

SPIS TREŚCI

- 3 Badania hematologiczne w diagnostyce anemii
towarzyszącej nowotworom
Hematological Analyses in the Diagnostics
of Cancer Related Anemia
Urszula Rychlik, Jan Kanty Kulpa
- 11 Średnia objętość retikulocyta (MRV) wyliczona przez analizator
HORIBA ABX Pentra 120/DX jako alternatywny parametr
do zawartości hemoglobiny w retikulocycie (CHR)
The mean reticulocyte volume (MRV) on the ABX Pentra 120/DX
as an alternativemeasurement to the reticulocyte
haemoglobin content (CHR™)
(material Horiba ABX)
- 12 Wartość oznaczeń immunoglobulin
w różnych grupach wiekowych
Immunoglobulins in different age groups
Alicja Kendziorek, Dagna M. Bobilewicz
- 18 Oksydatywnie zmodyfikowana albumina (IMA)
jako wskaźnik niedotlenienia mięśnia sercowego
Ischemia modified albumin (IMA)
as a marker of myocardial hypoxia
Jerzy W. Naskalski
- 24 Ocena proteinurii w przypadkowych porcjach moczu
Measurements of proteinuria on random urine samples
Dagna M. Bobilewicz
- 27 Warto wiedzieć

Wydawca IN VITRO EXPLORER

HORIBA ABX Sp. z o.o.

Wał Miedzeszyński 598, 03-994 Warszawa

+48 022 673 20 22, +48 022 673 20 26

www.horiba-abx.com.pl

Redaktor koordynujący: dr Beata Olszewska

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

Redakcja: Maria Domagała, Marta Domagała

Projekt graficzny: Aleksandra Król

Skład i łamanie: Zych Studio

ISSN 1732-9752

Nakład: 2000 egz.

czerwiec 2006

Zasady publikowania prac w IN VITRO EXPLORER

do wglądu u dr. Beaty Olszewskiej

e-mail: bolszewska@pl.abx.fr

BADANIA HEMATOLOGICZNE W DIAGNOSTYCE ANEMII TOWARZYSZĄCEJ NOWOTWOROM

HEMATOLOGICAL ANALYSES IN THE DIAGNOSTICS OF CANCER RELATED ANEMIA

Urszula Rychlik, Jan Kanty Kulpa

Streszczenie

Anemia jest powikłaniem często spotykanym u chorych na nowotwory złośliwe. Zaburzenia równowagi pomiędzy procesami wytwarzania i eliminacji erytrocytów, powodując przewagę tych ostatnich, prowadzą do rozwoju hipoksji. Ograniczenia w dostępie tlenu są jednym z czynników stymulujących uzyskiwanie przez komórki nowotworowe fenotypu inwazyjnego, a równocześnie sprzyjają rozwojowi oporności na promieniowanie jonizujące oraz na szereg cytostatyków stosowanych w leczeniu chorych na nowotwory. W praktyce klinicznej wyniki oznaczeń stężenia hemoglobiny są podstawowym wskaźnikiem stosowanym w diagnostyce i klasyfikacji anemii. Jednak nie pozwalają na określenie typu morfologicznego ani przyczyn, które prowadzą do rozwoju anemii u chorych na nowotwory. Automatyczne analizatory hematologiczne pozwalają na bezpośredni pomiar, względnie wyliczenie szerokiego spektrum wskaźników hematologicznych. Parametry dotyczące wielkości krwinki czerwonej, stężenia/zawartości w niej hemoglobiny, liczby retikulocytów, stopnia ich dojrzałości, rozmiaru i poziomu hemoglobiny w retikulocycie stają się wskaźnikami coraz częściej wykorzystywanymi we współczesnej diagnostyce różnicowej niedokrwistości, a także w monitorowaniu jej leczenia. Należy jednak zdawać sobie sprawę, że dla bardziej wnikliwej charakterystyki anemii i efektywnego różnicowania jej różnych typów badania hematologiczne muszą być uzupełnione badaniami biochemicznymi, szczególnie wskaźników dotyczących gospodarki żelazem czy endogennego poziomu erytropoetyny.

Słowa kluczowe

analizatory hematologiczne, retikulocyty, anemia towarzysząca nowotworom, funkcjonalny niedobór żelaza.

Summary

Anemia is a common complication in patients with malignant tumors. Disturbed balance between the processes of erythrocyte production and elimination, with the predominance of the latter, leads to the development of hypoxia. Limited access to oxygen is one of the factors stimulating tumor cells to acquire the invasive phenotype, and at the same time promotes resistance to ionizing radiation as well as to some of cytostatics used in the treatment of cancer patients. In the clinical practice, the results of hemoglobin concentration determination constitute the basic index used in the diagnostics and classification of anemia. They do not however allow to determine the morphological type or causes leading to anemia development in patients with cancer. Automatic hematological analyzers allow direct measuring or calculation of a wide spectrum of hematological indices. The parameters concerning the MCV, MCH, MCHC, number of reticulocytes, their degree of maturity, CHr, become the indices more and more often used in the modern differential diagnostics of anemia and in monitoring its treatment. One should realize however, that in order to characterize anemia more specifically and to differentiate between its various types more effectively, hematological analyses must be combined with biochemical tests, particularly those determining iron metabolism or endogenous erythropoietin level.

Keywords

hematological analyzers, reticulocytes, cancer related anemia, functional iron deficiency.

Zarówno liczne badania przeprowadzane na doświadczalnych modelach zwierzęcych, jak również dane kliniczne wskazują, że właściwe utlenowanie tkanek jest niezbędne dla przebiegu wielu procesów metabolicznych. W prawidłowych tkankach ograniczenia dostępności tlenu mogą być w dość szerokim zakresie kompensowane – dzięki rozbudowanej sie-

ci naczyń krwionośnych – wzmożoną perfuzją lub adaptacyjnym do zaistniałej sytuacji ograniczeniem nasilenia procesów metabolicznych.

