczne wykorzystywane do zliczania poszczególnych typów krwinek mogą być bardzo zróżnicowane w zależności od producenta aparatu.

Najprostszym pomiarem wykonywanym przez analizatory hematologiczne jest stężenie hemoglobiny. Niemal wszystkie analizatory stosują tę samą zasadę, polegającą na pomiarze absorpcji światła przez trwałą pochodną hemoglobiny: cjanmethemoglobinę w metodzie Drabkina lub utlenowaną pochodną hemoglobiny w metodzie z wykorzystaniem siarczanu dodecyłu – SLS (3). Zgodność wyników uzyskana obiema metodami u różnych gatunków jest zazwyczaj dobra.

Metodyka zliczania erytrocytów i płytek jest znacznie bardziej zróżnicowana. W najczęściej stosowanej metodzie impedancyjnej krwinka, przechodząca przez wąską szczelinę między dwiema elektrycznie połączonymi komorami, powoduje chwilowy wzrost oporu elektrycznego i powstanie impulsu, którego wielkość jest związana z objętością krwinki. Zliczając ilość impulsów oraz uwzględniając ich wielkość odpowiadającą objętości krwinki, analizator hematologiczny wylicza hematokryt, średnią objętość erytrocyta – MCV i (zwykle) drukuje histogramy rozkładu wielkości erytrocytów i płytek. Istnieją też liczniki, które do pomiarów wielkości komórek stosują różnorodne parametry optyczne (intensywność światła rozproszonego pod różnymi kątami, pochłanianie światła).

Możliwości bezpośredniego zastosowania medycznych analizatorów hematologicznych w weterynarii utrudnia duża zmienność gatunkowa wielkości erytrocytów (ryc. 1). Erytrocyty kozy i innych zwierząt, żyjących w środowisku górskim o niskim ciśnieniu parcj-

nym tlenu, są ośmiokrotnie mniejsze od erytrocytów niektórych płetwonogich (np. słoń morski). Tak więc bezpośrednie porównanie wyników upakowanej objętości erytrocytów, wyznaczonej poprzez wirowanie w kapilarze, i hematokrytu wyliczonego na podstawie wielkości impulsów elektrycznych może dawać bardzo różne wyniki dla różnych zwierząt. Stosunek obu wielkości może być bardzo dobry (kot 0,99, pies 0,98, słoń 0,106) lub nie do zaakceptowania (koza 0,68) (4).

Prezentowane w piśmiennictwie opinie są zasadniczo zgodne co do tego, że u zwierząt bezpośredni pomiar parametrów hematologicznych przy użyciu sprzętu stosowanego w medycynie może być obarczony znacznym błędem systematycznym, który zależy od gatunku zwierzęcia i stosowanej metody pomiarowej. Przy pomiarze ilości erytrocytów i płytek wykonywanym metodą impedancyjną także natrafiamy na bariery biologiczne. Jak widać na ryc. 2, histogram rozkładu bardzo małych erytrocytów kozy nakłada się na histogram rozkładu płytek, które u tego zwierzęcia są stosunkowo duże. Tak więc u kozy zliczanie płytek prostą metodą impedancyjną nie jest możliwe. W niektórych analizatorach hematologicznych odpowiednio rozcieńczone erytrocyty kozy służyły nawet jako kalibratory dla płytek. U kotów, których płytki są stosunkowo duże i łatwo agregują, a średnia objętość erytrocytów wynosi ok. 48 fl, niektóre analizatory oznaczały 89% wszystkich wyników pomiarów płytek jako wykraczające poza zakres referencyjny.

Metodyka zliczania krwinek białych jest jeszcze bardziej zróżnicowana. Obok kanału elektrycznego do różnicowania krwinek białych stosuje się różne kombinacje kanałów optycznych, mierzących kształt i wielkość jądra. Do różnicowania krwinek białych stosuje się metody cytochemiczne przy użyciu specyficznych barwników wykazujących fluorescencję lub powstających w wyniku reakcji katalizowanych przez peroksydazy (5, 6, 7, 8, 9, 10). Część analizatorów posiada

wewnętrzne procedury kontrolne i zgłasza błąd np. wtedy, gdy wyniki pomiarów z elektrycznego kanału impedancyjnego są różne od wyników uzyskanych z kanału optycznego. Niektóre analizatory sygnalizują nieprawidłowości w 30–80% próbek zwierzęcych w zależności od mierzonego parametru. Z prac porównawczych wynika jednak, że wyniki pomiaru ilości krwinek białych oraz ocena ich subpopulacji były zwykle zgodne (11).

Dokładny i precyzyjny pomiar wszystkich parametrów elementów komórkowych krwi w weterynarii stanowi prawdziwe wyzwanie. Przyczyną trudności jest duża gatunkowa zmienność biologiczna krwinek, brak szybkich metod referencyjnych oraz brak odpowiednich materiałów kontrolnych (12). Mimo to automatyczne analizatory hematologiczne są coraz szerzej stosowane w weterynarii. Istnieją doniesienia o ich zastosowaniach do badania krwi ptaków, mimo że ptasie erytrocyty posiadają jądra, a obok limfocytów główną populację krwinek białych stanowią heterofile, odpowiedniki ludzkich granulocytów (13).

Wobec rosnącego zapotrzebowania na automatyczne analizatory hematologiczne większość dużych firm produkujących je oferuje również sprzęt przeznaczony dla weterynarii. Podstawy konstrukcyjne analizatorów weterynaryjnych są takie same jak stosowanych w medycynie. Często jedynym elementem przystosowującym analizator do celów weterynaryjnych jest dodatkowy moduł oprogramowania.

Typowym przedstawicielem analizatorów stosowanych w weterynarii jest ABX MICROS ESV60. Jest to aparat, w którym erytrocyty i płytki oraz leukocyty zliczane są w dwóch różnych kanałach impedancyjnych (średnica szczeliny odpowiednio 50 i 80  $\mu\text{m}$ ). Użyty w kanale krwinek białych odczynnik lizujący zachowuje się różnie w stosunku do poszczególnych rodzajów krwinek. Reagując z limfocytami niszczy błonę, pozostawiając same jądra. Reakcja z monocytami polega na opróż-

nieniu komórek z cytoplazmy. Pod koniec lizy uzyskane komórki monocytów mają wielkość pośrednią pomiędzy limfocytami i granulocytami. Wchodząc w reakcję z granulocytami odczynnik lizujący ma działanie ograniczone z powodu specyficznej budowy błony, która chroni je przed obkurczającym działaniem odczynnika. To z kolei powoduje, że podczas rozróżniania komórek granulocyty są największą subpopulacją krwinek białych. Aparat ma wstępnie ustawione parametry dla pięciu gatunków zwierząt (psa, kota, konia, królika i szczura). Dodatkowo oprogramowanie aparatu umożliwia ustawienie niskiego i wysokiego limitu dla wszystkich parametrów krwinkowych dla 35 gatunków zwierząt. Obsługa analizatora hematologicznego przystosowanego do próbek weterynaryjnych jest bardzo uproszczona i polega w pierwszym etapie na wyborze gatunku zwierzęcia. Wstępnie skonfigurowane parametry oprogramowania powodują poprawne ustawienia znaczników i wydruk wyników (wraz z histogramami rozkładu) w zestawieniu z odpowiednimi zakresami wartości prawidłowych. Trzeba jednak pamiętać, że konfiguracja parametrów analizatora nie znosi biologicznych ograniczeń, charakterystycznych dla poszczególnych gatunków, związanych np. z nakładaniem się wielkości erytrocytów i płytek u kotów.

### **Analiza białek**

Analiza składu białek osocza może być źródłem cennych informacji diagnostycznych, a stężenia białka całkowitego i albuminy to jedne z najstarszych analiz wykonywanych w chemii klinicznej. Oznaczanie wybranych parametrów białkowych może być użyteczne w diagnozowaniu ostrych i przewlekłych stanów zapalnych, upośledzeniu funkcji nerek lub wątroby czy wykrywaniu stanów wyniszczenia lub niedożywienia. Podobnie jak poprzednio można więc postawić pytanie, czy istnieje bezpośrednia możliwość przeniesienia

do użytku weterynaryjnego metod i algorytmów diagnostycznych używanych dla ludzi.

#### Białko całkowite

Stężenie białka całkowitego w surowicy oznaczane jest najczęściej metodą biuretową. Metoda biureto-wa (dająca produkt barwny z wiązaniami amidowymi) świetnie nadaje się do oznaczania białka u różnych gatunków, gdyż ilość wiązań peptydowych przypadających na jednostkę masy białka jest dla większości białek bardzo zbliżona.

#### Albumina

Albumina w surowicy oznaczana jest na większości automatycznych analizatorów biochemicznych z wykorzystaniem zmiany barwy zieleni bromokrezolowej (BCG) po połączeniu z albuminą. Niestety powinowactwo barwnika do albumin różnych gatunków zwierząt jest bardzo zróżnicowane. Istnieją liczne doniesienia o znacznych błędach dokładności oznaczania albuminy u różnych gatunków zwierząt, gdy do kalibracji metody użyto ludzkiej albuminy (kalibratory wykorzystujące albuminy poszczególnych gatunków są zwykle niedostępne). Problem ten jest o tyle istotny, że reakcja z BCG jest podstawą wykrywania białka w popularnych wieloparametrowych testach paskowych do moczu. Testy paskowe mogą mieć znacznie ograniczoną czułość w stosunku do albuminy wielu gatunków zwierząt.

