

SPIS TREŚCI

3 Elektroforeza w praktyce laboratoryjnej
Cz.1 Rozdział elektroforetyczny białek surowicy
Electrophoresis in everyday practice
Part 1 Routine serum protein electrophoresis
Dagna Bobilewicz

9 Znaczenie fosforu i fosforanów w organizmie
The role of phosphorus in body function
Marzenna Gruszka, Grażyna Odrowąż-Sypniewska, Agnieszka Pater

13 Znaczenie wapnia w organizmie
The role of calcium in body function
Agnieszka Pater, Grażyna Odrowąż-Sypniewska, Marzenna Gruszka

17 Materiały informacyjne - HORIBA ABX
Czynnik reumatoidalny

19 Pentra DX 120 - nowa technologia - komplet badań hematologicznych na jednej platformie
Pentra DX 120 - New technology - delivers a complete hematology platform
Pascal Berthet

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

Redaktor koordynujący:

dr Beata Olszewska,

e-mail: bolszewska@pl.abx.fr

Zasady publikowania prac w IN VITRO EXPLORER
do wglądu u dr Beaty Olszewskiej

Redakcja: Maria Domagała, Marta Domagała

Projekt graficzny: Aleksandra Król

Skład i łamanie: Zych Studio

ISSN 1732-9752

Nakład: 1500 egz.

lipiec 2005

ELEKTROFOREZA W PRAKTYCE LABORATORYJNEJ

CZ. 1 ROZDZIAŁ ELEKTROFORETYCZNY BIAŁEK SUROWICY

ELECTROPHORESIS IN EVERYDAY PRACTICE PART 1 ROUTINE SERUM PROTEIN ELECTROPHORESIS

Dagna Bobilewicz

Streszczenie

Rozdział elektroforetyczny białek surowicy na podłożu agarozowym pozwala na uzyskanie 5 głównych frakcji, w tym jednorodnej frakcji albumin i heterogennych globulin. Automatyzacja procesu umożliwia otrzymanie wyraźnych obrazów informujących nie tylko o zmianach w ramach poszczególnych frakcji, ale również o ogólnym stanie białek surowicy. Elektroforeza nie określa stężeń poszczególnych białek ani ich nie identyfikuje, lecz stanowi wstępny etap do dalszej diagnostyki.

Słowa kluczowe

elektroforeza białek surowicy, agarosa, systemy automatyczne.

Summary

Serum protein electrophoresis on agarose medium enables distinction of 5 main fraction among them homogenous albumin and heterogeneous globulins. Thanks to process automation bands are clearly separated and visible and provide information not only about changes within fraction but also those regarding the general protein pattern. Electrophoresis neither gives results for individual proteins nor identifies them but indicates the direction for further diagnostic process.

Keywords

serum protein electrophoresis, agarose, automatic systems.

Białka są drugim po wodzie komponentem ustroju ludzkiego, stąd możliwości oceny poszczególnych ich składników budziły zainteresowanie od chwili poznania ich roli tak w procesach fizjologicznych, jak i w rozwoju patologii. Już w 1878 roku francuski chemik Mehu przedstawił propozycję oznaczeń albumin. Następny krok to rozdzielanie albumin od globulin przy zastosowaniu siarczanu amonu. W roku 1930 Tiselius wprowadził klasyczną technikę rozdziału frakcji białkowych w polu elektrycznym, jednak użycie płynnego podłoża i skomplikowanej aparatury uniemożliwiało wprowadzenie metody do badań rutynowych. Dopiero w latach 60. XX wieku elektroforeza stała się częścią oznaczeń białkowych w laboratoriach medycznych, przechodząc kolejne stadia od rozdziałów prowadzonych na bibule, poprzez używany do dziś jako nośnik octanu celulozy, po żel agarozowy, który zyskał popularność. Jest on szeroko stosowany ze względu na dobre obrazy, a także swoją przeźroczystość, która

pozwała uniknąć tzw. etapu przejaśniania, charakterystycznego dla octanu celulozy. Duże perspektywy ma elektroforeza kapilarna, która rozwija się równolegle do istniejących technik (2, 3).

Terminem elektroforeza określa się zjawisko migracji cząstek lub cząsteczek w polu elektrycznym w zależności od posiadanego ładunku. Elektroforeza stosowana do podstawowego rozdziału białek (tzw. zone electrophoresis) to zachodzący w porowatym podłożu jednoczesny rozdział na poszczególne frakcje. Cząstki o ładunku dodatnim poruszają się w kierunku anody, ujemne zaś w kierunku katody, natomiast ruchliwość amfolitów (substancje mogące przybierać ładunek bądź dodatni, bądź ujemny; można do nich zaliczyć białka ze względu na to, że posiadają zarówno grupy aminowe, jak i karboksylowe) zależy od pH podłoża. W środowisku kwaśnym o niższym pH niż ich punkt izoelektryczny mają one ładunek dodatni, w zasadowym przyjmują ładunek ujemny i migrują w kierunku

anody. Szybkość migracji zależy od:

- ładunku cząstki
- wielkości i kształtu cząstki
- siły elektrycznej pola (volt/cm)
- temperatury rozdzielania
- właściwości nośnika.

Szybkość migracji jest wprost proporcjonalna do ładunku i odwrotnie proporcjonalna do wielkości cząstki i lepkości podłoża. Istnieje również szereg innych czynników wpływających na migrację.

Agaroza, najpopularniejszy nośnik stosowany w elektroforezie białek, jest frakcją agaru i stosowana w niskich stężeniach (0,5-1%) tworzy duże pory, pozwalające na migrację nawet dużych cząstek białek bez zjawiska dystorsji frakcji. Ogranicza również zjawisko elektroosmozy. Rozdziały na agarozie zależą od stosunku ładunku do masy - inaczej niż rozdziały na żelu poliakrylamidowym, działającym jak sito molekularne, gdzie ma również znaczenie wielkość cząsteczki (2, 3).

Rutynowe rozdzielanie białek na agarozie prowadzone są w buforze o pH zasadowym, przy zastosowaniu manualnej lub automatycznej metody aplikacji. Coraz szerzej dostępne systemy automatyczne standaryzują warunki migracji oraz etapy suszenia i barwienia (1) (rys. 1). Najczęściej do wybarwiania frakcji białkowych stosuje się czerń amidową, błękit Coomassie, a także kwaśny fiolet, zaś w przypadku octanu celulozy - czerwień pąsową, która mniej wyraźnie wybarwia białka monoklonalne o niewielkim stężeniu. Sposób ilościowego wyrażania frakcji to densytometriowanie, a następnie przeliczanie poszczególnych frakcji na wartości procentowe oraz na stężenia bezwzględne w odniesieniu do znanego, uprzednio oznaczonego stężenia białka całkowitego. Jako materiał do badań używa się surowicy, która może być przechowywana w temperaturze 4-8°C przez 7 dni. Nie jest wskazane stosowanie osocza ze względu na to, że fibrynogen może powodować powstanie dodatkowego pasma w obrębie gammaglobulin, imitującego

białko monoklonalne. W przypadku wątpliwości zaleca się nawet dodatkowe wykrzepienie surowicy przy użyciu trombiny.

Zakresy wartości prawidłowych podawane przez producentów jak również przez różnych autorów w piśmiennictwie powinny być zweryfikowane przez laboratorium, które również powinno mieć wyliczone współczynniki zmienności dla nieprecyzji w odniesieniu do poszczególnych frakcji (1, 2). Zgodnie z danymi z piśmiennictwa współczynnik zmienności dla oznaczeń w serii (na jednej płytce) wynosi od 1% dla albumin do 4,5% dla betaglobulin, a między seriami (z dnia na dzień) odpowiednio od 2,1 do 7,3% (1). Doświadczenia własne potwierdzają te wartości. Ze względu na trudny dostęp do materiału kontrolnego dobrej jakości codzienne oznaczenia kontrolne powinny opierać się na ocenie wyników pacjentów lub materiale zlewkowym, a na każdej płytce musi znajdować się przynajmniej jeden rozdział prawidłowy dla porównania.

Rutynowo wykonywane rozdzielanie białek surowicy pozwalają na uzyskanie 5-6 frakcji. Znajduje się tam największa homogenna frakcja albumin oraz pozostałe frakcje reprezentujące globuliny alfa 1, alfa 2, beta (beta 1, beta 2) oraz gamma, składające się z różnych białek, pełniących różnorodne funkcje i noszących często nazwę białek specyficznych. Dopiero ilościowe ich oznaczenia mogą dostarczać istotnych informacji, trudnych do uzyskania wyłącznie w oparciu o rozdzielanie elektroforetyczne. Jako przykład może posłużyć białko C-reaktywne - typowe białko ostrej fazy, którego stężenie wyrażane w mg/l nawet w warunkach wybitnej patologii jest zazwyczaj zbyt małe, aby mogło być uwidocznione w elektroforezie. Innym przykładem jest nakładanie się prążków białek migrujących blisko siebie - jak „blokowanie” haptoglobiny przez ceruloplazminę. Wśród frakcji globulin rozróżnia się (rys. 2):

- alfa 1 (orozomukoid, antytrypsyna, antychymotrypsyna, alfafetoproteina)
- alfa 2 (haptoglobina, ceruloplazmina, makroglobulina)

- beta (transferyna, hemopeksyna, C3, betalipoproteiny). Frakcja beta 2, w skład której wchodzi C3, może być uwidoczniona tylko w świeżej surowicy i nie ma istotnego znaczenia diagnostycznego, dlatego na ogół nie jest uwzględniana jako odrębna, lecz podawana jako frakcja beta

- gamma (immunoglobuliny).

Zaburzenia w poszczególnych frakcjach mogą być spowodowane różnymi przyczynami, a w szczególności:

- Frakcje podwójne, frakcje dodatkowe, brak frakcji bądź ich znaczne obniżenie mogą być skutkiem uwarunkowań genetycznych.

- Zmiana ruchliwości elektroforetycznej może nastąpić w wyniku innych, niegenetycznych przyczyn, jak np. przyłączenie dodatkowych grup chemicznych lub związków (zmiana ruchliwości albumin po przyłączeniu salicylanów czy nadmiaru wolnych kwasów tłuszczowych).

- Dodatkowy prążek może pojawić się w wyniku wybitnego wzrostu stężenia jednego z białek (np. prążek między albuminą i alfa 1 w wyniku ponad 100-krotnego wzrostu alfafetoproteiny lub uwidocznienie słabego prążka we frakcji gamma w wyniku wybitnego wzrostu stężenia CRP).