Hipoksja ($pO_2 < 0,7$ mm Hg) nowotworu ma znacznie bardziej złożoną etiologię. Podaż tlenu do komórek uwarunkowana jest szybkością przepływu krwi i szybkością jego dyfuzji do komórek nowo-

tworowych. Charakterystyczne dla nowotworów deformacje struktury drobnych naczyń krwionośnych, chaotyczna angiogeneza oraz brak mięśni gładkich naczyń ograniczają dostępność tlenu do komórek nowotworowych, a z drugiej strony wiele z nich cechuje się wzmożoną aktywnością metaboliczną – tym samym zwiększonym zapotrzebowaniem na tlen. Ponadto wydłużenie odległości pomiędzy komórkami i naczyniami krwionośnymi (powyżej 70µm), jakie często ma miejsce w nowotworze, również przyczynia się do ograniczenia podaży tlenu (1).

Końcowym efektem ostrej lub przewlekłej, długotrwałej hipoksji jest zazwyczaj śmierć komórki. Komórki nowotworowe w odpowiedzi na bodziec hipoksji mogą natomiast uzyskiwać fenotyp inwazyjny, co wiąże się ze zmianami przebiegu procesów proliferacji, angiogenezy, apoptozy, a także szeregu procesów metabolicznych. Wiele faktów pozwala przypuszczać, że hipoksja nie tylko prowadzi do zmian proteomu komórkowego, ale może również być odpowiedzialna za progresję nowotworu w następstwie nasilających się zmian struktury i/lub funkcji wielu genów.

W praktyce klinicznej wykładnikiem obecności hipoksji jest spadek stężenia hemoglobiny, będącej podstawowym nośnikiem tlenu w ustroju; przy jej udziale do tkanek i komórek dostarczane jest ok. 97% tlenu. W warunkach fizjologicznych podstawową rolę w utrzymaniu właściwego stężenia hemoglobiny, a tym samym w prawidłowej dystrybucji tlenu do tkanek, przypisuje się utrzymaniu równowagi pomiędzy procesami wytwarzania i eliminacji erytrocytów. Zaburzenia tej równowagi w kierunku przewagi procesów eliminacji erytrocytów leżą u podstaw rozwoju niedokrwistości.

Anemia jest powikłaniem często spotykanym u chorych na nowotwory złośliwe. Zarówno częstość jej

występowania, jak i nasilenie wykazują znaczne zróżnicowanie w zależności od typu nowotworu, jego lokalizacji narządowej, stadium zaawansowania klinicznego choroby, a także czasu trwania. Do nowotworów, w których anemia spotykana jest relatywnie często – poza nowotworami krwi – zalicza się szpiczaka mnogiego, niezłośliwe chłoniaki, ale również raka płuca i raka jajnika. Szereg niekorzystnych objawów klinicznych, jakie spotyka się u chorych na nowotwory i jakie mają istotny wpływ na jakość ich życia: osłabienie odporności, objawy ze strony układu krążenia, układu oddechowego, ośrodkowego układu nerwowego, przewodu pokarmowego czy nerek – wiąże się właśnie z rozwojem anemii (2).

Równocześnie hipoksja, której wyrazem jest spadek stężenia hemoglobiny, może zmniejszać w sposób istotny efektywność leczenia przeciwnowotworowego. Spotykana u licznych chorych oporność na leczenie promieniowaniem jonizującym lub niektórymi cytostatykami wiązana jest m.in. z zahamowaniem wytwarzania w komórkach nowotworowych wolnych rodników w warunkach ograniczonej dostępności tlenu. Niepowstawanie (np. w wyniku oddziaływania promieniowania jonizującego z wodą komórkową) wolnych rodników hydroksylowych uznawane jest za podstawowy czynnik rozwoju oporności komórek nowotworowych na działanie promieniowania jonizującego lub cytostatyków, ponieważ przy braku wolnych rodników zmniejsza się prawdopodobieństwo uszkodzeń DNA komórek nowotworowych i zwiększa ich zdolność do naprawy (3). Wsuwa się też sugestie, że zmiany genomu i proteomu komórki w warunkach hipoksji mogą być pośrednią przyczyną rozwoju oporności na leki hamujące przebieg cyklu komórkowego (m.in. tak-sany, metotreksat) wskutek nagromadzenia się komórek w fazie spoczynkowej G₀. Z tych względów powszechnie uznaje się hipoksję za czynnik wpływa-

jący niekorzystnie na efektywność leczenia chorych i taki, który może sprzyjać rozwojowi przerzutów. Jego obecność może więc mieć istotne znaczenie dla rokowania (1).

Właśnie z tych względów anemia uznawana jest za jeden z podstawowych predyktorów niekorzystnego rokowania chorych na nowotwory, krótszego przeżycia bezobjawowego i całkowitego. Równocześnie nie można pominąć faktu, że zarówno promieniowanie jonizujące, jak i szereg cytostatyków stosowanych w leczeniu chorych na nowotwory może indukować rozwój anemii. Należy więc rozróżnić anemię towarzyszącą nowotworom od niedokrwistości rozwijającej się u chorych na nowotwory w następstwie radio- lub chemioterapii, ponieważ mogą być one wyraźnie inne w swoim obrazie.