#### Metody immunochemiczne

Zaawansowana diagnostyka zaburzeń białkowych wymaga ilościowego oznaczania specyficznych białek. W piśmiennictwie naukowym często można spotkać informacje o oznaczaniu białek u zwierząt metodami immunochemicznymi przeznaczonymi dla ludzi. Mimo że poprawność tej metody budzi zastrzeżenia, podjęto próby weryfikacji takiego postępowania. Po-

**Tabela I.** Zestawienie istotnych diagnostycznie białek ostrej fazy oraz białek, które nie są użyteczne w wykrywaniu ostrego stanu zapalnego u różnych gatunków.

GATUNEK	DIAGNOSTYCZNIE ISTOTNE BOF	DIAGNOSTYCZNE NIEISTOTNE BOF
Człowiek	CRP, SAA	alfa-2-makroglobulina
Pies	CRP, SAA	-
Kot	SAA, Hp, AAG	CRP
Szczur	AAG, alfa-2-makroglobulina	SAA
Świnia	MAPP, Hp	AAG
Krowa	Hp, SAA	CRP
Mysz	Haptoglobina,	CRP

(CRP – białko c-reaktywne, SAA – białko amyloidowe A, Hp – haptoglobina, AAG – kwaśny alfa-1-glikoproteid, MAPP – major acute phase protein).

równano wyniki oznaczania troponin u różnych zwierząt na dziewięciu dużych powszechnie używanych platformach analitycznych przeznaczonych dla ludzi z wynikami uzyskanymi metodami immunochemicznymi specyficznymi dla określonego gatunku. Porównanie wykazało, że nie można z góry przewidzieć efektów takiego postępowania.

Uzyskane wyniki były bardzo zróżnicowane i zależały zarówno od zastosowanego systemu analitycznego, jak i gatunku zwierzęcia. Trzeba jednak podkreślić, że obok wyników zupełnie niezadowolających w wielu przypadkach otrzymano bardzo dobre rezultaty świadczące o tym, że w wybranych systemach analitycznych przeznaczonych dla ludzi można metodami immunochemicznymi oznaczać wybrane białka określonych zwierząt (14). Obok zastosowania metod immunochemicznych niektóre białka można oznaczać wykorzystując ich specyficzne właściwości. Przy oznaczaniu haptoglobiny można wykorzystać własności peroksydazowe kompleksu hemoglobina-haptoglobina, przy oznaczaniu alfa-1-antytrypsyny wykorzystuje się jej właściwości do hamowania enzymatycznej aktywności proteaz, zaś fibrynogen można oznaczyć po jego wcześniejszym wykrzepieniu.

#### Metody elektroforetyczne

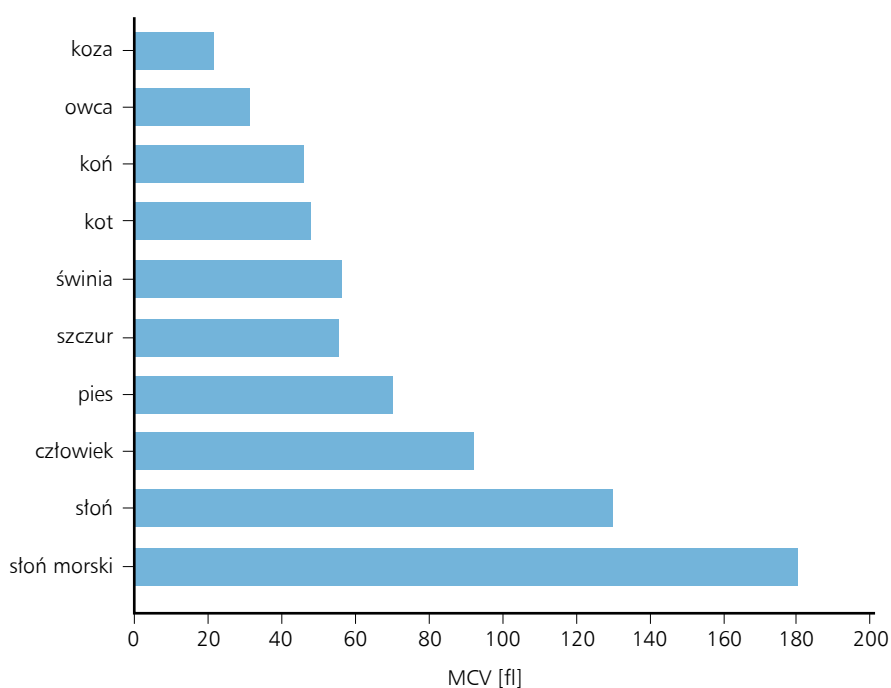
Do analizy zaburzeń białkowych w weterynarii wydaje się szczególnie nadawać zastosowanie metod elektroforetycznych (15). Istnieją liczne doniesienia o możliwości diagnostyki stanów zapalnych u psów, kotów, koni, świń, ptaków, gadów, a nawet ryb (16, 17, 18, 19, 20, 21). Rozdziały elektroforetyczne zwierząt są dość podobne do ludzkich. U niektórych gatunków można zaobserwować zmniejszoną ruchliwość elektroforetyczną albuminy. Zwykle analiza proteinogramu pozwala na wykrycie stanów zapalnych, zaburzenia funkcji nerek lub wątroby. Podobnie jak u ludzi elektroforeza białek moczu może być przydatna w ocenie funkcji nerki w przebiegu cukrzycy (22, 23). Zaletą metod elektroforetycznych jest to, że nie wymagają one żadnych zmian sprzętowych.

Zdaniem autora szczególne nadzieje budzi elektroforeza kapilarna (CE) (24). Umożliwia ona szybki rozdział nawet pojedynczych próbek, a oznaczanie albuminy na podstawie rozdziałów CE jest metodą referencyjną obok metody immunochemicznej. Szczególne nadzieje budzi technika wysokorozdzielczej elektroforezy kapilarnej (Sebia), w której udało się rozdzielić frakcję alfa-1-globulin na dwa główne składniki: kwaśny

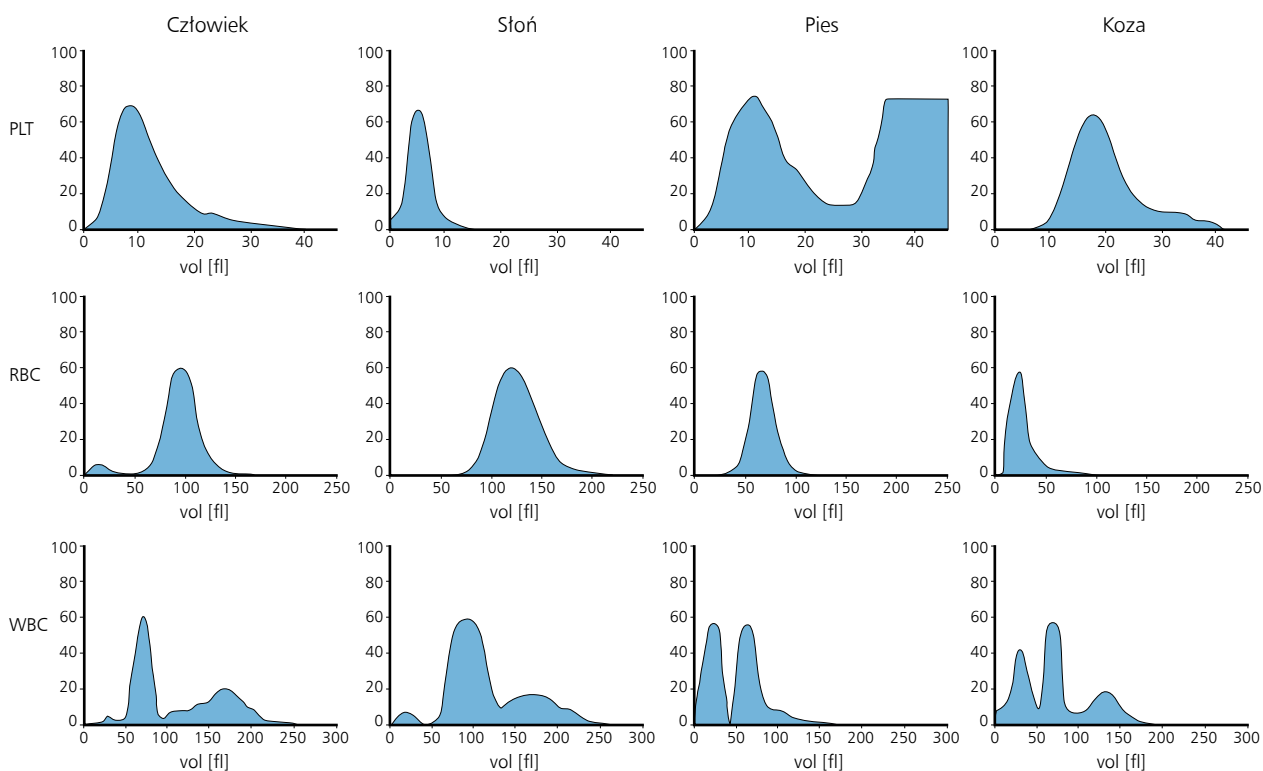
alfa-1-glikoproteid i alfa-1-antytrypsynę. Frakcja alfa-2 rozdzielana jest na alfa-2-makroglobulinę i haptoglobinę, a frakcja beta-1 i beta-2 odpowiadają odpowiednio transferynie i białkom układu dopełniacza (ryc. 3). Trzeba jednak pamiętać, że diagnostyka stanów zapalnych u zwierząt wymaga wiedzy dotyczącej dynamiki wzrostu białek ostrej fazy u poszczególnych gatunków i białko C reaktywne, choć występuje we krwi niemal wszystkich zwierząt, nie zawsze jest najlepszym markerem stanu zapalnego (tab. 1). U wielu zwierząt wyraźne wzrosty obserwujemy dla głównych białek osocza, co ułatwia interpretację wyników elektroforetycznych rozdziałów białek (25).