Interpretacja podstawowych zaburzeń, stwierdzanych w rozdziale elektroforetycznym białek surowicy

Zmiany w zakresie frakcji albumin

- Hipoalbuminemia manifestująca się obniżeniem wartości albumin może być spowodowana:
- niedoborami pokarmowymi (niedożywienie, zespół złego wchłaniania)
- upośledzoną syntezą albumin przez wątrobę
- nasiloną utratą albumin (zespół nerczycowy, oparzenia)
- hiperkatabolizmem.

Należy pamiętać, że stężenie albumin oznaczane zaautomatyzowanymi metodami barwnikowymi jest o kilka

procent wyższe niż dane uzyskane z rozdziału elektroforetycznego, pojedynczy wynik natomiast można uzyskać znacznie szybciej, w tym również w trybie pilnym.

- Bisalbuminemia charakteryzująca się dwoma pikami w zakresie frakcji albumin może być wrodzona bądź towarzyszyć określonym patologiom trzustki.

- Rzadkim wrodzonym defektem jest prawie całkowity brak albumin (stężenie około 0,5 g/dl).

Zmiany w zakresie frakcji alfa 1

- Obniżenie związane jest głównie z wrodzonym niedoborem alfa-1-antytrypsyny.

- Podwyższenie, często równoległe do podwyższenia alfa 2, najczęściej jest wynikiem reakcji ostrej fazy.

Zmiany w zakresie frakcji alfa 2

- Frakcja podwójna może być wynikiem bądź użycia surowicy wykazującej ślady hemolizy, bądź obecności różnych fenotypów haptoglobiny (co nie musi być związane z patologią kliniczną) lub nietypowej migracji defektywnej apolipoproteiny B.

- Obniżenie występuje w uszkodzeniu komórki wątrobowej i obniżeniu syntezy białek lub w wyniku hemolizy wewnątrznaczyniowej, prowadzącej do wyczerpania haptoglobiny.

- Ze wzrostem (haptoglobiny) mamy do czynienia w stanach zapalnych, a także w zespole nerczycowym, dla którego charakterystyczny jest również spadek albumin i wzrost frakcji beta ze względu na współistniejące zaburzenia lipidowe (wybitna hipercholesterolemia i wzrost apolipoproteiny B).

Zmiany w zakresie frakcji beta

- Obniżenie w wyniku istotnego obniżenia stężenia transferyny, co ma miejsce w niedożywieniu i reakcji ostrej fazy.

- Podwyższenie frakcji beta oraz gamma (gammopatia poliklonalna) ma miejsce w chorobach wątroby, głównie w marskości, może być też spowodowane

występowaniem białka monoklonalnego - głównie A, i wolnych łańcuchów kappa i lambda, produkowanych przez szpiczak. Niewielki wzrost może być spowodowany wysokim poziomem transferyny.

Zmiany w zakresie frakcji gamma

- Z obniżeniem masy do czynienia w okresie noworodkowym (fizjologicznie), we wrodzonej hipogammaglobulinemii oraz w zaburzeniach wtórnych spowodowanych chemio- i radioterapią, leczeniem immunosupresyjnym oraz podawaniem kortykoidów. Jest to również objaw charakterystyczny dla szpiczaka produkującego wolne łańcuchy.

- Hipergammaglobulinemia to przede wszystkim gammapatie monoklonalne związane z procesem rozrostowym lub o przebiegu łagodnym, a także poliklonalne obserwowane w uszkodzeniach wątroby, AIDS i niektórych chorobach o podłożu autoimmunologicznym. Obserwuje się również przypadki przejściowego pojawienia się pojedynczych słabo wysyconych frakcji immunoglobulin, odpowiadających obecności różnego rodzaju przeciwciał (w tym autoprzeciwciał). Wzrost frakcji gamma w postaci rozlanego prążka jest typowy dla tzw. gammapatii poliklonalnej związanej z reakcjami immunologicznymi organizmu, przewlekłych stanów zapalnych, chorób wątroby lub rozlanego procesu nowotworowego.

Większe znaczenie niż zmianom w obrębie poszczególnych frakcji przypisuje się zmianom w całym elektroforegramie. Poniżej przedstawiono kilka typowych przykładów.

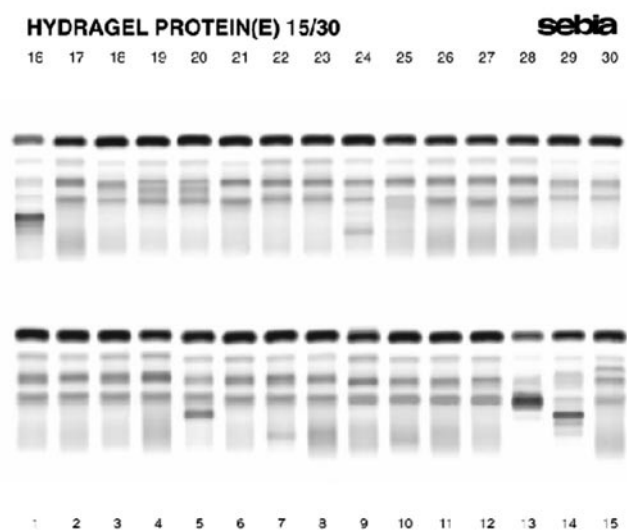
1. Obniżenie albumin i frakcji gamma w połączeniu ze wzrostem alfa-2-globulin sugeruje utratę białek charakterystyczną dla zespołu nerczycowego. Należy jednak pamiętać, że obniżenie stężenia albumin musi być rzędu 1/3 ich prawidłowej wartości, aby było uwidocznione w elektroforezie.

2. Podwyższenie frakcji globulin alfa 1 i alfa 2 jest charakterystyczne dla reakcji ostrej fazy. Wzrost tylko

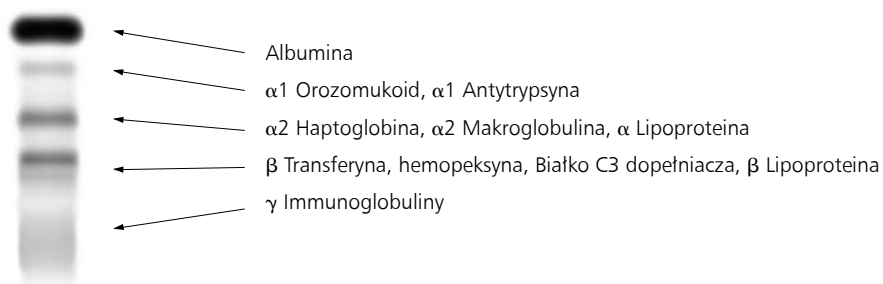
frakcji alfa 1 można obserwować w przewlekłym zapaleniu wątroby i w ostrej fazie, której towarzyszy hemoliza, ale również u osób będących w trakcie terapii estrogenu lub u kobiet ciężarnych. Wzrost alfa 2 można stwierdzić również w przypadkach reumatoidalnego zapalenia stawów lub chorób charakteryzujących się obecnością kompleksów immunologicznych.

3. Obraz zlania frakcji beta i gamma sugeruje wzrost IgA, charakterystyczny dla marskości wątroby, a także reumatoidalnego zapalenia stawów i przewlekłych stanów zapalnych (3).

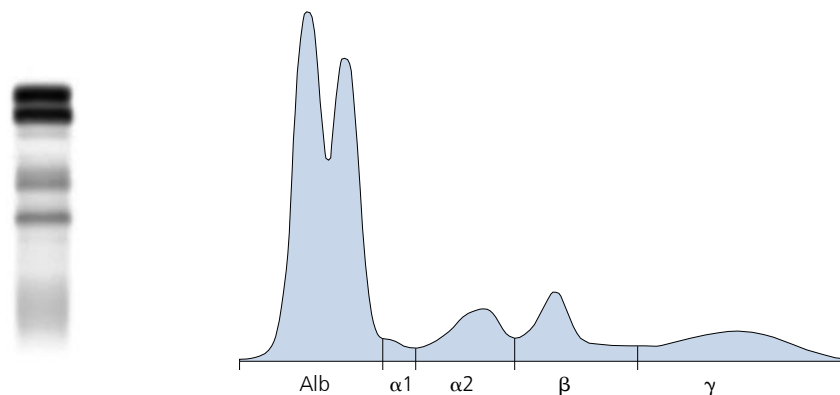
Rozdziały elektroforetyczne białek surowicy dostarczają wielu istotnych informacji, jednak ich interpretacja musi być połączona nie tylko z obrazem klinicznym, ale również z oznaczeniami ilościowymi poszczególnych białek. Szczególnego opracowania wymaga pojawianie się frakcji białka monoklonalnego, które musi być nie tylko zidentyfikowane, ale również określone i oznaczone ilościowo. Możliwe będzie to wyłącznie w przypadku, gdy wszyscy pacjenci z podwyższonym stężeniem białka powyżej 8,6 g/dl będą kierowani na badanie elektroforetyczne z identyfikacją białka i określeniem jego stężenia.



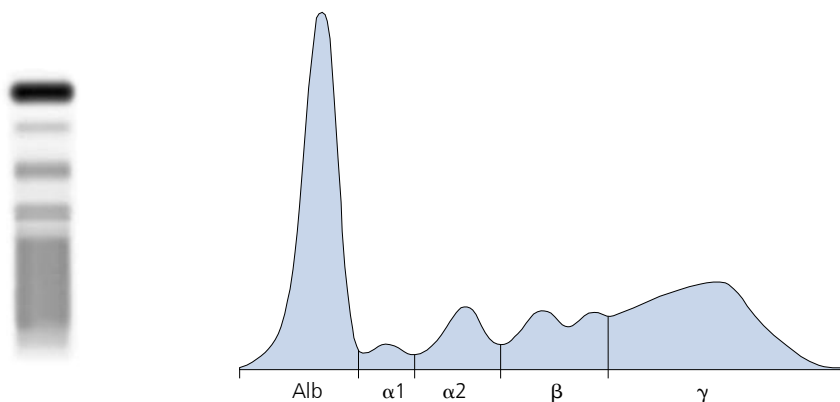
Rys. 1. Rozdział elektroforetyczny białek surowicy na żelu agarozowym. Płytkę przeznaczoną do wykonania 30 rozdziałów jednocześnie przy użyciu zautomatyzowanego systemu HYDRASYS (Sebia).