Anemia towarzysząca nowotworom reprezentuje najczęściej cechy niedokrwistości normochromicznej i normocytowej, niekiedy z nieznaczną tendencją do hipochromii i mikrocytozy, ponadto charakteryzuje się obniżoną liczbą retikulocytów, zaburzeniami gospodarki żelazem, stężeniem erytropoetyny nieadekwatnym do stopnia nasilenia anemii. W swoim obrazie anemia spotykana u chorych na nowotwory (towarzysząca nowotworom) wykazuje wiele cech zbieżnych z niedokrwistością spotykaną w przebiegu przewlekłych infekcji i stanów zapalnych. Stąd często jedną i drugą określa się wspólnym mianem anemii chorób przewlekłych (*anemia of chronic disease – ACD*) (4, 5).

Często stosowana w praktyce klinicznej ocena nasilenia anemii wyłącznie na podstawie wyników oznaczeń stężenia hemoglobiny ma ograniczony charakter. Niskie stężenie hemoglobiny stanowi tylko potwierdzenie faktu obecności anemii, ale nie pozwala na określenie jej typu morfologicznego ani przyczyn, które prowadzą do jej rozwoju. Stosowanie skal nasilenia anemii wyznaczanych wyłącz-

nie na podstawie stężenia hemoglobiny w pewnej mierze wynikało z ograniczeń aparaturowych, które występowały we wcześniejszym okresie.

Postęp, jaki dokonał się w ostatnich latach, radykalnie zmienił tę sytuację. Dotyczy on zarówno wiarygodności wyników oznaczeń, jak i znacznego poszerzenia zakresu bezpośrednio mierzonych, a także wyliczanych wskaźników hematologicznych, wnoszących istotne informacje o charakterze anemii. Nastąpiła wyraźna poprawa dokładności i precyzji pomiarów podstawowych wskaźników hematologicznych (6). Na podstawie różnych programów kontroli jakości ocenia się, że dla współczesnych automatycznych analizatorów hematologicznych współczynniki zmienności w oznaczeniach liczby erytrocytów i stężenia hemoglobiny kształtują się poniżej 2%.

Współczesne kryteria klasyfikacji anemii opierają się w znacznej mierze na danych dotyczących rozmiarów krwinki czerwonej. Na podstawie wyników oznaczeń średniej objętości krwinki czerwonej (*mean corpuscular volume – MCV*) można dokonać podziału anemii na trzy kategorie: normocytową, mikrocytową i makrocytową, a ocena zawartości hemoglobiny w krwince (*mean corpuscular hemoglobin – MCH*) i jej stężenia (*mean corpuscular hemoglobin concentration – MCHC*) pozwala dokonać dalszego podziału na anemię hipochromiczną lub hiperchromiczną.

W stanach niedoboru żelaza może dochodzić do wytwarzania mikroerytrocytów z towarzyszącym stopniowym zużywaniem ustrojowych zapasów żelaza. Rozwija się tendencja do wzrostu anizocytozy, co znajduje swój wyraz we wzroście wskaźnika zmienności erytrocytów (*red cell distribution width – RDW*). Wzrost wskaźnika RDW uznawany jest za jeden z wczesnych i czułych wykładników nieprawidłowości w erytropoezie, cechuje go jednak niska

swoistość. Zmiany wartości RDW występują nie tylko w niedoborach żelaza, ale mogą być konsekwencją przewlekłej choroby (7).

Analiza liczby erytrocytów, wartości MCV, stężenia hemoglobiny oraz wartości RDW pozwala dokonać wstępnego różnicowania pomiędzy anemią chorób przewlekłych i z niedoborów żelaza a talasemią typu heterozygotycznego. W niektórych współczesnych analizatorach hematologicznych możliwy jest automatyczny pomiar hipochromicznych krwinek czerwonych (HYPO) i mikrocytów (MICRO), a także wyliczanie współczynnika MICRO/HYPO. W licznych pracach wykazano jego przydatność w diagnostyce różnicowej anemii z niedoborów żelaza (IDA) oraz talasemii; wartości tego wskaźnika niższe od 0,9 wskazują na niedobory żelaza, natomiast wyższe od jedności – na duże prawdopodobieństwo talasemii. Dla celów wczesnego wykrywania niedoboru żelaza czułość wskaźników opartych na wielkości erytrocytów oraz stężeniu/zawartości w nich hemoglobiny jest jednak ograniczona ze względu na czas życia erytrocytów w krążeniu, wynoszący średnio 120 dni (do zmian wartości MCV i RDW w następstwie niedoborów żelaza dochodzi dopiero po upływie dłuższego czasu).

W różnicowaniu różnych typów anemii w oparciu o badania szerokiego spektrum wskaźników hematologicznych współcześnie kluczową rolę przypisuje się wynikom oznaczeń liczby retikulocytów i parametrów charakteryzujących ich wielkość oraz stężenie w nich hemoglobiny. Rozwój metod fotometrii przepływowej znacząco poprawił precyzję pomiarów liczby retikulocytów w porównaniu do pomiarów z użyciem metod manualnych. Automatyczne oznaczenia ilościowe oparte są albo na pomiarach zmian natężenia fluorescencji barwników (oranż tiazolowy, auramina O i in.) albo absorpcji barwników (oksazyna 750, nowy błękit metylenowy) wchodzą-

cych w reakcję z RNA retikulocytów (8, 6). Intensywność zabarwienia jest wprost proporcjonalna do zawartości RNA w retikulocycie.