Podsumowując: w ostatnich latach jesteśmy świadkami bardzo dynamicznego rozwoju weterynaryjnej diagnostyki laboratoryjnej. Wiele rozwiązań sprzętowych, technologii i koncepcji diagnostycznych może być bezpośrednio lub z niewielkimi modyfikacjami

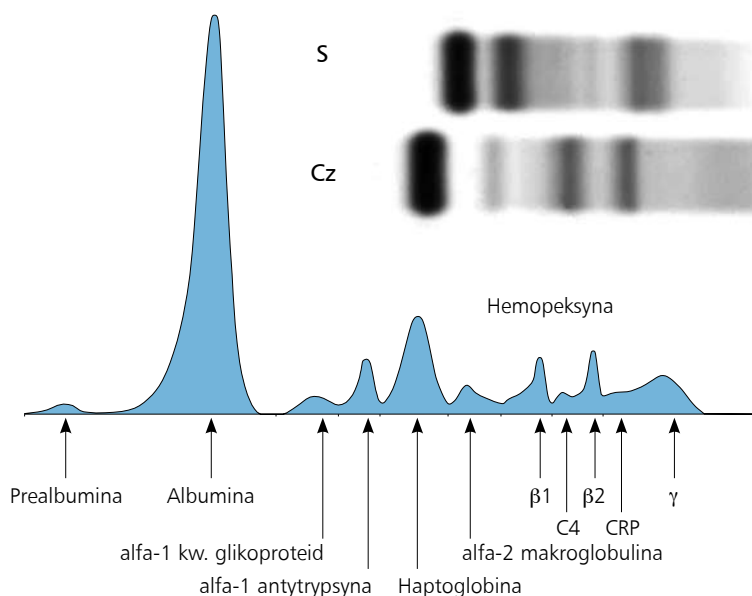
przeniesionych z obszaru diagnostyki ludzi. Jak się wydaje, w chwili obecnej czynnikiem ograniczającym rozwój tej dziedziny wiedzy jest brak informacji o odrębnościach gatunkowych poszczególnych zwierząt. W Polsce, gdzie diagnostyka laboratoryjna jest wyodrębniona jako osobny przedmiot studiów, zbyt mało uwagi poświęca się diagnostyce weterynaryjnej. Diagnostyci laboratoryjni dobrze zaznajomieni z procedurami analitycznymi, znający obsługę sprzętu i algorytmy diagnostyczne stosowane w wykrywaniu różnorodnych patologii, mogliby być cennymi partnerami dla lekarzy weterynarii. Rynek usług weterynaryjnych dynamicznie się rozwija, reagują na to producenci sprzętu medycznego. Autor niniejszego tekstu chciałby zaapelować do wszystkich zainteresowanych diagnostyką laboratoryjną o zwrócenie uwagi na pasjonujące podobieństwa i różnice procesów biochemicznych zachodzących u naszych braci mniejszych.



**Ryc. 1.** Zmienność gatunkowa wielkości erytrocytów. Objętość krwinek słonia morskiego jest ośmiokrotnie większa niż objętość krwinek kozy.



**Ryc. 2.** Histogramy rozkładu płytek – PLT, erytrocytów – RBC oraz krwinek białych – WBC uzyskane w liczniku przeznaczonym dla ludzi. Zwraca uwagę znaczne przesunięcie histogramu RBC dla kozy i słonia związane ze znacznymi różnicami gatunkowymi wymiarów erytrocytów. U kozy histogram rozkładu płytek pokrywa się z histogramem rozkładu erytrocytów, nie jest więc możliwy pomiar ilości płytek. W histogramach rozkładu leukocytów psa i kozy po lewej stronie widoczne są erytrocyty, które nie do końca uległy hemolizie.



**Ryc. 3.** Rozdział białek surowicy otrzymany w systemie wysokorozdzielczej elektroforezy kapilarnej Capillarsy HR – Sebia (mat. informacyjne Sebia). W prawym górnym rogu porównanie elektroforetycznych rozdzielów białek surowicy człowieka (Cz) i szczura (S). Widoczna wyraźnie mniejsza ruchliwość elektroforetyczna albuminy szczura oraz wyraźnie słabsza frakcja alfa-2 globulin.

## Piśmiennictwo:

1. Waldoch J., Wack R., Christopher M.: Avian plasma chemistry analysis using diluted samples. *J. Zoo Wild Med.* 2009; 40(4): 667–74.
2. Harr K.E.: Clinical chemistry of companion avian species: a review. *Vet. Clin. Pathol.* 2002; 31(3): 140–51.
3. Evans G.O. and Smith D.E.C.: Preliminary Studies with an SLS Method for Haemoglobin Determination in Three Species. *Comparative Haematology International* 1992; 2: 101–102.
4. Shiraishi J., Matsumoto H., Hirayama H.: Experimental Blood Cell Counting on Several Kinds of Animals with an Automated Hematology Analyzer. *Sysmex Journal International* 2007; Vol. 17, Suppl. II, No. I–7.
5. Gelain M.E., Rossi G., Giori L. et al.: Identification of neoplastic cells in blood using the Sysmex XT-2000iV: a preliminary step in the diagnosis of canine leukemia. *Vet. Clin. Pathol.* 2010; 39(2): 169–179.
6. Fernandes P.J., Modiano J.F., Wojcieszyn J. et al.: Use of the Cell-Dyn 3500 to predict leukaemic cell lineage in peripheral blood of dogs and cats. *Vet. Clin. Pathol.* 2002; 31: 167–182.
7. Moritz A., Fickenscher Y., Meyer K. et al.: Canine and feline hematology reference values for the ADVIA 120 hematology system. *Vet. Clin. Pathol.* 2004; 33: 32–38.
8. Lilliehook I., Tvedten H.: Validation of the Sysmex XT-2000iV hematology system for dogs, cats, and horses. I. Erythrocytes, platelets, and total leukocyte counts. *Vet. Clin. Pathol.* 2009; 38: 163–174.
9. Lilliehook I., Tvedten H.: Validation of the Sysmex XT-2000iV hematology system for dogs, cats, and horses. II. Differential leukocyte counts. *Vet. Clin. Pathol.* 2009; 38: 175–182.
10. Mathers R.A., Evans G.O., Bleby J., Tornow T.: Evaluation of the Sysmex XT- 2000iV haematology analyser for rat, dog and mouse whole blood samples. *Comp. Clin. Path.* 2008; 17: 137–144.
11. Becker M., Moritz A., Giger U.: Comparative clinical study of canine and feline total blood cell count results with seven in-clinic and two commercial laboratory hematology analyzers. *Vet. Clin. Pathol.* 2008; 37(4): 373–384.
12. George J.W., Snipes J., Lane V.M.: Comparison of bovine hematology reference intervals from 1957 to 2006. *Vet. Clin. Pathol.* 2010 Jan 7.
13. Post, J., Rebel J.M, ter Huurne A.A.: Automated Blood Cell Count: A Sensitive and Reliable Method to Study Corticosterone-Related Stress in Broilers. *2003 Poultry Science* 82: 591–595.
14. Apple F.S., Murakami M.M., Ler R. et al.: HESI Technical Committee of Biomarkers Working Group on Cardiac Troponins. Analytical characteristics of commercial cardiac troponin I and T immunoassays in serum from rats, dogs, and monkeys with induced acute myocardial injury. *Clin. Chem.* 2008; 54(12): 1982–9. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1998; 213(6): 822–5.
15. Miller I., Wait R., Sipos W., Gemeiner M.: A proteomic reference map for pig serum proteins as a prerequisite for diagnostic applications. *Res. Vet. Sci.* 2009; 86(2): 362–7.
16. Abbott J.B., Mellor D.J., Love S.: Assessment of serum protein electrophoresis for monitoring therapy of naturally acquired equine cyathostomin infections. *Vet. Parasitol.* 2007; 147(1-2): 110–7.
17. Zvorc Z., Matijatko V., Beer B. et al.: Blood serum proteinograms in pregnant and non-pregnant cows. *Veterinarski Arhiv* 2000; 70 (1): 21–30.
18. Giménez M., Saco Y., Pato R. et al.: Plasma protein electrophoresis of *Trachemys scripta* and *Iguana iguana*. *Vet. Clin. Pathol.* 2010 Jan 4.
19. Miller I., Wait R., Sipos W., Gemeiner M.: A proteomic reference map for pig serum proteins as a prerequisite for diagnostic applications. *Res. Vet. Sci.* 2009; 86(2): 362–7.
20. Lampreave F., González-Ramón N., Martínez-Ayensa S. et al.: Characterization of the acute phase serum protein response in pigs. *Electrophoresis* 1994; 15(5): 672–6.
21. Manera M., Britti D.: Assessment of serum protein fractions in rainbow trout using automated electrophoresis and densitometry. *Vet. Clin. Pathol.* 2008; 37(4): 452–6.
22. Struble A.L., Feldman E.C., Nelson R.W., Kass P.H.: Systemic hypertension and proteinuria in dogs with diabetes mellitus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1998; 213(6): 822–825.
23. Scarpa P., Di Fabio V., Ramirez C., et al.: Proteinuria, GGT index and fractional clearance of electrolytes in exercising athletic horses. *Vet. Res. Commun.* 2007; 31 Suppl. 1: 339–42.
24. Crivellente F., Bonato M., Cristofori P.: Analysis of mouse, rat, dog, marmoset, and human serum proteins by capillary electrophoresis: comparison with agarose gel electrophoresis. *Vet. Clin. Pathol.* 2008; 37(1): 73–8.
25. Ceron J.J., Eckersall P.D., Martíñez-Subiela S.: Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet. Clin. Pathol.* 2005; 34(2): 85–99.