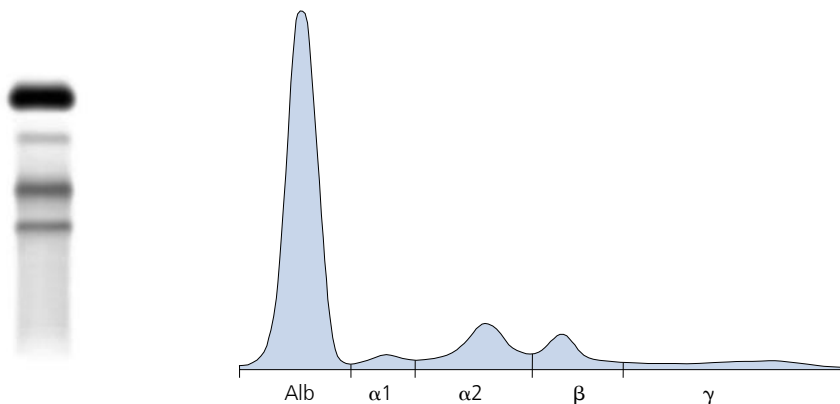
Rys. 2. Przykład rozdziału białek surowicy na żelu agarozowym na 5 frakcji.



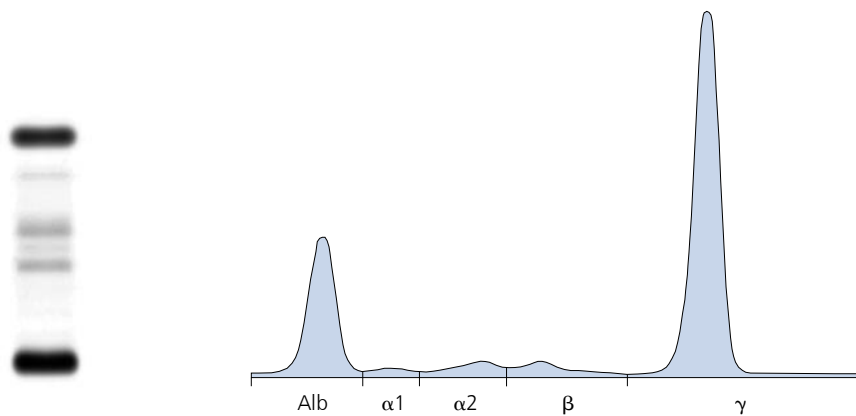
Rys. 3. Zmiany we frakcji albumin - bisalbuminemia.



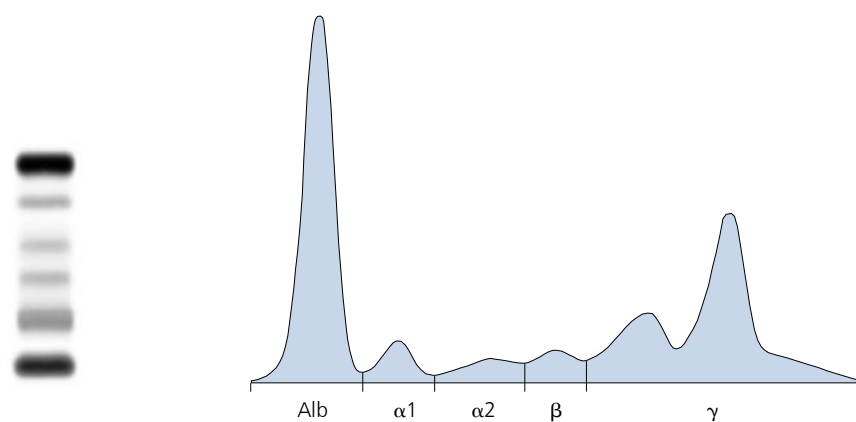
Rys. 4. Zmiany we frakcji globulin charakterystyczne dla marskości wątroby.



Rys. 5. Hipogammaglobulinemia.



Rys. 6. Obecność białka monoklonalnego.



Rys. 7. Gammapatia biklonalna.

Piśmiennictwo:

1. Bossuyt X., Bogartes A., Schiettekatte A. et al.: Serum protein electrophoresis and immunofixation by semiautomated electrophoresis system. Clin.Chem. 1998, 44, 944-949.

2. Le Carrer Didier: Serum protein electrophoresis and immunofixation. SA Sebia 1995.

3. Johnson A. M., Rohlf E. M., Silverman Proteins w Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry wydawcy: Carl Burtis Edward Ashwood W.B Sanders Company 2001.

prof. dr hab. Dagna Bobilewicz

*Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej
Wydziału Nauki o Zdrowiu AM w Warszawie*

ZNACZENIE FOSFORU I FOSFORANÓW W ORGANIZMIE

THE ROLE OF PHOSPHORUS IN BODY FUNCTION

Marzenna Gruszka, Grażyna Odrowąż-Sypniewska, Agnieszka Pater

Streszczenie

Fosfor jest głównym anionem śródkomórkowym. Około 85% fosforu w organizmie znajduje się w tkance kostnej. Fosfor jest niezbędny do prawidłowego rozwoju i funkcjonowania ustroju. Uczestniczy w wielu ważnych procesach fizjologicznych. Fosfor stanowi podstawowy składnik kwasów nukleinowych. W organizmie występuje głównie w postaci fosforanów. Regulacja stężenia fosforu we krwi zależy od działania hormonów: parathormonu (PTH), kalcitriolu ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), hormonu wzrostu, kalcytoniny, tyroksyny, insuliny i kortyzolu. W utrzymaniu homeostazy fosforanów kluczową rolę odgrywają nerki. Zaburzenia w stężeniu fosforu pojawiają się jako wtórne do zmian wapnia.

Słowa kluczowe

fosfor, oznaczanie, wartość diagnostyczna.

Summary

Phosphorus is a major intracellular anion. Approximately 85% of the body's phosphorus is found in the bone tissue. It is indispensable for the human body's normal functioning; it participates in many important physiological processes. Phosphorus is an essential component of nucleic acids. The majority of phosphorus in the human body occurs as phosphates. The regulation of the level of phosphorus in the blood is the function of the following hormones: parathyroid hormone (PTH), calcitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), somatotropin, calcitonin, thyroxine, insulin and cortisol. Kidneys play a key role in maintaining the phosphate homeostasis in the human body. Abnormal phosphorus level results from changes in calcium homeostasis.

Key words

phosphorus, measurement, diagnostic utility.

Rola i regulacja stężenia fosforu (P) i fosforanów

Zawartość fosforu w organizmie dorosłego człowieka wynosi 0,35-0,45 mol/kg beztłuszczowej masy ciała, z czego 85% znajduje się w tkance kostnej, 6% w tkance mięśniowej, a 9% w innych tkankach. Fosfor jest niezbędny do prawidłowego rozwoju i funkcjonowania organizmów żywych. Wchodzi w skład kwasów nukleinowych DNA i RNA. Stanowi istotny składnik kości. Hydroksyapatyty i fosfoproteiny tkanki podporowej pełnią rolę budulcową, natomiast pirofosforany odgrywają rolę regulatorową w procesach osteogenezy i osteolizy. Fosfor zawarty w wysokoenergetycznych związkach, takich jak ATP, ADP, fosfokreatyna, uczestniczy w dostarczaniu energii dla przemian metabolicznych. Ponadto jest składnikiem fosfolipidów błon komórkowych oraz błon mikrosomalnych i mitochondrialnych. Uczestniczy również w fosforylacji węglowodanów i białek wewnątrz komórki, co jest ważnym etapem procesu przetwarzania

bodźców hormonalnych na działanie czynnościowe komórek docelowych, a także etapem procesu transkrypcji informacji genetycznej z DNA na RNA. We krwi fosfor występuje w postaci związków nieorganicznych i organicznych (estrów kwasu fosforowego - fosfolipidów i fosfoprotein). Fosfor nieorganiczny jest frakcją, która ma znaczenie kliniczne. Nieorganiczne fosforany występują w surowicy w trzech formach: zjonizowanej (53%), niedysocjujących kompleksów (35%) oraz jako związki z białkami (12%) (1, 3, 5).

Fosforany, tworząc układy buforujące we krwi i w moczu, umożliwiają utrzymanie stałego pH. Odgrywają także podstawową rolę w przemianach energetycznych komórek (1, 2, 3). Stężenie fosforu nieorganicznego u osób dorosłych zależy od wieku, płci i pH.

Wartości prawidłowe stężenia fosforanów przedstawiają się następująco (2):

SUROWICA	
Dorośli	0,84-1,45 mmol/l
Dzieci < 12 mies.	1,56-2,8 mmol/l
Dzieci > 12 mies.	1,10-2,0 mmol/l
Wskaźnik oczyszczania fosforanów	5,4-16,2 ml/min

Głównymi czynnikami modyfikującymi stężenie fosforu we krwi są hormony. Wchłanianie fosforu w jelicie wzmagają parathormon (PTH), kalcitriol (1,25-dihydroksycholekalcyferol -1,25(OH)₂D₃) i hormon wzrostu. Wpływają one również na obrót kostny fosforanów. Wchłanianie fosforu hamują jony wapnia i niektóre leki neutralizujące treść żołądkową i wiążące fosforany (np. wodorotlenek glinu czy wodorotlenek magnezu stosowane w leczeniu nadkwaśności żołądka). 85% przesączonych fosforanów ulega resorpcji zwrotnej w kanalik proksymalnym oraz - w niewielkim stopniu - w dystalnym. PTH, kalcitriol oraz kalcytonina powodują nasilenie wydalania fosforanów, natomiast hormon wzrostu, tyroksyna, insulina i kortyzol - obniżenie (1, 2, 3, 4) (rys.).