Badania tymi metodami mogą dostarczać dodatkowych informacji o rozkładzie intensywności zabarwienia w populacji retikulocytów i na tej podstawie umożliwiać ich różnicowanie na subklasy (najbardziej niedojrzałe retikulocyty charakteryzują się najwyższym natężeniem fluorescencji). Pierwszym wprowadzonym parametrem, opisującym stopień dojrzałości retikulocytów, był wskaźnik dojrzałości retikulocytów (*reticulocyte maturity index* – *RMI*), wyrażany w umownych jednostkach jako wartość średnia natężenia fluorescencji, odpowiadająca zawartości RNA w całej populacji retikulocytów. Na podstawie tych badań stało się możliwe tworzenie rozkładów retikulocytów w postaci dwuwymiarowych cytogramów, uwzględniających objętość komórki i stopień jej wybarwienia zależny od zawartości RNA. Pozwoliło to na wyróżnienie 3 frakcji w populacji retikulocytów:

- HFR (*high fluorescent reticulocytes*) – frakcja retikulocytów o największym natężeniu fluorescencji, zawiera najmłodsze retikulocyty o wysokiej zawartości RNA;
- MFR (*medium fluorescent reticulocytes*) – frakcja retikulocytów o średnim natężeniu fluorescencji;
- LFR (*low fluorescent reticulocytes*) – frakcja retikulocytów o niskim natężeniu fluorescencji, zawiera dojrzałe retikulocyty o niskiej zawartości RNA.

Badania Lesesve i wsp. sugerują, że w wyniku chemioterapii szybciej dochodzi do obniżenia frakcji HFR niż liczby retikulocytów i leukocytów. W stanach aplazji szpiku zawartość HFR i MFR może spadać do wartości bliskich zero przy względnie stałym poziomie liczby retikulocytów. Wykazano ponadto, że retikulocyty frakcji HFR jako pierwsze są uwalniane w czasie odnowy szpiku po chemioterapii

(maksymalny wzrost około 20. dnia od zakończenia chemioterapii, ze spadkiem do normalnego poziomu w ciągu kolejnych 7 dni), przed wzrostem liczby retikulocytów i leukocytów. Wskaźniki dojrzałości HFR i MFR ściśle korelują z aktywacją szpiku kostnego i mogą być dobrymi wskaźnikami aplazji szpiku, jak i wczesnymi wskaźnikami przyjęcia przeszczepu szpiku kostnego. Wykazano, że zarówno transfuzje krwi, jak i infekcje nie wpływają na zmiany w zawartości odsetkowej HFR.

Identyfikacja niedojrzałych retikulocytów może być pomocna dla potwierdzenia przyjęcia przeszczepu po transplantacji lub regeneracji szpiku po chemioterapii, szczególnie w przypadkach, gdy przy tych zabiegach dochodzi do rozwoju infekcji i poziom neutrofilii nie jest wiarygodnym wskaźnikiem (9). Retykulocyty frakcji HFR stanowią jednak tylko kilka procent całej puli krążących retikulocytów, które z kolei stanowią zaledwie 1% populacji erytrocytów w krwioobiegu. Stąd dokładne wyznaczenie HFR obarczone jest wysokim ryzykiem błędu.

W analizatorach najczęściej szacowany jest wskaźnik IRF (*immature reticulocyte fraction*), który określa odsetek młodych i średniodojrzałych retikulocytów, czyli HFR+MFR. Istotny problem przy wyznaczaniu wartości IRF sprawia trudność standaryzacji i brak korelacji pomiędzy wynikami uzyskiwanymi różnymi metodami opartymi na pomiarach natężenia fluorescencji. Kryteria przyjęte dla zdefiniowania IRF i jego referencyjnych zakresów są różne dla różnych analizatorów i stosowanych odczynników. Innym poważnym problemem, ograniczającym użyteczność IRF w badaniach klinicznych, jest brak stabilnych i dopuszczalnych kalibratorów oraz materiałów referencyjnych. Wiele prac sugeruje, że IRF jest wskaźnikiem o znacznej użyteczności diagnostycznej w ocenie anemii, jednak żadna z nich jak dotychczas nie dostarczyła przekonujących argumentów na rzecz wykorzystania wartości IRF

w diagnostyce różnicowej anemii. Chung-Che i wsp. w swojej pracy wykazali, że u chorych z anemią wartość $IRF < 0,23$ przemawia za brakiem lub obniżoną odpowiedzią szpiku kostnego (10).

Należy zaznaczyć, że dla bardziej wnikliwego poznania przyczyn anemii u chorych na nowotwory, jak i jej właściwego oraz efektywnego leczenia, badania hematologiczne wymagają uzupełnienia wynikami badań szeregu parametrów biochemicznych dotyczących gospodarki żelazem, a w przypadkach podawania rekombinowej erytropoetyny – także oznaczeń endogennego stężenia tego hormonu. U chorych na nowotwory złośliwe poddawanych radio- i chemioterapii ten zestaw badań powinien być poszerzony o dalsze badania biochemiczne, pozwalające na ocenę czynności nerek i wątroby. U chorych na nowotwory w trakcie rozwoju choroby często występuje deficyt żelaza, głównie w wyniku zaburzeń jego dystrybucji, niedoborów podaży i zwiększonego zapotrzebowania komórek nowotworowych na ten pierwiastek. W efekcie tych procesów może dochodzić u pacjentów do rozwoju niedokrwistości z niedoboru żelaza. Diagnostyka niedoboru żelaza przy nowotworach (głównie przewodu pokarmowego) opiera się w znacznej mierze na badaniach biochemicznych wskaźników metabolizmu żelaza, takich jak poziom żelaza, transferyny i jej wolnych receptorów w surowicy, wysycenie transferyny żelazem, stężenia ferrytyny.