**dr hab. n.med. Ryszard Drożdż**

*Zakład Diagnostyki Medycznej  
Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum  
Kraków*

# PRZYDATNOŚĆ DIAGNOSTYCZNA I METODY OZNACZANIA TRANSFERYNY UBOGOWĘGLOWODANOWEJ (CDT)

THE DIAGNOSTIC USEFULNESS AND METHODS OF CARBOHYDRATE-DEFICIENT TRANSFERRIN (CDT) DETERMINATION

Bogdan Cylwik, Lech Chrostek, Maciej Szmikowski

## Streszczenie

W pracy podano definicję, przydatność diagnostyczną i metody oznaczania transferyny ubogowęglowodanowej CDT (carbohydrate-deficient transferrin). CDT jest transferyną ze zmniejszoną liczbą reszt kwasu sjałowego i jest sumą trzech izoform: asjało-Tf, monosjało-Tf i disjało-transferyny. Jest czułym wskaźnikiem przewlekłej konsumpcji alkoholu. Badanie znalazło zastosowanie w narodowych programach leczenia alkoholizmu, medycynie pracy, ubezpieczeniowej i sądowej. Do oznaczania CDT stosowane są metody chromatograficzne, elektroforetyczne, immunometryczne i spektrometria masowa. Metodą referencyjną jest ogniskowanie izoelektryczne (IEF).

## Słowa kluczowe

CDT, transferyna ubogowęglowodanowa, spożycie alkoholu.

## Summary

The definition, diagnostic usefulness and methods for the determination of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) were given in the paper. CDT is a transferrin with a reduced number of sialic acid residues and is a sum of three isoforms: asialo-Tf, monosialo-Tf and disialo-transferrin. It is a sensitive indicator of chronic alcohol consumption. Measurement of CDT is also widely used in national alcohol abuse treatment programs, occupational medicine, life insurance medicine and forensic medicine. The chromatographic, electrophoretic, immunometric and mass spectrometric methods are used for determination of CDT. The reference method is isoelectric focusing (IEF).

## Keywords

CDT, carbohydrate-deficient transferrin, alcohol consumption.

Transferyna ubogowęglowodanowa CDT (carbohydrate-deficient transferrin) jest transferyną ze zmniejszoną liczbą reszt kwasu sjałowego i w obecnej swojej definicji jest sumą trzech izoform: asjało-Tf, monosjało-Tf i disjało-transferyny (ryc.1) (1–3). Transferyna jest glikoproteiną zbudowaną z trzech podjednostek strukturalnych: łańcucha polipeptydowego (679 aminokwasów) i dwóch łańcuchów oligosacharydowych (ryc.1) (4). Każda z tych podjednostek cechuje się zmiennością budowy (mikroheterogenność), co jest powodem istnienia wielu izoform (5). Łańcuchy oligosacharydowe są utworzone przez węglowodany: mannozę, N-acetyloglucozaminę, galaktozę i kwas

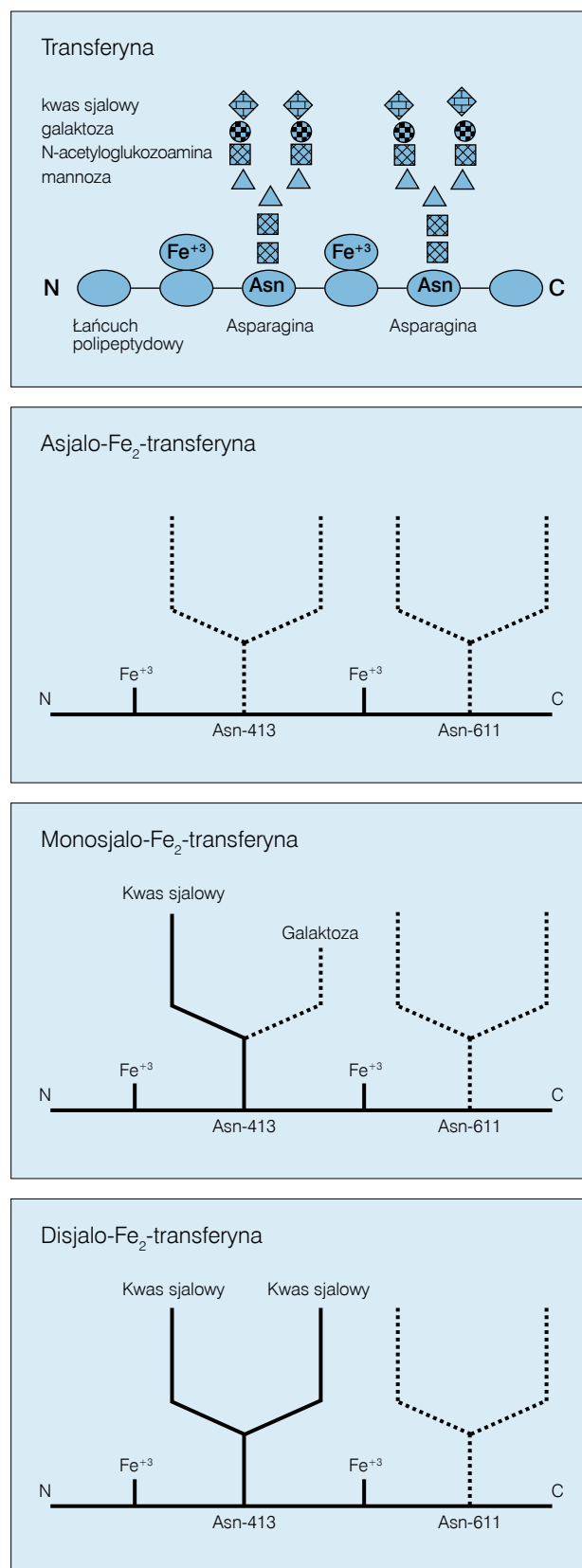
sjałowy. W zależności od liczby przyłączonych reszt tego kwasu występuje dziewięć izoform transferyny (tabela I) (4, 6). U osób zdrowych rasy kaukaskiej dominuje tetrasjało-Tf – fenotyp C (64–80%) (7, 8). Przewlekła konsumpcja alkoholu przesuwaa polimorfizm transferyny w kierunku izoform ze zmniejszoną ilością kwasu sjałowego (1, 6).

CDT jest uznanym wskaźnikiem przewlekłej konsumpcji alkoholu i badaniem szeroko stosowanym w diagnostyce laboratoryjnej alkoholizmu w Europie Zachodniej i USA (1, 9, 10). Czułość i swoistość diagnostyczna testu są wysokie, ale znajdują się w dosyć szerokim przedziale wartości: 33–96% i 46–100% (11). CDT należy



do grupy tzw. markerów długoterminowych (czas detekcji we krwi powyżej tygodnia). Wzrost stężenia CDT w surowicy obserwuje się zwykle po spożyciu 60–80 g etanolu dziennie przez okres co najmniej 1 tygodnia, a powrót do wartości prawidłowych następuje po około dwóch tygodniach od zaprzestania picia (1). Wartości prawidłowe CDT różnią się w zależności od rodzaju metody; podano je w tabeli II. Stężenie CDT można wyrażać w jednostkach bezwzględnych (mg/l, U/l) lub względnych (% CDT, CDT/transferyna całkowita) (12). Do czynników interferujących w oznaczeniach stężenia CDT w surowicy należą m.in. czynniki genetyczne, rasa i współistniejące choroby (13, 14). Niejednorodny wpływ ma wiek, zasoby żelaza, palenie tytoniu, BMI (body mass index), przebyte operacje i zawartość wody w organizmie – tzw. woda całkowita (TBW – total body water). Wpływ innych czynników, takich jak płeć, leki, masa ciała, choroby, jest słabo udokumentowany. W grupie czynników genetycznych istotne znaczenie mają warianty genetyczne transferyny i wrodzone zaburzenia glikozylacji CDG (congenital disorders of glycosylation). Wyniki fałszywie dodatnie mogą występować u osobników heterozygotycznych posiadających 2 różne allele BC, CD i C2C3, pomimo iż osoby te spożywają niewielkie ilości alkoholu (1, 9, 15). Stężenia CDT we wrodzonych zaburzeniach glikozylacji białek są wielokrotnie wyższe niż u nadużywających alkoholu (13).