Ocena zasobów ustrojowych fosforanów

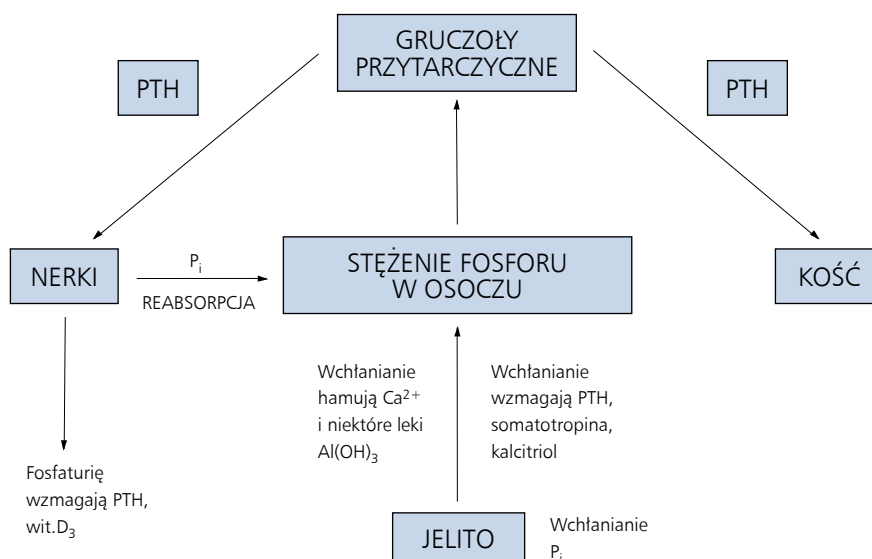
W celu ustalenia zasobów fosforanów w organizmie określa się stężenie fosforanów nieorganicznych w osoczu (surowicy) lub ich dobowe wydalanie. We współczesnej diagnostyce laboratoryjnej do oznaczania stężenia fosforanów stosowane są metody kolorymetryczne. Najpopularniejszą z nich jest metoda Fishke-Subbarowa, w której fosfomolibdenian amonu ulega redukcji do błękitu molibdenu (2, 5). Jedną z form oceny wydalania fosforanów w moczu jest oznaczanie wskaźnika oczyszczania fosforanów - klirensu fosforanowego (2).

Ze względu na fakt, że jedynie 1% fosforu znajduje się w płynie pozakomórkowym, interpretacja bezwzględного niedoboru fosforanów na podstawie wyników oznaczeń laboratoryjnych jest trudna, gdyż hipofosfatemia nieko-

niecznie musi oznaczać zbyt niskie stężenie fosforanów w tkankach, a hiperfosfatemia nie wyklucza niedoboru fosforanów w tkankach (3). Hiperfosfatemia nie daje bezpośrednich objawów klinicznych, podobnie zresztą jak umiarkowana hipofosfatemia (3, 4). Zaburzenia w stężeniu fosforu pojawiają się jako wtórne do zmian wapnia, te dwa parametry oznacza się jednocześnie (2, 4). W warunkach patologicznych zmiany stężenia wapnia i fosforanów w osoczu mogą przebiegać w odwrotnych kierunkach bądź jednokierunkowo, co zależy od mechanizmów, które je wywołują (5). Stężenie fosforu w osoczu odzwierciedla równowagę między spożyciem, rozmieszczeniem w organizmie, reabsorpcją nerkową i wydzielaniem przez nerki. Zaburzenia tej równowagi mogą doprowadzać zarówno do hipofosfatemii, jak i hiperfosfatemii (4).

Najczęściej hiperfosfatemia jest wynikiem przewlekłej niewydolności nerek, ale może mieć także inne przyczyny, jak np. nadmierna podaż fosforu, wzmożone wchłanianie fosforanów z przewodu pokarmowego, niedoczynność przytarczyc, rzekoma niedoczynność przytarczyc, akromegalia oraz translokacje fosforu nieorganicznego z komórek do płynu pozakomórkowego, spowodowane nasileniem katabolizmu lub destrukcji tkanek. Wzrostowi stężenia fosforu często towarzyszą hipokalcemia, hiperurikemia i hiperkalemia oraz niewydolność nerek. Nadmiar fosforu we krwi może być również spowodowany kwasicią metaboliczną i oddechową (2, 3). Objawy kliniczne nadmiaru fosforu w organizmie zależą od choroby podstawowej. Jednak przy znacznej hiperfosfatemii niezależnie od etiologii typowym objawem są napady tężyzki.

Hiperfosfatemia występuje u przeważającej większości pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek i prowadzi do wtórnej nadczynności przytarczyc, osteodystrofii nerkowej oraz wzrostu ryzyka śmierci z powodu incydentów sercowo-naczyniowych. W świetle dotychczas przeprowadzonych badań wydaje się, że kontrolowanie poziomu fosforu w surowicy odgrywa najważniejszą



Regulacja stężenia fosforu w osoczu.

rolę w profilaktyce i leczeniu zwapnienia naczyń u pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek (6, 7, 8).

Hipofosfatemie powoduje:

- niedostateczna podaż fosforanów (odżywianie pozajelitowe)
- obniżone wchłanianie fosforu w jelicie (zespół złego wchłaniania, biegunka, podawanie leków wiążących fosforany, np. długotrwałe używanie preparatów glinu)
- nadmierne przemieszczanie fosforu pozakomórkowego do komórek (leczenie kwasicy cukrzycowej, zasadowica oddechowa)
- zwiększenie wydalania fosforanów z moczem (w przebiegu pierwotnej i wtórnej nadczynności przytarczyc, przy stosowaniu leków przeciwpadaczkowych, diuretyków i glikokortykoidów, w zespole Fanconiego)
- defekt kanalikowy transportu fosforanów w nerkach (krzywica oporna na witaminę D).

Stwierdzono, że hipofosfatemia i wczesne podawanie fosforu jest związane z dobrą prognozą leczenia ostrej niewydolności wątroby. Zaobserwowano również, że w pojedynczych przypadkach ostra hipofosfatemia może powodować wewnątrznaczyniową hemolizę (9, 10). W przewlekłym alkoholizmie hipofosfatemia

jest wynikiem niedostatecznej podaży, utraty fosforu z wymiotami lub kałem i jednoczesnej wzmożonej utraty przez nerki, a także częstym podawaniem leków wiążących fosforany: węglanu wapnia, octanu wapnia, soli glinu.

Konsekwencją znacznego niedoboru fosforanów nieorganicznych jest dysfunkcja wszystkich rodzajów komórek krwi: erytrocytów (niedobór 2,3-difosfoglicerynianu jako czynnika regulującego wiązanie tlenu przez hemoglobinę), granulocytów i płytek krwi (zmiany strukturalne i czynnościowe), co w efekcie prowadzi do hipoksji, wzrostu ryzyka zakażeń i skazy krwotocznej. Wynikiem hipofosfatemii może być również upośledzenie czynności centralnego i obwodowego układu nerwowego w postaci parestezji, drżenia zamiarowego, drażliwości, zaburzeń orientacji, afazji, ataksji, drgawek czy śpiączki, a także zaburzenia czynności wątroby i nerek (1). Podanie fosforanów na ogół znacząco i w krótkim czasie poprawia stan pacjenta i z tego powodu dostępność ich oznaczeń w surowicy powinna być zapewniona przez całą dobę, szczególnie w szpitalach posiadających oddziały intensywnego nadzoru.

Piśmiennictwo:

1. Kokot F.: Choroby wewnętrzne. PZWL, Warszawa 2000, 1087-1093.
2. Neumeister B., Besenthal I., Liebich H.: Diagnostyka laboratoryjna. Urban & Partner, Wrocław 2003, 180-182.
3. Poznańska-Linde H., Odrowąż-Sypniewska G.: Wybrane zagadnienia z diagnostyki laboratoryjnej. AM Bydgoszcz 2000, 144-145, 147-148.
4. Tilton R.C., Balows A., Hohnadel D.C., Reiss R.F.: Clinical Laboratory Medicine. Mosby-Year Book, St. Louis 1992, 136-137, 140-141.
5. Tomaszewski J.: Diagnostyka laboratoryjna. PZWL, Warszawa 2001, 50-51, 204-205.
6. Achinger S.G., Ayus J.C.: The role of daily dialysis in the control of hyperphosphatemia. Kidney Int. Suppl. 2005, (95), 28-32.
7. Nolan C.R., Qunibi W.Y.: Treatment of hyperphosphatemia in patients with chronic kidney disease on maintenance hemodialysis. Kidney Int. Suppl. 2005, (95), 13-20.
8. Nitta K., Akiba T.: Renal dysfunction and hyperphosphatemia-role of hyperphosphatemia on vascular calcification, Clin. Calcium 2001, 11(10), 1275-81, Abstract.
9. Baquerizo A., Anselmo D., Shackleton C., Chen T. W., Cao C., Weaver M., Gornbein J., Geevarghese S., Nissen N., Farmer D., Demetriou A., Busuttil R.W.: Phosphorus as an early predictive factor in patients with acute liver failure. Transplantation 2003, 27, 75(12), 2007-14.
10. Melvin J. D., Watts R. G.: Severe hypophosphatemia: a rare cause of intravascular hemolysis. Am. J. Hematol. 2002, 69(3), 223-4.

mgr Marzenna Gruszka

prof. dr hab. n. med. Grażyna Odrowąż-Sypniewska

mgr Agnieszka Pater

Katedra i Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej Collegium Medicum

im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy UMK w Toruniu

e-mail: kizdiagn@cm.umk.pl

ROLA WAPNIA W ORGANIZMIE

THE ROLE OF CALCIUM IN BODY FUNCTION

Agnieszka Pater, Grażyna Odrowąż-Sypniewska, Marzenna Gruszka

Streszczenie

Wapń jest dwuwartościowym kationem, który w 99% występuje w tkance kostnej. Bierze udział w wielu kluczowych procesach fizjologicznych. W regulacji stężenia wapnia w organizmie uczestniczą: parathormon (PTH), kalcitriol i kalcytonina, w mniejszym stopniu tyreotropina (TSH) i wolna trijodotyronina (FT3) oraz narządy: jelito, nerki i kości. Oznaczanie poziomu wapnia we krwi ma ogromne znaczenie ze względu na towarzyszące zmianom stężenia objawy kliniczne, zwłaszcza ze strony układu krążenia, nerwowego i przewodu pokarmowego.

Słowa kluczowe

wapń, oznaczanie, wartość diagnostyczna.

Summary

Calcium is a divalent cation occurring mainly in bone tissue (99%). Only 1 percent is found in the blood and soft tissues. Calcium level depends on the activity of several hormones such as: parathormone (PTH), calcitriol, calcitonin, thyreotropin (TSH) and free triiodothyronine (FT3) and the functioning of various organs such as intestines, kidneys and bones. Calcium plays an important role in many key physiological processes and for the human organism to function normally its level in the blood and extracellular fluid must be maintained within a very narrow range. Routine measurement of calcium level has great importance because hyper/hypocalcemia accompanies clinical symptoms, especially from the cardiovascular and nervous systems as well as the gastrointestinal tract.