A zatem precyzyjna ocena przyczyn anemii, jej charakteru i nasilenia wymaga kompleksowych badań i to zarówno pomiaru wskaźników hematologicznych, jak i biochemicznych. Jednakże Brugnara sugeruje, że istotne informacje dla diagnostyki niedoborów żelaza w następstwie wyczerpania jego ustrojowych zasobów mogą wnosić badania samych wskaźników hematologicznych (8). Zawartość hemoglobiny w retikulocycie (CHr) uznawana jest za wczesny wskaźnik odpowiedzi

na leczenie preparatami żelaza; jego wzrost obserwuje się już w 2 do 4 dni po dożylnym podaniu preparatów żelaza. Przy założeniu, że $Hb < 11g/dl$, poziom $CHr < 26pg$ wskazuje z dużym prawdopodobieństwem na niedobór żelaza jako przyczynę anemii. Mast i wsp. w swoich badaniach wykazali, że CHr jest lepszym wskaźnikiem dla oszacowania zapasów żelaza w szpiku kostnym w porównaniu do poziomu ferrytyny, wysycenia transferyny żelazem i wartości MCV , zwłaszcza u chorych z $MCV < 100fl$ (11). Pozwala on na wczesną identyfikację chorych, którzy nie odpowiadają na suplementację żelazem (pomimo doustnego leczenia utrzymuje się niski poziom CHr , który jest wskazaniem do dożylnej terapii żelazem). Wzrost poziomu CHr , $MCVr$ (średnia objętość retikulocyta) i $CHCHr$ (średnie stężenie hemoglobiny w retikulocytach) i ich normalizacja uznawane są za pierwszy wykładnik dobrej reakcji na leczenie ciężkich postaci anemii z niedoborów żelaza.

Trudny problem diagnostyczny stanowi różnicowanie pomiędzy anemią z rzeczywistego niedoboru żelaza a niedokrwistością związaną z funkcjonalnym niedoborem żelaza. Thomas i Thomas proponują użycie CHr i obecności erytrocytów hipochromicznych jako złotego standardu w diagnostyce anemii chorób przewlekłych i funkcjonalnego niedoboru żelaza (dla pacjentów z funkcjonalnym niedoborem żelaza $CHr < 28pg$ i $HYPO > 5\%$) (12). Jednak dopiero stężenia CHr komplementarnie z wynikami oznaczeń stężenia wolnych receptorów transferyny oraz ferrytyny i wartości wyliczanego stosunku stężenia rozpuszczalnych receptorów transferyny do logarytmu stężenia ferrytyny ($sTfR/ferrytyna$) stanowią układ pozwalający na wyróżnienie 4 kategorii anemii i zaburzeń gospodarki żelazem:

- prawidłowa erytropoeza – CHr i wskaźnik $sTfR/ferrytyna$ zawierają się w zakresach wartości prawidłowych (osoby zdrowe, anemia towarzysząca no-

wotworom, dializowani chorzy bez funkcjonalnego niedoboru żelaza);

- $CHr < 28pg$ i prawidłowy wskaźnik $sTfR/ferrytyna$ – funkcjonalny niedobór żelaza;

- CHr prawidłowy i wskaźnik $sTfR/ferrytyna$ powyżej wartości prawidłowych – obniżone zapasy żelaza przy prawidłowej erytropoezie (chorzy z nowotworami bez objawów anemii, chorzy bezpośrednio po rozpoczęciu leczenia preparatami żelaza, chorzy z ostrymi krwawieniami, anemią hemolityczną);

- $CHr < 28pg$ i wskaźnik $sTfR/ferrytyna$ powyżej wartości prawidłowych – niedobory magazynowe żelaza (głównie chorzy z anemią chorób przewlekłych, chorzy z anemią towarzyszącą nowotworom i objawami reakcji ostrej fazy).

Funkcjonalny niedobór żelaza może pojawiać się podczas leczenia anemii rekombinowaną ludzką erytropoetyną ($r-HuEPO$), która stymuluje erytropoezę, a także u chorych z nowotworami nerki z nasilonym endogennym wytwarzaniem tego hormonu. U tych ostatnich obserwuje się wytwarzanie retikulocytów o zmniejszonym $MCVr$ oraz spadek wartości stosunku $MCVr/MCV$, które są uznawane za pierwsze objawy funkcjonalnego niedoboru żelaza (12, 13).

Klasycznym przykładem niedoborów erytropoetyny jest anemia w następstwie przewlekłego uszkodzenia nerek. Spotykana jest ona relatywnie często m.in. u chorych ze szpiczakiem mnogim. Cechą wyróżniającą tych chorych jest prawidłowy poziom MCV (w 85% przypadków), niski $MCHC$ – średnio 30,9 g/dl (w 96% przypadków).

Postęp technologiczny i metodyczny, jaki dokonał się w ostatnich latach w zakresie badań hematologicznych, stworzył podstawy zarówno dla diagnostyki anemii u chorych na nowotwory, jak i monitorowania oraz wczesnej oceny efektywności jej leczenia preparatami rekombinowanej erytropoetyny. W praktyce klinicznej monitorowanie leczenia $r-HuEPO$ często

jeszcze opiera się na oznaczeniach stężenia hemoglobiny. Wzrost stężenia hemoglobiny w ciągu ok. 4 tygodni od rozpoczęcia terapii uznawany jest za wykładnik dobrej reakcji na leczenie, chociaż w tym czasie zmiany jej poziomu mogą być jeszcze niezbyt nasilone u chorych i nie w pełni adekwatne do stymulacji erytropoezy. Ponadto po przetoczeniach krwi stężenie hemoglobiny nie odzwierciedla aktywności erytropoezy. U chorych na nowotwory wzrost liczby retikulocytów $\geq 40 \times 10^9/l$ w 4. tygodniu leczenia r-HuEPO jest uznawany za wiarygodny predyktor odpowiedzi na leczenie. Wczesne zmiany w ilości retikulocytów u tych chorych – po 2 tygodniach od rozpoczęcia podawania r-HuEPO – mogą jednak odzwierciedlać uwalnianie niedojrzałych retikulocytów ze szpiku, a nie aktywację erytropoezy.