Częstość występowania odmian genetycznych białka jest związana z rasą człowieka. I tak u przedstawicieli rasy kaukaskiej częstość ta wynosi niecałe 1%, ale już w populacji Afroamerykanów, rdzennej ludności Afryki, Ameryki Południowej i Australii sięga 10, a nawet 30% (16, 17). Metaanaliza wykazała, iż disjalo-transferyna (główna frakcja CDT) nie jest podatna na wpływy etniczne, wiek, płeć, BMI i palenie tytoniu (14). Wzrost stężenia CDT jest związany z ciężkim uszkodzeniem wątroby i występuje u około 40% pacjentów, będących



Ryc. 1. Schemat struktury transferyny i CDT.

**Tabela I.** Izoformy transferyny we krwi (6).

IZOFORMA	LICZBA RESZT KWASU SJALOWEGO	PUNKT IZOELEKTRYCZNY (PI)	ZAWARTOŚĆ WE KRWI (%)
Oktasjalo-Tf	8	Brak danych	< 0,5
Heptasjalo-Tf	7	5,1	< 1,5
Heksasjalo-Tf	6	5,2	1–3
Pentasjalo-Tf	5	5,3	12–18
Tetrasjalo-Tf	4	5,4	64–80
Trisjalo-Tf	3	5,6	4,5–9,0
Disjalo-Tf	2	5,7	< 2,5
Monosjalo-Tf	1	5,8	< 0,9
Asjalo-Tf	0	5,9	< 0,5

zwykle w zaawansowanym stadium choroby (18, 19). Zatem test ten nie może być stosowany jako wskaźnik nadmiernej konsumpcji alkoholu u chorych z ciężkimi schorzeniami wątroby.

Metody oznaczania CDT dzielą się na pośrednie i bezpośrednie. Rutynowe pomiary pośrednie zawsze są poprzedzone izolacją izoform CDT od nie-CDT i innych białek surowicy. Do izolacji stosuje się techniki chromatograficzne lub elektroforetyczne, gdzie podstawą rozdziału jest wielkość ładunku elektrycznego i wartość punktów izoelektrycznych (pI), które są zależne od liczby reszt kwasu sjalowego. Wartość pI zmienia się także wraz z zawartością żelaza w cząsteczce transferyny i aby usunąć te różnice, należy wysycić nim wszystkie izoformy transferyny (9). Następnie dokonuje się pomiarów ilościowych, stosując techniki m.in. radioimmunologiczne (RIA – radioimmunoassay), immunoenzymatyczne (EIA – enzyme immunoassay) lub turbidymetryczne (TIA – turbidimetric immunoassay). Dopiero w 2005 r. pojawiła się pierwsza metoda bezpośrednia oznaczania CDT z użyciem swoistych przeciwciał (20). Tabela II przedstawia metody oznaczania CDT, ich swoistość analityczną i wartości prawidłowe lub punkty odcięcia dla przewlekłego nadużywania alkoholu.

Metody elektroforetyczne to ogniskowanie izoelektryczne (IEF – isoelectric focusing), elektroforeza kapilarna

(CE – capillary electrophoresis), strefowa elektroforeza kapilarna (CZE – capillary zone electrophoresis) (21, 22), a także elektroforeza powinowactwa z użyciem lektyn (LAE – lectin affinity electrophoresis) (23). Cechują się one dużą rozdzielczością i wysoką czułością. Metodą referencyjną jest ogniskowanie izoelektryczne IEF, które pozwala na rozdział wszystkich izoform CDT, w tym także wariantów genetycznych (21, 22, 24). Technika IEF jest rekomendowana do walidacji innych metod i nowo wprowadzanych komercyjnych testów oznaczania CDT (24) oraz weryfikacji wyników nieoczekiwanych i wątpliwych (25). IEF nie jest stosowana w celach rutynowych ze względu na skomplikowaną metodykę, czasochłonność i pracochłonność. Zaletą elektroforezy kapilarnej CE jest szybki rozdział CDT (także odmian genetycznych), mała objętość próbki oraz możliwość automatyzacji. Niektórzy autorzy proponują CZE jako metodę referencyjną oznaczania CDT (26).

Do technik chromatograficznych zalicza się chromatografię jonowymienną (IEC – ion-exchange chromatography), HPLC i chromatografię powinowactwa (AC – affinity chromatography) (27, 28). Chromatografia jonowymienna jest zwykle stosowana w testach komercyjnych, gdzie po wstępnej separacji izoform stężenie względne CDT może być oznaczane metodą immunoturbidymetryczną. IEC nie wykrywa odmian

Tabela II. Charakterystyka metod oznaczania CDT.

METODA	WARTOŚCI PRAWIDŁOWE/PUNKTY ODCIĘCIA		SWOISTOŚĆ ANALITYCZNA	LIT.
	KOBIETY	MĘŻCZYJNI		
Chromatografia jonowymienna z RIA (CDTect-RIA; Pharmacia; zmodyfikowana metoda Stiblera)	26–28 U/L	18–20 U/L	Asialo-, mono- i disialo-Tf	(1, 30)
Chromatografia jonowymienna z EIA (CDTect-EIA; Pharmacia)	26–28 U/L	18–20 U/L	Asialo-, mono- i disialo-Tf	(1, 30)
CDTect/Tf	1,3%/ 1,0%	1,3%/ 0,6%	Asialo-, mono- i disialo-Tf	(23, 31)
Chromatografia jonowymienna z RIA (%CDT; Axis)	2,5%	2,5%	Asialo-, mono- i disialo-Tf	Instr. techn.
Chromatografia jonowymienna z TIA (%CDT-TIA lub %CDTri-TIA; Axis)	5–6%	5–6%	Asialo-, mono-, disialo i 50% trisialo-Tf	Instr. techn.
Chromatografia jonowymienna z TIA (Tina-quant %CDT/transferrin; Roche)	6%	6%	Asialo-, mono-, disialo i 50% trisialo-Tf	Instr. techn.
Chromatografia jonowymienna z TIA (Tina-quant %CDT2nd/transferrin; Roche)	2,6%	2,6%	Asialo-, mono-, disialo-Tf	Instr. techn.
Chromatografia jonowymienna z TIA (ChronAlcol.D; Sangui)	2,5–2,7% 100–110 mg/L	2,5–2,7% 100–110 mg/L	Asialo-, mono- i disialo-Tf	(32) (32)
Chromatografia powinowactwa z lektyną	1,4%	1,4%	CDT-Allo A	(34)
Chromatografia powinowactwa z lektyną	1,3%	1,3%	CDT-TIA	(34)
Elektroforeza kapilarna (CAPILLARYS™CDT; Sebia)	1,3%	1,3%	Asialo- i disialo-Tf	(33)
Strefowa elektroforeza kapilarna	4,5%	4,5%	Asialo-, mono-, disialo i trisialo-Tf	(35)
Strefowa elektroforeza kapilarna (CEofix™CDT; Analis)	1,25%	1,25%	Asialo- i disialo-Tf	(36)
HPLC	80 mg/L	80 mg/L	Asialo-, mono- i disialo-Tf	(37)
HPLC (Clin-Rep-CDT; Recipe)	1,75–2,5%	1,75–2,5%	Asialo- i disialo-Tf	Instr. techn.
Ogniskowanie izoelektryczne z immunoblottingiem i densytometrią	4 DU	4 DU	Asialo-, mono- i disialo-Tf	(15)
Ogniskowanie izoelektryczne z immunofiksacją	4,4%	4,4%	Asialo-, mono- i disialo-Tf	(28)
Ogniskowanie izoelektryczne z immunofiksacją	5%	5%	Disialo-Tf	(21)
Metoda immunonefelometryczna (N Latex CDT; Dade Behring)	1,19–2,47%	1,19–2,47%	Asialo-, mono- i disialo-Tf	Instr. techn.

genetycznych transferyny. W ostatnich latach pojawiły się testy komercyjne do oznaczania CDT z rozdzieleniem izoform techniką HPLC: Clin-Rep-CDT-HPLC (Recipe, Niemcy) i Bio-Rad %CDT-HPLC (Bio-Rad, Niemcy) (29). Pozwalają one na eliminację wyników fałszywych (dodatnich i ujemnych). W porównaniu z ogniskowaniem izoelektrycznym metody chromatograficzne potrzebują na ogół większej objętości materiału (100–500  $\mu$ l), są mniej czułe i wybiórcze, poza tym czasochłonne, pracochłonne i wymagają specjalnej aparatury. Metody immunometryczne stosowane są zwykle

w testach komercyjnych. Pierwszy taki zestaw do rutynowego oznaczania CDT pojawił się w 1993 r. był to CDTect-RIA (Pharmacia & Upjohn, Szwecja), a w latach następnych kolejne: %CDT (Axis, Norwegia), CDTect-EIA (Pharmacia & Upjohn, Szwecja), %CDT-TIA (Axis-Shield, Norwegia), %CDTri-TIA (Bio-Rad, USA), Tinaquant-%CDT/transferrin (Roche, Niemcy), ChronAlcol.D (Sangui, USA), Clin-Rep-CDT-HPLC (Recipe, Niemcy) i Bio-Rad %CDT-HPLC (Bio-Rad, Niemcy) (tabela II). W testach tych w pierwszym etapie przeprowadza się frakcjonowanie białka (oddzielenie form CDT od nie-CDT)

na mikrokolumnach głównie metodą chromatografii jonowymiennej, a dopiero później w uzyskanym eluacie dokonuje się immunometrycznego pomiaru izoform CDT technikami immunologicznymi, takimi jak RIA, EIA, TIA. Metodą rozdziału w testach Clin-Rep-CDT i Bio-Rad %CDT jest natomiast HPLC. Przed nałożeniem materiału na kolumnę przeprowadza się wysycenie transferyny żelazem celem usunięcia form Fe<sup>1+</sup>- i Fe<sup>0</sup>-Tf.