Key words

calcium, measurement, diagnostic utility.

Fizjologiczna funkcja i regulacja hormonalna stężenia wapnia (Ca)

Wapń jest dwuwartościowym kationem, którego zawartość w organizmie wynosi 0,5-0,625 mol/kg beztłuszczowej masy ciała. Około 99% wapnia w organizmie przypada na tkankę kostną, 0,9-1% znajduje się w płynach pozakomórkowych, a 0,1% w płynach wewnątrzkomórkowych (1, 2, 3, 5). Wapń bierze udział nie tylko w tworzeniu tkanki kostnej, ale przede wszystkim w wielu kluczowych procesach fizjologicznych. Obecność wapnia jest niezbędna w procesie krzepnięcia krwi; wapń pełni rolę kofaktora dla czynników VII, IX, X i protrombiny. Pierwiastek ten jest również substancją mediatorową, przetwarzającą bodziec chemiczny, fizyczny lub hormonalny na określony efekt biologiczny (uwalnianie enzymów, neuroprzekazników, hormonów itd.). Uczestniczy on w wymianie między komórką a jej otoczeniem lub między organellami komórkowymi (kanały wapniowe). Wapń jest też przekaźnikiem stanów

pobudzenia w synapsach nerwowych oraz bierze udział w skurczu mięśni (wyznacznik progu pobudliwości komórek poprzez regulację przepuszczalności błon dla jonów sodu) (1, 3).

Z wiekiem nasila się wapnienie tkanek miękkich szczególnie w miejscach, gdzie toczą się procesy zapalne. Przykładem tego może być zwapnienie blaszki miażdżycowej, będące główną przyczyną jej niestabilności (6). Istnieją mechanizmy hamujące pozakostne wytrącanie się fosforanów wapnia i zapobiegające kalcyfikacji w układzie naczyniowym. Ostatnio zidentyfikowano szereg zarówno lokalnych, jak i układowych inhibitorów wapnienia, takich jak osteoprotegereyna - rozpuszczalny receptor z nadrodziny TNF, czynnik hamujący powstawanie osteoklastów, czy też białko MGP (białko macierzy zawierające reszty kwasu glutaminowego). Jak wykazano, zaburzenia funkcji tych czynników mogą

WAPŃ CAŁKOWITY	
Surowica lub osocze	2,1-2,6 mmol/l
Mocz dobowy - kobiety (dieta normalna)	< 6,5 (8)* mmol/24 h
Mocz dobowy - mężczyźni (dieta normalna)	< 7,5 (10)* mmol/24 h
Mocz dobowy (dieta ubogowapniowa)	< 4,0 (5)* mmol/24 h
WAPŃ ZJONIZOWANY W ODNIESIENIU DO PH=7,4	
Surowica lub osocze	1,15-1,32 mmol/l

* wartości graniczne

przyczyniać się do zwiększonej umieralności chorych ze schyłkową niewydolnością nerek, cukrzycą oraz chorobą sercowo-naczyniową (7).

W regulacji stężenia wapnia w organizmie uczestniczą głównie parathormon (PTH), kalcitriol i kalcytonina, w mniejszym stopniu TSH i wolna trijodotyronina (FT3), z narządów natomiast jelito, nerki i kości. Substancjami stymulującymi wchłanianie wapnia jest witamina $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, której synteza pobudzana jest przez PTH, hormon wzrostu i TSH oraz niskie stężenie wapnia w surowicy. Rola PTH polega również na zwiększeniu resorpcji wapnia w kanalikach dystalnych. W tkance kostnej PTH i kalcitriol zwiększają uwalnianie wapnia, natomiast kalcytonina obniża resorpcję wapnia z kości przez hamowanie aktywności osteoklastów (3,5) (rys.).

W surowicy wapń występuje w trzech formach: jako wapń zjonizowany (46%), w kompleksach z dwuwodorowęglanami, fosforanami, cytrynianami i siarczanami (10%) oraz w połączeniu z białkami, głównie z albuminą (44%). Frakcją aktywną biologicznie jest wapń zjonizowany, którego stężenie jest regulowane przez PTH i kalcitriol oraz zależy od pH i stężenia albumin (3).

Wartości prawidłowe stężenia wapnia w różnych materiałach biologicznych są następujące (2):

Ocena zasobów wapnia w organizmie

W badaniach rutynowych najczęściej oznacza się stężenie wapnia całkowitego w surowicy (metodami

kolorymetrycznymi) oraz dobowe wydalenie wapnia (8). Zaleca się równoczesne oznaczanie stężenia i wydalenia fosforu, stężenia albuminy, PTH i kalcytoniny oraz ocenę funkcji nerek (stężenia kreatyniny i klirens kreatyniny). W niektórych przypadkach dla diagnostyki hipokalcemii przydatne jest oznaczenie poziomu 1,25-OH witaminy D we krwi (3, 4).

Stężenie wapnia całkowitego nie zawsze odzwierciedla rzeczywisty stan gospodarki wapniowej w organizmie (2). U niemowląt po transfuzjach wymiennych, w czasie których wapń jest wiązany przez cytryniany w stanach zaburzeń ilości i składu białek osocza, w kwasicy, zaskowicy oraz w umiarkowanej nadczynności przytarczyc stężenia wapnia całkowitego, mimo istniejących zaburzeń homeostazy wapniowej, mogą pozostać w granicach wartości prawidłowych (2,8). W tych przypadkach szczególne znaczenie ma pomiar wapnia zjonizowanego. Aby określić poziom wapnia zjonizowanego w oparciu o oznaczony poziom wapnia całkowitego, należy uwzględnić zmiany stężenia albuminy w surowicy i nagłe zmiany pH krwi. Podwyższone stężenie albuminy prowadzi do spadku stężenia wapnia zjonizowanego. Przy pH 7,4 około 46% wapnia całkowitego występuje w formie zjonizowanej. Gdy pH gwałtownie wzrośnie, to pula wapnia zjonizowanego obniża się. Efekt ten jest spowodowany zwiększonym tworzeniem się kompleksów wapnia z białczanami i innymi anionami w warunkach obniżonego stężenia jonów wodorowych. Kwasica obniżając wiązanie wapnia z albuminą zwiększa stężenie wapnia zjonizowanego (2, 3, 8). Pomiar bezpośredni

wapnia zjonizowanego jest wykonywany we krwi pełnej, pobranej beztlenowo do strzykawki zawierającej heparynę zrównoważoną jonami wapnia, przy wykorzystaniu elektrody jonoselektywnej (8).

Hiperkalcemia

Do najczęściej spotykanych czynników wywołujących hiperkalcemię należy pierwotna nadczynność przytarczyc i choroba nowotworowa. Pacjenci z pierwotną nadczynnością przytarczyc mają na ogół umiarkowanie podwyższony poziom wapnia i obniżony poziom fosforu, które mogą utrzymywać się przez całe lata, nie dając żadnych objawów chorobowych. Konsekwencją umiarkowanej hiperkalcemii może być jednak kamica nerkowa. Poziom PTH w tej grupie chorych jest podwyższony. Natomiast chorzy z hiperkalcemią o podłożu nowotworowym poza objawami typowymi dla choroby podstawowej mają obniżone lub nieoznaczalne stężenie PTH. W większości tych przypadków hiperkalcemia jest następstwem sekrecji białka PTHrP (PTH related peptide), a więc jego oznaczenie może być pomocne w diagnostyce różnicowej. Wyjątek stanowią chorzy z nowotworem przytarczyc (3). Niektóre rodzaje nowotworów przytarczyc wydzielają substancje aktywujące resorpcję kości lub też nasilające hydroksylację 25-OH witaminy D w 1,25 OH witaminę D, co prowadzi do hiperwitaminozy D (3).

Inne, rzadziej występujące przyczyny hiperkalcemii to:

- zaburzenia endokrynologiczne
- długotrwałe unieruchomienie prowadzące do nasilenia resorpcji kości
- niewydolność nerek
- żywienie pozajelitowe
- nadmierne wchłanianie wapnia z przewodu pokarmowego, np. hiperwitaminoza D i A
- stosowanie leków moczopędnych (2,3).

Objawy kliniczne świadczące o nadmiarze wapnia w organizmie mogą pochodzić ze strony:

- nerek (wielomocz, zakwaszenie moczu, kamica nerkowa)
- przewodu pokarmowego (nudności, wymioty, zaparcia)
- serca (tachykardia)
- układu nerwowego (depresja, senność) (1).

W przypadku pierwotnej nadczynności przytarczyc leczeniem z wyboru jest usunięcie chirurgiczne gruczolaka, produkującego PTH w sposób niekontrolowany i niezależny od poziomu wapnia we krwi. W innych przypadkach podstawą jest leczenie choroby zasadniczej lub leczenie objawowe.

Hipokalcemia

Przyczyny powodujące hipokalcemię można podzielić na trzy grupy:

- niedobór PTH
- niedobór witaminy D
- inne.

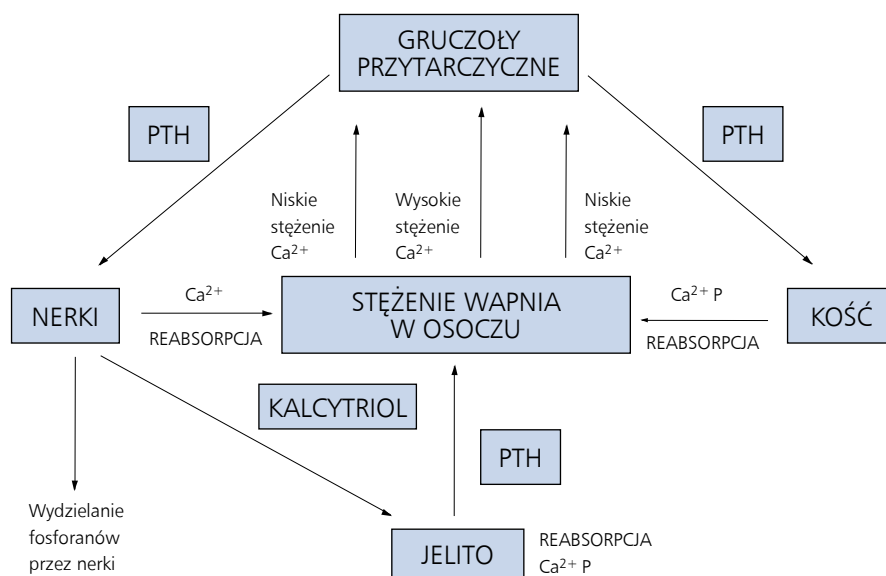
Niedobór PTH może wystąpić przejściowo po operacjach tarczycy i usunięciu gruczolaka przytarczyc i prowadzić nawet do klinicznych objawów tężyzki. W tych przypadkach doraźnie podaje się preparaty wapnia oraz metabolity witaminy D aż do przejęcia czynności wydzielniczych przez pozostałe gruczoły trzyparczowe.