Wskaźniki niedojrzałości retikulocytów IRF czy HFR wykazują także zmiany podczas terapii r-HuEPO, ale uważa się, że raczej przemawiają one za wzrostem aktywności erytropoetycznej niż informują o zmianach metabolizmu żelaza.

Można oczekiwać, że dalszy postęp w zakresie technologii pomiarowych analizatorów hematologicznych i wdrożenie badań nowych wskaźników biochemicznych pozwolą na precyzyjną diagnostykę różnicową anemii towarzyszącej nowotworom i anemii rozwijającej się w następstwie leczenia promieniowaniem jonizującym lub chemioterapii. Badania te pozwolą na ocenę wczesnej reakcji chorych na leczenie rekombinowaną erytropoetyną, a tym samym w istotny sposób przyczynią się do optymalizacji tego leczenia.

Piśmiennictwo (wybór):

1. Varlotto J., Stevenson M.A.: Anemia, tumor hypoxemia, and the cancer patient. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 2005, 63, 25-36.
2. Blohmer J.-U., Dunst J., Harrison L. et al.: Cancer-related anemia: biological findings, clinical implications and impact on quality of life. *Oncology* 2005; 68 (Suppl. 1), 12-21.
3. Harrison L., Blackwell K.: Hypoxia and anemia: factors in decreased sensitivity to radiation therapy and chemotherapy? *Oncologist* 2004, 9 (Suppl. 5), 31-40.
4. Ludwig H., Fritz E.: Anemia in cancer patients. *Semin. Oncol.* 1998, 25 (Suppl. 7), 2-6.
5. Mercadante S.: Anemia in cancer: pathophysiology and treatment. *Cancer Treat. Rev.* 2000, 26 (4), 3003-311.
6. Buttarello M., Bulian P.B., Farina G. et al.: Flow cytometric reticulocyte counting. Parallel evaluation of five fully automated analyzers: an NCCLS-ICSH approach. *Am. J. Clin. Pathol.* 2001, 115, 100-111.
7. Hörl W.H.: Measurement of hypochromic red blood cells is not the first line procedure to identify the patient with iron deficiency. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1998, 13, 850-851.
8. Brugnara C.: Use of reticulocyte cellular indices in the diagnosis and treatment of hematological disorders. *Int. J. Clin. Lab. Res.* 1998, 28, 1-11.
9. Kuse R., Foures C., Jou J.M., d'Onofrio G. et al.: Automated reticulocyte counting for monitoring patients on chemotherapy for acute leukaemias and malignant lymphomas. *Clin. Lab. Haem.* 1996, 18 (Suppl.1), 39-43.
10. Chung-Che Ch., Kass L.: Clinical significance of immature reticulocyte fraction determined by automated reticulocyte counting. *Hematopathology* 1996, 108, 69-73.
11. Mast A.E., Blinder M.A., Lu Q., Flax S. et al.: Clinical utility of the reticulocyte hemoglobin content in the diagnosis of iron deficiency. *Blood* 2002, 99, 1489-1491.
12. Thomas Ch., Thomas L.: Biochemical markers and hematologic indices in the diagnosis of functional iron deficiency. *Clin. Chem.* 2002, 48, 1066-1076.
13. Markovic M., Majkic-Singh N., Subota V. et al.: Reticulocyte hemoglobin content in the diagnosis of iron deficiency anemia. *Clin. Lab.* 2004, 50, 431-436.

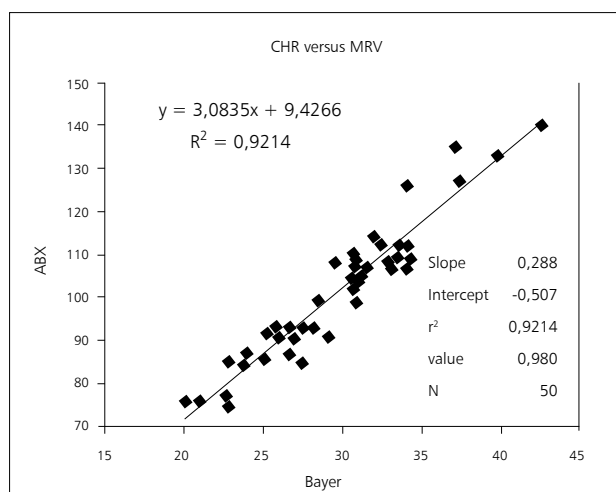
mgr Urszula Rychlik**prof. dr hab. Jan Kanty Kulpa***Zakład Analityki i Biochemii Klinicznej**Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie,**Oddział w Krakowie**ul. Garncarska 11**31-115 Kraków**e-mail: z5rychli@cyf-kr.edu.pl*

ŚREDNIA OBJĘTOŚĆ RETYKULOCYTA (MRV) WYLICZONA PRZEZ ANALIZATOR HORIBA ABX PENTRA 120/DX JAKO ALTERNATYWNY PARAMETR DO ZAWARTOŚCI HEMOGLOBINY W RETYKULOCYCIE (CHR)