Testy komercyjne pozwalają na oznaczenie trzech izoform CDT (asialo-, monosialo- i disialo-Tf) lub czterech (asialo-, monosialo-, disialo- i trisialo-Tf). W 2005 r. pojawiła się nowa metoda immunometryczna (immunonefelometryczna) oparta na bezpośrednim pomiarze CDT w surowicy (N Latex CDT, Dade Behring, USA) (20). Była to pierwsza metoda, która nie wymagała wstępnej ekstrakcji białka, a bezpośredni pomiar CDT

(asialo-, monosialo- i disialo-Tf) był możliwy dzięki użyciu swoistych przeciwciał skierowanych przeciwko epitopom transferyny, pozbawionym jednego lub dwóch łańcuchów węglowodanowych. Metoda nie wykazuje interferencji ze strony wariantów genetycznych transferyny (izoformy B i D). Zaletą testów komercyjnych jest możliwość wykorzystania ich w rutynowym laboratorium, łatwość wykonania oznaczeń oraz automatyzacja badań, co skraca czas oczekiwania na wynik i obniża koszty badania.

Badanie CDT jak dotychczas nie jest rozpowszechnione w Polsce. Znalazło jednak zastosowanie w wielu narodowych programach leczenia alkoholizmu (kontrola abstynencji, nawroty picia) (30), medycynie pracy (kontrola trzeźwości pracowników, kierowców, osób pracujących na odpowiedzialnych stanowiskach) (31), medycynie ubezpieczeniowej i medycynie sądowej (32, 33).

#### Piśmiennictwo:

1. Stibler H.: Carbohydrate-deficient transferrin in serum: a new marker of potentially harmful alcohol consumption reviewed. *Clin. Chem.* 1991; 37: 2029–2037.
2. Stibler H., Borg S., Joustra M.: Micro anion exchange chromatography of carbohydrate-deficient transferrin in serum in relation to alcohol consumption (Swedish Patent 8400587–5). *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 1986; 10: 535–544.
3. Jeppsson J.O., Arndt T., Schellenberg F. et al.: Toward standardization of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) measurements: I. Analyte definition and proposal of a candidate reference method. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2007; 45: 558–562.
4. de Jong G., van Dijk J.P., van Eijk H.G.: The biology of transferrin. *Clin. Chim. Acta* 1990; 190: 1–46.
5. Kamboh M.I., Ferrell R.E.: Human transferrin polymorphism. *Hum. Hered.* 1987; 37: 65–81.
6. Golka K., Wiese A.: Carbohydrate-deficient transferrin (CDT) – a biomarker for longterm alcohol consumption. *J. Toxicol. Environ. Health B. Crit. Rev.* 2004; 7: 319–337.
7. van Eijk H.G., van Noort W.L.: The analysis of human serum transferrins with the PhastSystem: quantitation of microheterogeneity. *Electrophoresis* 1992; 13: 354–358.
8. Martensson O., Harlin A., Brandt R., Seppa K., Sillanaukee P.: Transferrin isoform distribution: gender and alcohol consumption. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 1997; 21: 1710–1715.
9. Arndt T.: Carbohydrate-deficient transferrin as a marker of chronic alcohol abuse: a critical review of preanalysis, analysis, and interpretation. *Clin. Chem.* 2001; 47: 13–27.
10. Chrostek L., Szmitkowski M.: CDT (desialowana transferyna) – nowy biochemiczny marker nadużywania alkoholu. *Psychiatr. Pol.* 1999; 2: 189–202.
11. Chrostek L., Cylwik B., Szmitkowski M., Korcz W.: The diagnostic accuracy of carbohydrate-deficient transferrin, sialic acid and commonly used markers of alcohol abuse. *Clin. Chim. Acta* 2006; 364: 167–171.

12. Grimsrud K., Sundrehagen E.: Units, mg/l or %CDT for detection of harmful alcohol consumption? *Addict. Biol.* 1997; 2: 229–231.
13. Fleming M.F., Anton R.F., Spies C.D.: A review of genetic, biological, pharmacological and clinical factors that affect carbohydrate-deficient transferrin levels. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2004; 28: 1347–1355.
14. Bergstrom J.P., Helander A.: Influence of alcohol use, ethnicity, age, gender, BMI and smoking on the serum transferrin glycoform pattern: implications for use of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) as alcohol biomarker. *Clin. Chim. Acta* 2008; 388: 59–67.
15. Bean P., Peter J.B.: Allelic D variants of transferrin in evaluation of alcohol abuse: differential diagnosis by isoelectric focusing immunoblotting-laser densitometry. *Clin. Chem.* 1994; 40: 2078–2083.
16. Wuyts B., Delanghe J.R., Kasvosve I. et al.: Carbohydrate-deficient transferrin and chronic alcohol ingestion in subjects with transferrin cd-variants. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2001; 39: 937–943.
17. Cavalli-Sforza L., Menozzi P., Piazza A.: The history and the geography of human genes. Princeton University Press. Princeton 1994. NJ.
18. Bean P., Sulphin M.S., Liu Y. et al.: Carbohydrate-deficient transferrin and falsepositive results for alcohol abuse in primary biliary cirrhosis: differential diagnosis by detection of mitochondria. *Clin. Chem.* 1995; 41: 858–861.
19. Heinemann A., Sterneck M., Kuhlencordt R. et al.: Carbohydrate-deficient transferrin: diagnostic efficiency among patients with end-stage liver disease before and after liver transplantation. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 1998; 22: 1806–1812.
20. Delange J.R., Helander A., Wielders J.P.M. et al.: Development and multicenter evaluation of the N Latex CDT direct immunonephelometric assay for serum carbohydrate-deficient transferrin. *Clin. Chem.* 2007; 53: 1115–1121.
21. Dumon M.F., Nau A., Hervouet M. et al.: Isoelectric focusing (IEF) and immunofixation for determination of disialotransferrin. *Clin. Biochem.* 1996; 29: 549–553.
22. Hackler R., Arndt T., Kleine T.O., Gressner A.M.: Effect of separation conditions on automated isoelectric focusing of carbohydrate-deficient transferrin and other human isotransferrins using the PhastSystem. *Anal. Biochem.* 1995; 230: 281–289.
23. Arndt T., Hackler R., Muller T. et al.: Increased serum concentration of carbohydrate-deficient transferrin in patients with combined pancreas and kidney transplantation. *Clin. Chem.* 1997; 43: 344–351.
24. Hackler R., Arndt T., Helwig-Rolig A. et al.: Investigation by isoelectric focusing of the initial carbohydrate-deficient transferrin (CDT) and non-CDT transferrin isoform fractionation step involved in determination of CDT by the ChronAlcol.D assay. *Clin. Chem.* 2000; 46: 483–492.
25. Arndt T., Hackler R., Kleine T.O., Gressner A.M.: Validation by isoelectric focusing of the anion-exchange isotransferrin fractionation step involved in determination of carbohydrate-deficient transferrin by the CDTest assay. *Clin. Chem.* 1998; 44: 27–34.
26. Wuyts B., Delanghe J.R.: The analysis of carbohydrate-deficient transferrin, marker of chronic alcoholism, using capillary electrophoresis. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2003; 41: 739–746.
27. Schellenberg F., Martin M., Caces E. et al.: Nephelometric determination of carbohydrate-deficient transferrin. *Clin. Chem.* 1996; 42: 551–557.
28. Sillanaukee P., Lof K., Harlin A. et al.: Comparison of different methods for detecting carbohydrate-deficient transferrin. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 1994; 18: 1150–1155.
29. Bortolotti F., De Paoli G., Tagliaro F.: Carbohydrate-deficient transferrin (CDT) as a marker of alcohol abuse: a critical review of the literature 2001–2005. *J. Chromatogr. B.* 2006; 841: 96–109.
30. Allen J.P., Litten R.Z., Fertig J.B., Sillanaukee P.: Carbohydrate deficient transferrin: an aid to early recognition of alcohol relapse. *Am. J. Addict.* 2001; 10: 24–28.
31. Morgan M.Y., Major M.G.: The use of serum carbohydrate-deficient transferrin in the assessment of “high risk offenders” in Great Britain. *Alcohol Alcohol.* 1996; 31: 625–628.
32. Berkowicz A., Wallerstedt S., Wall K., Denison H.: Analysis of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) in vitreous humour as a forensic tool for detection of alcohol misuse. *Forensic Sci. Int.* 2003; 137: 119–124.
33. Byrd W.F.: Detecting alcohol abuse: the value of carbohydrate-deficient transferrin. *J. Insur. Med.* 1997; 29: 125–134.
34. Yoshikawa K., Umetsu K., Shinzawa H. et al.: Determination of carbohydrate-deficient transferrin separated by lectin affinity chromatography for detecting chronic alcohol abuse. *FEBS Lett.* 1999; 458: 112–116.
35. Trout A.L., Prasad R., Coffin D. et al.: Direct capillary electrophoretic detection of carbohydrate-deficient transferrin in neat serum. *Electrophoresis* 2000; 21: 2376–2383.
36. Arndt T., Kropf J., Brandt R. et al.: CDTest-RIA and CDTest-EIA for determination of serum carbohydrate-deficient transferrin compared. *Alcohol Alcohol.* 1998; 33: 639–645.
37. Kwok-Gain I., Fletcher L.M., Price J. et al.: Desialylated transferrin and mitochondrial aspartate aminotransferase compared as laboratory markers of excessive alcohol consumption. *Clin. Chem.* 1990; 36: 841–845.