Hipokalcemia może być również efektem pierwotnej niedoczynności przytarczyc (brak regulacji stężenia wapnia przez PTH). Kolejną przyczynę stanowi niedostateczne wchłanianie wapnia spowodowane niedoborem witaminy D, mające miejsce w zespołach złego wchłaniania, a także w niedożywieniu.

Hipokalcemia może być też wynikiem niewydolności nerek (nadmierna utrata w zespołach nerczycowych) i marskości wątroby (obniżenie stężenia albuminy). Zwykle towarzyszy jej podwyższony poziom fosforu we krwi oraz hipomagnezemia (1, 2, 3, 4, 8). Przewlekły niedobór wapnia może ujawniać się w postaci

zwiększonej łamliwości włosów i paznokci (8). Niski poziom wapnia we krwi jest przyczyną drażliwości, nerwowości, nadmiernej wrażliwości, pobudliwości (5). Długotrwała hipokalcemia może być także przyczyną de-

presji, zawrotów głowy nawet z utraty przytomności (8). U dzieci przewlekły niedobór wapnia może prowadzić do niedorozwoju umysłowego i zahamowania wzrostu oraz krzywicy. (1).



Regulacja stężenia wapnia w osoczu.

Piśmiennictwo:

1. Kokot F.: Choroby wewnętrzne. PZWL, Warszawa 2000, 1080-1084.
2. Neumeister B., Besenthal I., Liebich H.: Diagnostyka laboratoryjna. Urban & Partner, Wrocław 2003, 178-180.
3. Poznańska-Linde H., Odrowąż-Sypniewska G.: Wybrane zagadnienia z diagnostyki laboratoryjnej. AM Bydgoszcz 2000, 141-143, 145-146.
4. Selby P.: Hypercalcemia. Clinical Medicine 2003, 3, 19-22.
5. Tilton R.C., Balows A., Hohnadel D.C., Reiss R.F.: Clinical Laboratory Medicine. Mosby-Year Book, St. Louis 1992, 136-137, 140.
6. Abedin M., Tintut Y., Deser L.L.: Vascular calcification: mechanisms and clinical ramifications. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2004, 24, 172.
7. Ketteler M., Westenfeld R., Schlieper G., Brandenburg V., Floege J.: Missing inhibitors of calcification. Pediatr. Nephrol. 2005, 20, 383-8.
8. Tomaszewski J. Diagnostyka laboratoryjna. PZWL, Warszawa 2001, 50, 199-201.

mgr Agnieszka Pater
prof. dr hab. n. med. Grażyna Odrowąż-Sypniewska
mgr Marzenna Gruszka

*Katedra i Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej Collegium Medicum
im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu
e-mail: kizdiagn@cm.umk.pl*

MATERIAŁY INFORMACYJNE - HORIBA ABX

CZYNNIK REUMATOIDALNY

Wraz z rozwojem wiedzy wzrasta liczba chorób, których powstawanie przypisuje się procesom autoimmunologicznym. Takimi chorobami są cukrzyca, miażdżyca i inne. Jednak do ich rozpoznania nie są jeszcze rutynowo wykorzystywane oznaczenia odpowiednich autoprzeciwciał. Do chorób, do rozpoznania i różnicowania których w sposób zasadniczy przyczynia się obecność przeciwciał skierowanych przeciwko własnym antygenom, zalicza się schorzenia uogólnione, takie jak toczeń trzewny układowy (SLE), pierwotny zespół Sjögrena, twardzina uogólniona (sclerodermia), zapalenia mięśniowe, a także reumatoidalne zapalenie stawów (RZS). We wszystkich tych jednostkach występują podobne, nakładające się objawy, a procesy zapalne i zwłóknieniowe prowadzą do uszkodzenia narządów i tkanek.

Najczęściej spotykaną chorobą układową z autoimmunizacji jest reumatoidalne zapalenie stawów, którego pierwotną manifestacją kliniczną są symetryczne zmiany w stawach rąk i nóg. Choroba ma charakter przewlekły z występującymi okresowo ostrymi epizodami zapalnymi i prowadzi do postępującego zniekształcenia stawów. Większość chorych spełnia przynajmniej 4 z 7 kryteriów rozpoznawczych, ustalonych przez American College of Rheumatology. Obok kryteriów klinicznych i radiologicznych laboratoryjnym kryterium diagnostycznym jest obecność czynnika reumatoidalnego w surowicy (RF). Czynnikiem ten to przeciwciało skierowane przeciwko fragmentowi Fc ludzkiej lub zwierzęcej IgG. W związku z tym IgG są wykorzystywane jako antygen w metodach oznaczeń RF.

Klasyczną metodą wykrywania RF jest odczyn Waaler-Rosiego, polegający na biernej hemaglutynacji erytrocytów

opłaszczonych króliczą IgG w obecności badanej surowicy. Inne stosowane metody jakościowe lub półilościowe oparte są na aglutynacji erytrocytów opłaszczonych antygenem cząstek lateksu. Metody znane jako „szkiełkowe” są obecnie dostępne również na wielu analizatorach biochemicznych jako metody turbidymetryczne. Przyjęto, że jeżeli odsetek wyników fałszywie dodatnich, uzyskanych przy pomocy danej metody w populacji zdrowej, nie przekracza 5%, to spełnia ona wymagania międzynarodowe.

Do różnicowania klas przeciwciał stosowane są metody typu ELISA, aczkolwiek izolowane przeciwciała IgG i IgA bez IgM występują u bardzo niewielu chorych i oznaczenia te w praktyce nie dostarczają istotnych informacji.

Problem metodyczny stanowią wyniki fałszywie ujemne, które spotyka się szczególnie przy wysokich wartościach. Jest to spowodowane zarówno efektem blokowania reakcji przez obecne w surowicy IgG, jak również zjawiskiem nadmiaru antygeny. Sam RF natomiast jest jednym z ważnych czynników interferujących w metodach immunologicznych oznaczeń różnych przeciwciał (np. anty-HIV).

Czynnik reumatoidalny stwierdza się u 70-90% chorych na RZS, ale jego brak nie wyklucza rozpoznania, szczególnie przy jednorazowym oznaczeniu. RF nie jest przeciwciałem swoistym dla RZS. Występuje również w innych chorobach systemowych: u 15-35% chorych z SLE, 50-60% w mieszanych chorobach tkanki łącznej, a także w infekcjach wirusowych, takich jak zakażenia EBV, CMV, HIV czy wirusami hepatotropowymi oraz w mieszanych kriglobulinemiach typu 2. Procent dodatnich wyników rośnie u osób zdrowych

po 70. roku życia nawet do 25%, tak więc przy braku objawów klinicznych wartość diagnostyczna RF w tej grupie wiekowej jest ograniczona.

Za punkt odcięcia przyjmuje się wartości od 10 do 18 IU/ml, w zależności od metody. Dla RZS bardziej typowe są wysokie stężenia, a także reaktywność zarówno z ludzkimi, jak i króliczymi IgG w teście Waaler-Rosego i testach aglutynacyjnych. Wysokie wartości są również złym wskaźnikiem prognostycz-

nym w odniesieniu do destrukcji stawów. RF maleje w wyniku leczenia, ale nie wykazano ścisłych korelacji pomiędzy jego stężeniem a stanem klinicznym chorego.

RF jest oznaczany w surowicy, w płynie stawowym, a także w płynie opłucnowym; wykrywa się go w innych stanach zapalnych, np. w bakteryjnym zapaleniu płuc (40%), w wysiękach nowotworowych i gruźliczych.

HORIBA ABX wśród szerokiego panelu testów (lista) do oznaczania białek specyficznych na analizatorze PENTRA 400 oferuje również test do ilościowego pomiaru RF w surowicy. Oznaczenie wykonywane jest metodą immunoturbidymetryczną ze wzmocnieniem lateksem. Do oznaczenia używa się 5 µl próbki surowicy. Zakres pomiarowy wynosi od 4 IU/ml do 120 IU/ml, a przy automatycznym rozcieńczeniu do 1200 IU/ml. Do wartości 285 IU/ml nie występują niepożądane reakcje związane z nadmiarem antygeny.

BIAŁKA SPECYFICZNE

Alfa 1-antytrypsyna
Apo A1
Apo B
ASO
C3c
C4c
Ceruloplazmina
hsCRP
Ferrytyna
Haptoglobina
HbA _{1c}
IgA
IgM
IgG
Kappa
Lambda
Mikroalbuminuria
Mioglobina
Orozomukoid
Prealbumina
Czynnik reumatoidalny
Transferyna

Lista testów do oznaczania białek specyficznych na analizatorze PENTRA 400.

PENTRA DX 120 - NOWA TECHNOLOGIA - KOMPLET BADAŃ HEMATOLOGICZNYCH NA JEDNEJ PLATFORMIE

PENTRA DX 120 - NEW TECHNOLOGY - DELIVERS A COMPLETE HEMATOLOGY PLATFORM

Pascal Berthet

Streszczenie

Pentra DX 120 umożliwia dużym laboratoriom zarówno wykonywanie badań hematologicznych, jak i zarządzanie nimi. Analizator pozwala na jednoczesny pomiar do 45 różnych parametrów i zarządzanie zintegrowanymi danymi. Wykorzystano w nim nową technologię zwaną podwójną matrycą optyczną do różnicowania leukocytów (Double Diff Matrix), co umożliwia precyzyjne rozpoznawanie patologii hematologicznych. Pentra DX 120 w połączeniu z nowym modulem SPS Evolution do automatycznego przygotowywania i barwienia rozmazów oraz stacją walidacji (Expert Validation Station) zapewnia uzyskanie pełnych danych i zarządzanie próbką.