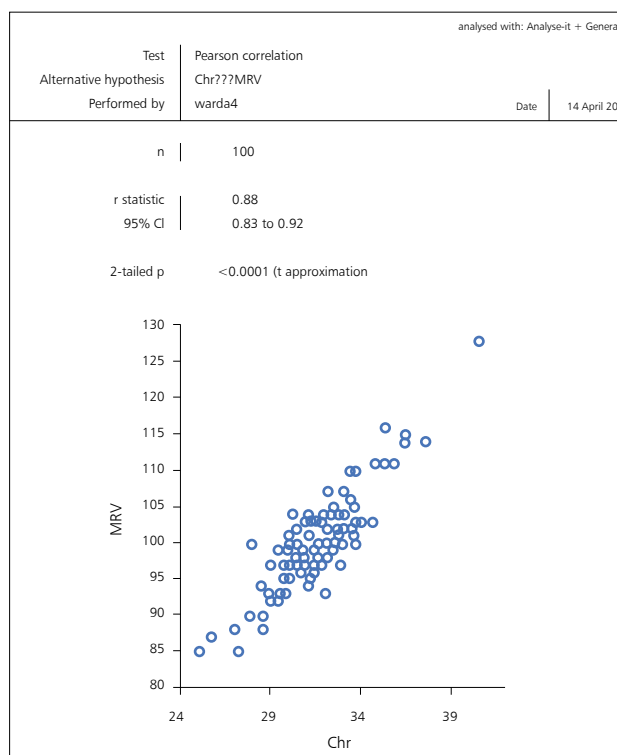
THE MEAN RETICULOCYTE VOLUME (MRV) ON THE ABX PENTRA 120/DX AS AN ALTERNATIVE MEASUREMENT TO THE RETICULOCYTE HAEMOGLOBIN CONTENT (CHR™)

Analizator ABX Pentra 120/DX dokonuje pomiaru retikulocytów wykorzystując powinowactwo barwnika fluorescencyjnego (oranż tiazolowy) do kwasu rybonukleinowego. Wykazano, że parametr, jakim jest średnia objętość retikulocyta (MRV), może stanowić alternatywę do zawartości hemoglobiny w retikulocycie (CHR), czyli parametru podawanego przez analizator Advia Bayer 120, wykorzystywanego do rozpoznania i monitorowania czynnościowego niedoboru żelaza. Wstępne badania wykonane przez kolejnych 5 dni na 34 próbkach krwi pacjentów wykazały dużą stabilność MRV. Badania porównawcze wykonane w dwóch ośrodkach: University Hospital of Wales (MRV podane z analizatora ABX Pentra 120/DX) oraz West Wales General Hospital (CHR na analizatorze Advia Bayer 120) wykazały wysoką korelację obu parametrów ($r = 0,96$). W szerszych badaniach wykonanych w Servei d'Hemoterapia i Hemosatsia Barcelona obejmujących 100 próbek krwi współczynnik ten wynosił 0,88. Badania te potwierdziły znaną korelację pomiędzy CHR i MCH, wykazując podobną korelację pomiędzy MRV i MCH.

Jak stwierdzono uprzednio, CHR jest wiarygodnym wskaźnikiem dowozu żelaza do dojrzewających krwinek czerwonych. Na podstawie własnych doświadczeń możemy



Rys 1. Badania porównawcze wykazujące korelację 0,96 między CHR i MRV.



Rys 2. Badania porównawcze obejmujące 100 próbek wykazały korelację 0,88 między CHR i MRV.

ocenić, że MRV może mieć porównywalną wartość w rozpoznaniu i ocenie czynnościowego niedoboru żelaza.

MRV jest rutynowo podawanym parametrem w University Hospital of Wales w przypadkach podejrzeń niedoboru żelaza u chorych dializowanych i z przewlekłą niewydolnością nerek. Badania osób zdrowych pozwoliły określić zakres wartości prawidłowych MRV dla miejscowej populacji na 93-110 fl.

A.H. Roderick, *Dep. of Haematology, University Hospital of Wales, Cardiff. UK*

J.M. Jou, *Servei d'Hemoterapia, Hospital Clinic, Barcelona. Spain*

W.G.B. Rees, E. Thomas, *Haematology Dep., West Wales General Hospital, Carmarthen. UK*

(Źródło: HORIBA ABX, Scientific Abstract, opracowanie i tłumaczenie prof. dr hab. Dagna M. Bobilewicz)

WARTOŚĆ OZNACZEŃ IMMUNOGLOBULIN W RÓŻNYCH GRUPACH WIEKOWYCH

IMMUNOGLOBULINS IN DIFFERENT AGE GROUPS

Alicja Kendziorek, Dagna M. Bobilewicz

Streszczenie

Immunoglobuliny są to białka pełniące funkcje przeciwciał. Produkowane są one przez komórki układu odpornościowego (plazmocyty) w odpowiedzi na antygeny obce dla ustroju człowieka, w celu ich związania w nieaktywne kompleksy antygen/przeciwciało. Stężenie tych immunoglobulin jest zależne od wieku człowieka. Dotyczy to szczególnie immunoglobuliny klasy IgA, która w wieku około 12 lat osiąga stężenie takie jak u dorosłych. U dorosłych niedobory immunoglobulin są związane z określonymi zespołami chorobowymi (AIDS, szpiczak mnogi, białaczki) lub mogą być konsekwencją prowadzonego leczenia (cytostatyki, radioterapia). Dla oceny odpowiedzi immunologicznej humoralnej oznacza się stężenie trzech klas immunoglobulin: IgG, IgA i IgM – głównie metodą immunoturbidymetryczną.

Słowa kluczowe

odpowiedź immunologiczna, oznaczanie immunoglobulin, gammapatie monoklonalne.

Summary

Immunoglobulins are typical antibodies, produced in response to exogenic antigens to create nonactive antigen/antibody complexes. Serum immunoglobulin level depends on age, what especially applies to IgA which reaches adult level at the age of 12. In adults immunoglobulin deficiency is mainly of secondary nature and is caused either by several diseases (AIDS, myeloma, leukemia) or therapeutic procedures (chemotherapy). Measurements of main classes immunoglobulins in serum (IgG, IgM, IgA) by immunoturbidimetric methods are useful in assessment of immunological response.