**dr n.med. Bogdan Cylwik**  
**prof. dr hab. Lech Chrostek**  
**prof. dr hab. Maciej Szmikowski**  
*Zakład Diagnostyki Biochemicznej*  
*Uniwersytet Medyczny w Białymstoku*

# WSKAZANIA DO MIKROSKOPOWEJ OCENY ROZMAZU KRWI OBWODOWEJ I AKTUALNE MOŻLIWOŚCI PRZEPROWADZANIA KONTROLI JAKOŚCI TEGO BADANIA

INDICATIONS FOR MICROSCOPIC PERIPHERAL BLOOD SMEAR EXAMINATION  
AND PRESENT APPLICABILITY OF QUALITY CONTROL OF THIS METHOD

**Krzysztof Lewandowski**

## *Streszczenie*

Ocena mikroskopowa rozmazu krwi obwodowej jest niezbędna dla zapewnienia poprawności automatycznych oznaczeń morfologicznych krwi. W artykule omówiono wskazania do przeprowadzania mikroskopowej analizy rozmazu krwi na podstawie wytycznych ISLH. Przedstawiono również wymogi, jakie powinny spełniać programy kontroli jakości badania mikroskopowego krwi.

## *Słowa kluczowe*

ISLH, ocena rozmazu krwi, kontrola jakości

## *Summary*

Microscopic examination of peripheral blood smear is necessary for assurance of accurate results of automated blood morphology testing. This paper presents indications, based on ISLH recommendations, for conducting the microscopic assessment of blood smear. It also discusses requirements which have to be fulfilled by blood smear morphology quality control programs.

## *Keywords*

ISLH, blood film examination, quality control

Współczesne laboratoria medyczne korzystają z coraz bardziej wyrafinowanych metod diagnostycznych. O właściwą jakość badań generowanych przy użyciu tych technik dbają producenci analizatorów, oferując odpowiednie odczynniki kalibracyjne oraz zestawy kontrolne. Dzięki nim powinna być w sposób ciągły monitorowana jakość wykonywanych oznaczeń i przeprowadzane procedury wewnętrznej kontroli jakości. Uzyskanie wartości kontrolnych mieszczących się w dopuszczalnym zakresie dowodzi, że dany analizator funkcjonuje poprawnie, a uzyskiwane wyniki nieprawidłowe najczęściej są odzwierciedleniem jakiejś patologii, skutkiem interferencji albo błędu przedanalizacyjnego. Przy prawidłowo funkcjonującym analizatorze bioche-

micznym trudność związana z interpretacją nieprawidłowego wyniku w większości przypadków bierze się właśnie z konieczności wykluczenia interferencji czy błędów związanych z pobraniem lub przygotowaniem próbki do analizy. Niekiedy konieczne staje się powtórne przeprowadzenie oznaczenia z ponownie pobranego materiału, dotyczy to jednak tylko niewielkiej części próbek. Rzadko wymagane jest przeprowadzenie innych działań. Nieco bardziej złożone jest zapewnienie odpowiedniej jakości oznaczeń morfologicznych krwi. Samo prawidłowe zliczenie poszczególnych elementów upostaciowanych krwi i ich zróżnicowanie przez analizator jest często niewystarczające. Nierzadko analizator sygnalizuje konieczność weryfikacji jednego bądź

wielu parametrów. Wynika stąd, że sam analizator hematologiczny, choćby najnowocześniejszy, nie rozwiązuje wszystkich problemów. Konieczne jest weryfikowanie wartości uzyskiwanych metodami automatycznymi za pomocą innych technik, najczęściej oceną mikroskopową.

Zagadnienie ustalenia szczegółowych wskazań do przeprowadzenia uzupełniającej oceny mikroskopowej po badaniu morfologicznym krwi jest na tyle złożone, że dopiero niedawno panel ekspertów Międzynarodowego Towarzystwa Hematologii Laboratoryjnej (International Society for Laboratory Hematology, ISLH) opracował projekt odpowiednich wytycznych. Pełny wykaz szczegółowych zaleceń jest dostępny na stronie internetowej towarzystwa ([www.islh.org](http://www.islh.org)), warto jednak przytoczyć w tym miejscu najważniejsze z nich (1). Za konieczne uznano np. badanie mikroskopowe rozmazu krwi pobieranej po raz pierwszy od noworodków. Rozmaz należy zawsze ocenić w przypadku wystąpienia szeregu zmian ilościowych w pierwszorazowym badaniu morfologicznym krwi. Zmiany te wymieniono w tabeli obok. Również sygnalizowane przez analizatory zmiany jakościowe mogą wymagać weryfikacji mikroskopowej. Jest to obecność m.in.: dwóch populacji erytrocytów, fragmentów erytrocytów lub erytrocytów opornych na lizę, agregatów płytkowych, niedojrzałych granulocytów, atypowych limfocytów, komórek blastycznych i erytroblastów.

Z zacytowanych zaleceń wynika, że dla prawidłowego funkcjonowania pracowni hematologicznej równie ważne jak analizator jest doświadczenie i wiedza zatrudnionego w niej personelu. Należy podkreślić, że w przeciwieństwie do innych analiz w badaniach mikroskopowych bardzo ograniczone są możliwości kontroli wewnątrzlaboratoryjnej, która najczęściej sprowadza się do konsultacji z bardziej doświadczonym współpracownikiem. Nierzadko w niewielkich

placówkach diagnostycznych nawet i takie działania nie są możliwe do realizacji ze względu na brak drugiej osoby o odpowiedniej wiedzy i kwalifikacjach. Dlatego niezwykle istotne jest uczestniczenie w programach zewnętrznej kontroli jakości, które są jedynym sposobem weryfikacji umiejętności personelu.

Obecnie na rynku dostępnych jest wiele programów kontroli jakości oceny rozmazów krwi obwodowej. Są one w różny sposób zaprojektowane, dlatego zróżnicowany jest stopień trudności. Najczęściej wykorzystywane są sprawdziany, w których oceniane są gotowe barwione preparaty. Aby dany program mógł spełniać swoją funkcję, musi być opracowany zgodnie z publikowanymi wytycznymi międzynarodowych grup eksperckich, zajmujących się zewnętrzną kontrolą jakości w medycynie laboratoryjnej (2, 3).

Zgodnie z tymi zaleceniami do celów przygotowania kontroli powinna być wykorzystywana zarówno krew prawidłowa, jak i patologiczna, pobrana na EDTA. Ze względu na niestabilność materiału uczestnicy kontroli powinni otrzymać gotowe rozmazy, które powinny być wykonane w ciągu 3 godzin od pobrania krwi

**Tabela.** Zmiany ilościowe w pierwszorazowym badaniu morfologicznym krwi.

leukocytoza	$> 30 \times 10^9/l$ lub $< 4 \times 10^9/l$
płytki krwi	$> 1000 \times 10^9/l$ lub $< 100 \times 10^9/l$
hemoglobina	$< 7$ g/dl lub $> 2$ g/dl powyżej górnej granicy normy dla płci
MCV	$< 75$ fl lub $> 105$ fl
RDW	$> 22\%$
neutrocyty	$> 20 \times 10^9/l$ lub $< 1 \times 10^9/l$
limfocyty	u dzieci $< 12$ lat: $> 7 \times 10^9/l$ u dorosłych: $> 5 \times 10^9/l$
monocyty	u dzieci $< 12$ lat: $> 3 \times 10^9/l$ u dorosłych: $> 1,5 \times 10^9/l$
eozynofile	$> 2 \times 10^9/l$
bazofile	$> 0,5 \times 10^9/l$
erytroblasty	dowolna wartość



metodą manualną albo automatyczną (za pomocą systemów SPS). Rozmazy o długości co najmniej 2,5 cm mogą być barwione przez organizatora kontroli lub rozesłane w formie niebarwionej. Rozmazy przed wysłaniem powinny zostać skontrolowane makroskopowo, a przynajmniej część z nich (wskazana w sposób losowy) także mikroskopowo. Kontrola ta ma na celu potwierdzenie poprawności wybarwienia (m.in. jednolitego w całym preparacie zabarwienia, braku znacznych ilości strąków). Sposób zabarwienia komórek musi bowiem umożliwiać pewną identyfikację wszystkich rodzajów komórek. Od uczestników kontroli należy oczekiwać podania składu odsetkowego leukocytów, opisu zmian jakościowych w zakresie erytrocytów, leukocytów i płytek krwi (objawy te należy wybierać z dostarczonej listy). Powinni oni zaproponować najbardziej prawdopodobne rozpoznanie oraz badania uzupełniające odpowiednie do odpowiedniej sytuacji klinicznej. Odpowiedzi udzielone przez uczestników kontroli należy odnieść do oceny ekspertów kontroli, którzy powinni określić znaczenie poszczególnych parametrów jako kluczowe lub drugorzędowe. Na tej podstawie jakościowe wyniki kontroli powinny być ocenione jako prawidłowe, akceptowalne lub nieprawidłowe. W przypadku parametrów ilościowych organizator sprawdzianu definiuje zakres prawidłowy (na podstawie wielokrotności odchyłań standardowych z ocen ekspertów lub wymogów klinicznych). Końcowy raport z kontroli powinien ponadto zawierać prawidłowe rozpoznanie, różnicowanie, pełen opis przypadku i komentarz eksperta dotyczący najczęstszych błędów. Istotny objaw można dodatkowo przedstawić na zdjęciu. W ostatnich latach do programów kontroli jakości coraz szerzej wkracza mikroskopia wirtualna. Zdjęcie preparatu sporządzone pod dużym powiększeniem zamieszczane jest na serwerze i może być ono oglądane w różnych powiększeniach i na całej powierzchni z wykorzystaniem łącz internetowych. Metoda taka