Słowa kluczowe

Pentra DX 120, nowa technologia w hematologii.

Summary

With the Pentra DX 120, HORIBA ABX Diagnostics provides busy laboratories with an invaluable tool for complete hematology workflow management. Main features include its capacity to measure up to 45 different parameters per analysis and integrated data management including the new Double Diff Matrix technology enabling detailed diagnosis of hematology pathologies. It integrates with the new SPS Evolution automatic slide preparation and staining module and the Expert Validation Station offering complete information and sample management.

Keywords

Pentra DX 120, new technology in hematology.

Wstęp

W ramach serii nowości HORIBA ABX wprowadziła pierwszy analizator hematologiczny przeznaczony zarówno do diagnostyki, jak i badań przesiewowych. Pentra DX 120 (rys. 1) została zaprojektowana tak, aby mogła sprostać potrzebom wszystkich laboratoriów zapewniając możliwość wykonania kompletu badań hematologicznych. Przy pomiarze 45 parametrów Pentra DX 120 nie tylko podaje dane liczbowe i identyfikuje poszczególne linie komórkowe dla potrzeb rutynowych, ale również umożliwia ocenę różnych stadiów hemopoezy dla potrzeb klinicznych. Aby zminimalizować pracę manualną i skrócić czas wydania wyniku, w przypadkach, gdy wyniki znajdują się poza zakresem wartości prawidłowych, analizator powtarza badania automatycznie. Funkcja ta nosi nazwę re-run.

Wydajność analizatora wynosi 120 próbek na godzinę. Ma on również zintegrowaną stację walidacji

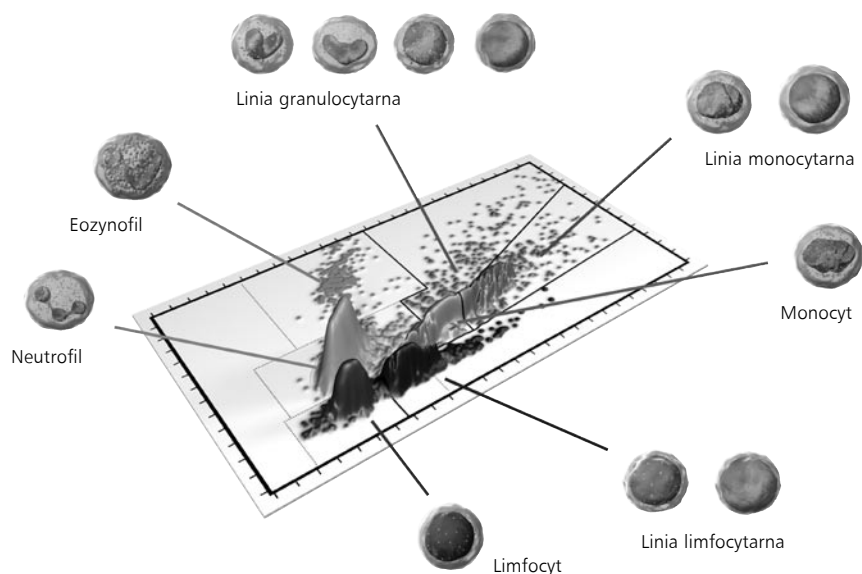
wykorzystywaną do monitorowania danych i kontroli jakości. Dalsza automatyzacja polega na przyłączeniu integralnego modułu SPS Evolution do barwienia preparatów.

Podwójna matryca optyczna dla oceny leukopoezy

W celu różnicowania trzech linii komórkowych układu białokrwinkowego Pentra DX 120 wprowadza zupełnie nową technologię - podwójną matrycę optyczną



Rys. 1. Analizator Pentra DX 120 z modulem do automatycznego przygotowywania rozmazów (SPS Evolution) do różnicowania krwinek i oceny ich populacji.



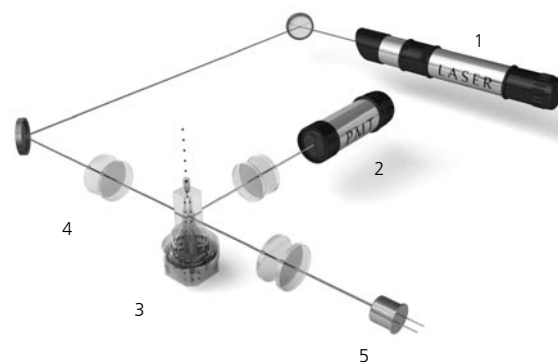
Rys. 2. Ocena leukopoezy przy zastosowaniu podwójnej matrycy optycznej (Double Diff Matrix).

(Double Diff Matrix) ^{*1}, pozwalającą na subklasyfikację wszystkich prekursorów krwinek białych w oparciu o cytometrię przepływową ^{*2} i metody cytochemiczne ^{*3}. Umożliwia to podanie wartości procentowych i bezwzględnych niedojrzałych granulocytów (Immature Granulocytic - IMG), niedojrzałych monocytów (Immature Monocytic - IMM) oraz niedojrzałych limfocytów (Immature Lymphocytic - IML) (rys. 2).

Uzyskane wyniki wykazują dobrą korelację z charakterystyką morfologiczną tych komórek, uzyskaną w badaniu mikroskopowym zabarwionych rozmazów krwi. Dodatkowo Pentra DX 120 umożliwia automatyczną ocenę nieprawidłowości morfologicznych limfocytów (ALY).

Parametry mierzone przez nowy typ analizatora są bardzo dobrym wskaźnikiem patologii, które dotychczas

były wykrywane głównie w obrazie mikroskopowym. Dzięki temu możliwe jest ograniczenie liczby ocen



1. Laser argonowy
2. Fotopowielacz
3. Cytometr przepływowy
4. Pomiar impedancji
5. Pomiar optyczny

Rys. 3. Schemat systemu optycznego cytometrii przepływowej analizatora Pentra DX 120.

^{*1} W analizatorze Pentra DX 120 zastosowano dobrze znaną technologię różnicowania cytochemicznego opracowaną przez HORIBA ABX. Do wybarwiania krwinek białych używa się czerni chlorazolowej E (Chlorazole Black E). Stopień wybarwienia, struktura komórkowa i objętość krwinek są odkładane na podwójnej matrycy optycznej. Rozszerzone spektrum pomiaru optycznego pozwala na klasyfikację dużych niedojrzałych krwinek: granulocytów, monocytów i limfocytów w przypadku ich obecności w badanym materiale. Zastosowana technologia umożliwia lekarzowi uzyskanie dokładnych informacji na temat patologii hematologicznych.

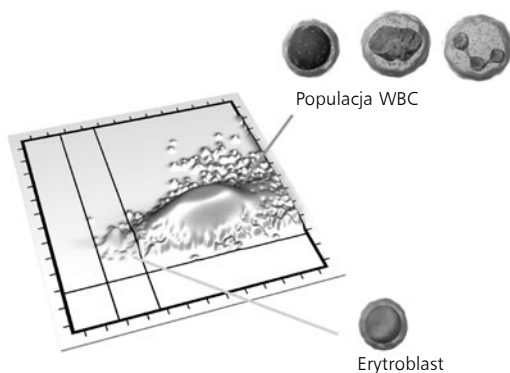
^{*2} Próbką jest przygotowywana w cytometrze przepływowym z wykorzystaniem systemu podwójnego hydroogniskowania sekwencyjnego (patent HORIBA ABX), a cechy komórki są określane poprzez pomiar absorbancji światła polichromatycznego lub fluorescencji (fluorymetr argonowo-lasery) (rys. 3).

^{*3} Próbką jest inkubowana w określonej temperaturze, a komórki wybarwiane czernią chlorazolową, mającą szczególne powinowactwo do cytoplazmy leukocytów oraz ziarnistości i jąder.

mikroskopowych i przyspieszenie podjęcia decyzji diagnostycznej. Dla przykładu można podać, że parametry są pomocne we wstępnej klasyfikacji przypadków ostrej białaczki.

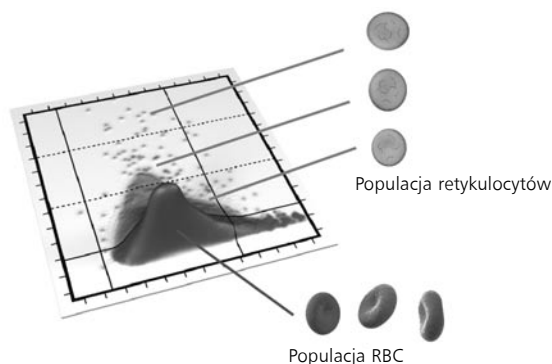
Pełna analiza erytropoezy

Pentra DX 120 monitoruje erytropoezę w oparciu o trzy różne kanały pomiarowe dla erytroblastów, erytrocytów i retikulocytów. Zostało to osiągnięte dzięki opatentowanemu systemowi DHSS^{*4} i fluorocyto-metrii. Prekursory erytrocytów - erytroblasty są zliczane automatycznie przy zastosowaniu metody używanej do oznaczeń retikulocytów. Krew jest preinkubowana w odczynniku HORIBA ABX Leucodiff w celu lizy erytrocytów, a następnie inkubowana w odczynniku Fluocyte (fluorochrom zawierający oranż tiazolowy, barwiący DNA i RNA) w celu wybarwienia pozostałości jąder. Pomiar jest dokonywany metodą fluorocyto-metrii z zastosowaniem lasera argonowego. Na matrycy erytroblasty (ERB) są oddzielane od zrzębu krwinek czerwonych, płytek i krwinek białych. Podawana jest również optyczna liczba leukocytów w celu umożliwienia automatycznej korekty liczby krwinek białych po uwzględnieniu erytroblastów (rys. 4).



Rys. 4. Liczenie erytroblastów z zastosowaniem fluorescencji.

^{*4} System podwójnego hydroogniskowania sekwencyjnego (DHSS) stanowi opatentowaną technologię, umożliwiającą oznaczenie 26 podstawowych parametrów morfologii krwi (CBC) wraz z różnicowaniem leukocytów (DIFF).



Rys. 5. Klasyfikacja dojrzałości retikulocytów zgodnie z klasyfikacją Heilmeyera.