ma dużo zalet. Organizator kontroli ma pewność, że wszyscy uczestnicy oglądają dokładnie to samo. Nie ma konieczności wykonywania dużej ilości preparatów, rozsyłania ich w wiele miejsc. Kontrola może się odbyć szybciej i jej przygotowanie i rozesłanie nie jest tak pracochłonne jak w przypadku tradycyjnych rozmazów. Bardzo istotną zaletą jest możliwość prezentacji rzadkich patologii, w przypadku których nie ma możliwości wykonania dużej liczby preparatów, do przygotowania sprawdzianu internetowego wystarczy bowiem pojedynczy preparat, wykonany w dowolnym czasie.

Jednak jak dotąd sprawdziany internetowe nie mają zbyt wielu zwolenników wśród odbiorców. Składa się na to wiele czynników. „Preparaty” wirtualne nie są tym, do czego uczestnicy przywykli i z czym mają do czynienia w codziennej pracy. Sposób ich oglądania jest inny, znacznie wolniejszy, tym wolniejszy im gorsze jest łącze internetowe i starszy sprzęt komputerowy. Różna kalibracja barw i jasności monitorów może powodować kolejne problemy. Poza tym oceniany obraz jest wyłącznie dwuwymiarowy i nie ma możliwości ogniskowania obrazu na różnych detalach komórek, z czego stale korzysta się przy pracy z mikroskopem. Wszystko to powoduje, że do kwestii kontroli internetowej podchodzi się z dużym dystansem, zwłaszcza jeśli oceniany ma być materiał z reguły ubogokrwinkowy w zakresie leukocytów, jakim jest krew obwodowa. Jeśli dany program kontroli jakości, niezależnie od tego, czy prowadzony w oparciu o rozsyłane preparaty czy też za pośrednictwem internetu, został opracowany zgodnie z cytowanymi wytycznymi, oznacza to, że spełnia swoją podstawową funkcję weryfikowania umiejętności, a często ma przy tym duży walor edukacyjny. Dlatego warto uczestniczyć w zewnętrznych programach kontroli jakości w ocenie rozmazów krwi obwodowej, nic bowiem nie wskazuje, aby w najbliższym czasie analizatory miały nas w tej czynności wyręczyć.



*Piśmiennictwo:*

1. Materiały ze strony internetowej International Society for Laboratory Hematology [http://www.islh.org/2009/index.php?page=consensus\\_preface](http://www.islh.org/2009/index.php?page=consensus_preface).
2. Vives Corrons J.L., Albarède S., Flandrin G. i wsp.: Guidelines for blood smear preparation and staining procedure for setting up an external quality assessment scheme for blood smear interpretation. Part I: Control material. Clin. Chem. Lab. Med. 2004; 42 (8): 922–6.
3. Hematology Working Group of the European External Committee for External Quality Assurance Programmes in Laboratory Medicine (EQALM), Vives Corrons J.L., Van Blerk M., Albarède S. i wsp.: Guidelines for setting up an external quality assessment scheme for blood smear interpretation. Part II: Survey preparation, statistical evaluation and reporting. Clin. Chem. Lab. Med. 2006; 44 (8): 1039–43.

**dr n.med. Krzysztof Lewandowski**

*Katedra Analityki Klinicznej  
Gdański Uniwersytet Medyczny*

**ROLA HbA1c W MONITOROWANIU GLIKEMII***AACC – Strategies 2010; Defining HbA1c role in nondiabetics*

Badania opublikowane w 1993 roku znane jako DCCT (Diabetes Control and Complications Trial) wykazały ścisły związek pomiędzy prawidłową kontrolą glikemii w typie 1 cukrzycy, ocenianą na podstawie oznaczenia HbA1c, a tempem rozwoju mikroangiopatii. Od tej pory rola HbA1c w długoterminowym monitorowaniu glikemii rosła, zostały również sprecyzowane warunki standaryzacji metod jej oznaczania. Opublikowane ostatnio prace zwracają też uwagę na możliwe znaczenie HbA1c w ocenie ryzyka zgonu (all cause mortality) u osób bez cukrzycy. Jest ona również czynnikiem predykcyjnym zachorowalności na cukrzycę i choroby układu krążenia (N. Eng. J. Med. 2010; 362). Autorzy potwierdzają wyższe wartości HbA1c u rasy czarnej.

**EFEKT TERAPEUTYCZNY WYSOKICH DAWEK WITAMIN B U OSÓB Z USZKODZONYMI NERKAMI***AACC – Strategies 2010; Assessing high dose B-vitamin therapy in diabetes*

U około 40% cukrzyków w Stanach Zjednoczonych stwierdza się różnego stopnia nefropatię, która stanowi ogromny problem nie tylko zdrowotny, ale również społeczny. Wiadomo, że wysoki poziom homocysteiny jest jedną z przyczyn rozwoju nefropatii, retinopatii, a także innych chorób naczyniowych w tej grupie chorych, a podanie leków z grupy witamin B poprzez obniżenie stężenia homocysteiny może zwolnić proces narastania niewydolności nerek. W ramach wieloośrodkowego badania Diabetic Intervention with Vitamins to Improve Nephropathy, trwającego 3 lata i obejmującego 238 cukrzyków, połowie z nich podawano 2,5 mg kwasu foliowego, 25 mg witaminy B<sub>6</sub> i 1 mg witaminy B<sub>12</sub> na dobę, druga połowa otrzymywała placebo. Wszyscy badani mieli okresową ocenę wydolności nerek, a także kontrolę poziomu homocysteiny. Zgodnie z oczekiwaniami stężenie homocysteiny w grupie przyjmującej witaminy spadało, ale jednocześnie obserwowano u nich szybszy spadek przesączania oraz większą liczbę incydentów naczyniowych niż w grupie placebo. Nieoczekiwane dla badaczy wyniki wywołały szeroką dyskusję na temat witamin B u osób z uszkodzonymi nerkami. Brano pod uwagę m.in. nasilenie proliferacji komórek pod wpływem kwasu foliowego, zwiększenie metylacji l-argininy, a także uszkadzający efekt cjanokobalaminy.

**NOWY WZÓR DLA OCENY WYDOLNOŚCI NEREK**

Przesączanie kłębuszkowe (GFR – glomerular filtration rate), odzwierciedlające czynność nerek, jest rutynowo podawane na wynikach badań laboratoryjnych jako tzw. eGFR, (szacunkowe GFR), wyliczane ze wzoru MDRD, bazującego na czterech parametrach (stężenie kreatyniny w surowicy, rasa, płeć i wiek). Znane są ograniczenia dla wykorzystywania wzoru, niemniej jest on szeroko akceptowany dla oceny wydolności nerek. W maju 2009 r. został przedstawiony nowy wzór – CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration), opracowany na podstawie wieloośrodkowych badań populacyjnych, prowadzonych w latach 1999–2006 w ramach NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey) i oparty na tych samych parametrach co MDRD. Uzyskane wyniki wykazały, że zgodność z wartościami otrzymanymi przy zastosowaniu pomiaru bezpośredniego GFR z użyciem substancji egzogennych jest wyższa niż w przypadku eGFR MDRD. Doniesienia te wymagają dalszego potwierdzenia przydatności klinicznej.

Bieżące informacje wraz z automatycznym kalkulatorem dostępne są m.in. na stronie wikipedia; Renal function

**INTERFERUJĄCY WPŁYW HEMOLIZY NA WYNIKI BADAŃ***Clinical Chemistry 2010; 56: 1195.*

Wraz ze wzrastającą rolą troponin jako markera sercowego nasuwa się szereg wątpliwości, dotyczących wpływu różnych czynników interferujących, które mogą utrudnić lub wręcz uniemożliwić interpretację zmian szczególnie w zakresie niskich stężeń. Jednym z takich czynników jest hemoliza krwinek czerwonych, którą można zaobserwować zwłaszcza w próbkach pobieranych w przypadkach nagłych („na ostro” – cito); dotyczy to nawet do 20% wszystkich próbek. W numerze lipcowym Clinical Chemistry zostały przedstawione wyniki oznaczeń troponin w próbkach o różnym nasileniu hemolizy, z zastosowaniem różnych zestawów firmowych. Wpływ hemolizy na wyniki nie budzi wątpliwości, aczkolwiek może on być różnokierunkowy w zależności od zestawu.