Liczba erytroblastów jest przydatna w diagnostyce niedokrwistości, chorób nowotworowych, znajduje również zastosowanie w diagnostyce pediatrycznej. Kolejnym parametrem o dużym znaczeniu dla monitorowania niedokrwistości oraz potwierdzenia procesów regeneracyjnych szpiku jest liczba retikulocytów. Dla pełnej interpretacji obrazu - poza całkowitą liczbą retikulocytów - istotne jest również określenie stopnia ich dojrzałości. Zgodnie z klasyfikacją Heilmeyera wyróżnia się kilka subpopulacji, opartych na zawartości RNA (RETH, RETM, RETL). Wykorzystując odczynnik Fluocyte, powodujący fluorescencję w zależności od zawartości RNA Pentra DX 120 jednocześnie określa 10 parametrów i klasyfikuje retikulocyty zgodnie z powyższymi zasadami (rys. 5).

Dodatkowe parametry oznaczane przez Pentra DX 120 to: MRV (określa średnią objętość retikulocyta), która jest użyteczna w diagnozowaniu niedokrwistości z niedoboru żelaza, zaś CRC (skorygowana ilość retikulocytów) określa intensywność erytropoezy szpikowej.

Zintegrowany automatyczny moduł do przygotowywania i wybarwienia rozmazów

Kolejną innowacją zastosowaną w analizatorze Pentra DX 120 jest moduł SPS, automatycznie przygotowujący i wybarwiający mikroskopowe preparaty hematologiczne.

Metody referencyjne.

METODY REFERENCYJNE	CBC (MORFOLOGIA PODSTAWOWA)	RÓŻNICOWANIE	RETYKULOCYTY	ERYTROBLASTY
Impedancja	tak	tak	tak	tak
Cytometria przepływowa		tak	tak	tak
Fluorymetria			tak	tak
Cytochemia		tak		tak
DHSS		tak	tak	tak

Moduł ten w znacznym stopniu ułatwia pracę, skraca czas wydania wyników, a także zwiększa bezpieczeństwo operatora poprzez ograniczenie jego czynności manualnych i eliminację bezpośredniego kontaktu z aerozolem powstałym przy otwieraniu próbki. Wszystkie preparaty są opatrzone kodem kreskowym i danymi pacjenta, co umożliwia prawidłową identyfikację. Wydajność modułu wynosi 120 preparatów na godzinę.

SPS stosuje technologię wykonywania rozmazów z zachowaniem stałych parametrów, jak szybkość i kąt wykonywania rozmazu. Co więcej profil wykonywania rozmazu może być przystosowany do potrzeb laboratorium. Po wykonaniu i wysuszeniu rozmaz jest wybarwiany zgodnie z protokołem, a następnie przenoszony do odpowiedniego statywu. Rozmazy wykonane automatycznie po wysuszeniu mogą być wyłączone z automatycznego procesu barwienia i poddane barwieniu manualnemu. Z drugiej strony rozmazy wykonane manualnie również mogą być włączone w proces barwienia automatycznego.

Automatyczna walidacja

Pentra DX 120 jest zintegrowana ze stacją walidującą (Expert Validation Station), która została zaprojektowana w celu dostarczenia pełnej informacji i zapewnienia bezpośredniej komunikacji z operatorem. Dzięki tej opcji można w czasie realnym zidentyfikować próbki wymagające dalszej diagnostyki. Funkcja reflex testing pozwala w przypadkach próbek patologicznych na

automatyczne wykonanie dodatkowych testów, takich jak oznaczenie retikulocytów czy jądrzastych krwinek czerwonych (NRBC) zgodnie z protokołem, który uprzednio został zaakceptowany przez laboratorium. System można zaprogramować zgodnie z potrzebami. W przypadkach wyników mieszczących się w zakresie zaprogramowanych wartości prawidłowych stacja dokonuje automatycznej autoryzacji.

Dalsze możliwości to manualne wprowadzenie zlecenia wykonania dalszych testów i umożliwienie uzyskania informacji na podstawie atlasu znajdującego się w oprogramowaniu analizatora (HematoVision 4).

Wnioski. Konsolidacja badań hematologicznych

Nowa technologia - podwójna matryca optyczna do różnicowania leukocytów (Double Diff Matrix) w połączeniu z technologią DHSS oraz automatycznym przygotowywaniem i barwieniem rozmazów w sposób istotny poprawia interpretację wyników zwłaszcza w przypadkach próbek patologicznych. Możliwości, jakie oferuje analizator Pentra DX 120 dla diagnostyki zaburzeń hematologicznych, są trudne do przecenienia. Analizator umożliwia bowiem zarówno poprawę wydajności pracy i zarządzania próbkami, jak również identyfikację różnych etapów dojrzewania krwinek. Pentra DX 120 dzięki nowoczesnej technologii nie tylko wpływa na poprawę diagnostyki chorób hematologicznych, ale również przyczynia się do zwiększenia efektywności przepływu próbek.

Pascal Berthet
Horiba ABX

WYSYCENIE TRANSFERINY JAKO NOWY TEST WĄTROBOWY*D. Lloyd i wsp., Ann. Clin. Biochem. 2004, 41, 170-173*

Wysycenie transferyny (TFS) jest jednym z badań wykonywanych w celu oceny zasobów żelaza w ustroju. Autorzy angielscy opisali je również jako badanie, które powinno być wykonywane rutynowo u chorych z podwyższoną aktywnością aminotransferaz bez znanej przyczyny. W ciągu 29 miesięcy TFS wykonano u wszystkich chorych ze zleceniem oceny czynności wątroby, u których wartości ALAT przekraczały 50 IU. W przypadku, gdy wartość TFS na czczo przekraczała 50%, pacjent był poddawany badaniom genetycznym w kierunku hemochromatozy, która jest uważana za najczęstszą chorobę wieku dorosłego uwarunkowaną genetycznie. Jej głównym objawem jest uszkodzenie komórki wątrobowej z powodu przeładowania żelazem. Spośród próbek pobranych od 8770 osób w 194 stwierdzono podwyższone wysycenie transferyny, a spośród 66 pacjentów, u których przeprowadzono badania genetyczne, u 32 (48%) wykryto postacie homozygotyczne (C282Y). Spośród 68 pacjentów, u których skierowanie na badania genetyczne było oparte wyłącznie na danych klinicznych, C282Y stwierdzono tylko u 7, czyli u niespełna 10%. Autorzy badania również sugerują, że u chorych, u których jako test pierwszego rzutu zastosowano TFS, a dopiero później wykonano potwierdzające badania genetyczne, uszkodzenie komórki wątrobowej znajduje się we wczesnej, odwracalnej jeszcze fazie.

ŚLINA JAKO MATERIAŁ DO BADAŃ*Ph.A. Wilmarth i wsp., J. Proteome. Res. 2004, Oct.*

Od dawna wiadomo, że ślina może stanowić materiał do badań laboratoryjnych. Ostatnio obserwuje się wzmożone zainteresowanie wykorzystaniem jej do badań rutynowych, jak również przesiewowych, chociaż nie rozważa się możliwości zastąpienia oznaczeń wykonywanych w surowicy badaniami śliny. Przy pomocy chromatografii cieczowej i spektrometrii masowej Wilmarth i wsp. zidentyfikowali 102 białka obecne w ślinie zdrowego człowieka, z czego 67 występuje i w ślinie, i w surowicy, a pozostałe tylko w ślinie. Autorzy uważają, że musi upłynąć pewien czas, zanim metody stosowane do oznaczeń w ślinie zostaną równie dobrze opracowane jak metody badania surowicy. Niemniej wiele z nich znalazło już zastosowanie, m.in. test w kierunku HIV zatwierdzony w 2004 r. przez FDA (Food and Drug Administration), a także testy ciążowe i oznaczenia narkotyków. Popularyzacja oznaczeń w ślinie ma szczególnie duże znaczenie w krajach rozwijających się, gdzie możliwości dotarcia opieki medycznej, a tym bardziej wykonywania badań laboratoryjnych, są ciągle ograniczone. Powstaje pytanie, czy w przyszłości wystarczy polizać pasek testowy i przesłać go do laboratorium, aby uzyskać miarodajny wynik?

**CZY OZNACZENIA INTERLEUKINY-2 POMOGĄ W DIAGNOSTYCE PRZERZUTÓW
RAKA PIERSI DO WĘZŁÓW CHŁONNYCH?***www.fccc.edu*

IL-2 jest białkiem wpływającym na proliferację komórek T, które są kluczowymi regulatorami systemu immunologicznego. Na Kongresie Chirurgów Amerykańskich w październiku 2004 r. przedstawiono wyniki wstępnych badań przeprowadzonych w Chase Fox Cancer Center w Filadelfii na 60-osobowej grupie chorych. Z badań wynika, że chorzy, u których węzły chłonne zostały zajęte przez proces nowotworowy, mają krańcowo niskie stężenia IL-2. Zdaniem autorów stężenia IL-2 są związane właśnie ze stanem węzłów chłonnych. Jeżeli wynik zostanie potwierdzony na dużych populacjach, będzie to istotny krok w leczeniu raka piersi, w którym schemat terapii jest uzależniony właśnie od lokalnych zmian w węzłach.

CRP LEPSZYM CZYNNIKIEM PROGNOSTYCZNYM STENOZY NIŻ CHOLESTEROL

www.mamc.amedd.com

W doniesieniach z Kongresu Chirurgów Amerykańskich (październik 2004) stwierdzono, że stężenie CRP jest lepszym czynnikiem w prognozowaniu stenozы tętnicy szyjnej, a tym samym niedokrwienia i udaru mózgu, niż parametry lipidowe, w tym cholesterol LDL. Stężenie CRP jest markerem niestabilnej blaszki miażdżycowej, a prowadzone badania mają odpowiedzieć na pytanie, czy podwyższone CRP przy prawidłowym lub niskim stężeniu cholesterolu LDL może być pomocne w kategoryzacji pacjentów do operacji tętnicy szyjnej.

CRP W MONITOROWANIU LECZENIA STATYNAMI

N. Engl. J. Med. 2005, January

Kolejne badania potwierdzają rolę CRP w zapobieganiu chorobie wieńcowej. U 3745 pacjentów leczonych statynami stwierdzono, że oczekiwany efekt kliniczny może być osiągnięty przy jednoczesnym obniżeniu stężenia cholesterolu LDL i CRP. Najlepsze wyniki osiągnięto przy wartościach cholesterolu LDL poniżej 70 mg/dl, a CRP poniżej 2 mg/l.