Keywords

immunological response, immunoglobulin measurement, monoclonal gammopathy.

Immunoglobuliny są to białka pełniące funkcje przeciwciał, wytwarzane przez komórki układu odpornościowego (plazmocyty) w celu związania obcych substancji (antygenów) przedostających się do ustroju człowieka i ich neutralizacji.

Układ odpornościowy różnicuje się już w okresie płodowym człowieka, jednak ze względu na brak kontaktu ze środowiskiem zewnętrznym jest on niedojrzały. Dotyczy to szczególnie odpowiedzi immunologicznej humoralnej, w wyniku której są produkowane swoiste przeciwciała w klasach: IgG, IgA, IgM, IgD i IgE.

Przeciwciała klasy IgG są podstawowymi przeciwciałami wytwarzanymi przez układ odpornościowy w odpowiedzi na antygeny obce. W okresie życia płodowego jako jedyne przechodzą od matki przez łożysko zapewniając noworodkowi przez pierwsze

miesiące bierną ochronę przeciwwakacyjną. Po 25-30 dniach przeciwciała matczyne ulegają katabolizmowi, a układ odpornościowy dziecka rozpoczyna wytwarzanie własnych. Około 3.-6. miesiąca życia poziom IgG jest najniższy i wynosi około 100-150mg/dl. Okres ten cechuje szczególna wrażliwość na szereg zakażeń np. przewodu pokarmowego. W następnych miesiącach poziom IgG produkowanej przez niemowlę wzrasta i w 12. miesiącu życia osiąga 80% poziomu ludzi dorosłych, który wynosi średnio 15g/l (tabela I).

Przeciwciała klasy IgA wytwarzane są przez komórki plazmatyczne w szpiku w odpowiedzi na antygeny, które przedostały się do organizmu. Przeciwciała te wiążą w sposób swoisty antygeny tworząc nieaktywne kompleksy antygen/przeciwciało. Produkcja IgA rozpoczyna się dopiero po urodzeniu się dziecka. Szczególną

Tabela I. Poziom immunoglobulin w różnych przedziałach wiekowych.

WIEK	IgG	IgM	IgA
Noworodki	6,38 – 13,60 g/l	0,05 – 0,13 g/l	<0,08 g/l
1 – 3 miesiące	2,47 – 6,80 g/l	0,13 – 1,07 g/l	<0,50 g/l
4 – 6 miesięcy	1,19 – 7,90 g/l	0,13 – 0,80 g/l	<0,66 g/l
7 – 12 miesięcy	3,49 – 9,18 g/l	0,34 – 1,54 g/l	0,08 – 0,66 g/l
Do 2 lat	2,97 – 9,69 g/l	0,27 – 1,54 g/l	0,08 – 0,83 g/l
Do 3 lat	4,08 – 10,20 g/l	0,27 – 1,54 g/l	0,17 – 1,00 g/l
Do 6 lat	4,68 – 11,05 g/l	0,40 – 1,54 g/l	0,08 – 1,49 g/l
Do 9 lat	5,53 – 12,32 g/l	0,40 – 1,54 g/l	0,25 – 1,83 g/l
Do 16 lat	5,18 – 12,84 g/l	0,40 – 1,54 g/l	0,5 – 2,16 g/l
Do 18 lat	6,80 – 15,30 g/l	0,40 – 1,47 g/l	0,66 – 2,99 g/l
Dorośli	6,80 – 14,45 g/l	0,34 – 2,48 g/l	0,75 – 4,07 g/l

rolę spełniają przeciwciała IgA tzw. wydzielnicze (slgA), które wytwarzane są miejscowo w błonach śluzowych i tam, po przyłączeniu cząsteczki białkowej sekrecyjnej, przechodzą na powierzchnię tych błon. Obecne są one na błonach śluzowych przewodu pokarmowego i układu oddechowego, gdzie wiążą obce antygeny od razu w miejscu ich przenikania do ustroju. Przeciwciała te nie przechodzą przez łożysko, ale w dużych ilościach znajdują się w mleku matki i dostarczane tą drogą stanowią swoistą miejscową ochronę przewodu pokarmowego noworodka przed zakażeniami jelitowymi i biegunkami mogącymi zagrażać jego życiu.

W okresie noworodkowym IgA są produkowane w stosunkowo małych ilościach. Pod koniec pierwszego roku życia stanowią tylko 20% ilości spotykanej u osób dorosłych. W następnych latach produkcja IgA stopniowo wzrasta i około 10. roku życia osiąga poziom taki jak u dorosłych, czyli około 2,4g/l.

Niestety nie ma jak dotąd możliwości oznaczania wydzielniczej IgA w różnych płynach ustrojowych ze względu na trudności ze standaryzacją metod pobierania materiału do badania. Oznaczenia przeprowadza się w surowicy, na tej podstawie pośrednio wnioskując o odpowiedzi immunologicznej.

Przeciwciała klasy IgM jako jedyne zaczynają być wytwarzane w bardzo małych ilościach już w okresie płodowym w odpowiedzi na antygeny własne ustroju. Po urodzeniu układ immunologiczny noworodka zaczyna szybko produkować przeciwciała w tej klasie także w odpowiedzi na antygeny obce i pod koniec pierwszego roku życia poziom tych przeciwciał osiąga 80% poziomu dorosłych, czyli wynosi około 1,5g/l (tabela I).

Przeciwciała klasy IgD są wytwarzane w małych ilościach przez całe życie i pełnią przede wszystkim funkcje receptorów na powierzchni limfocytów. Dlatego też nie oznacza się rutynowo poziomu tych przeciwciał. Poziom IgD w surowicy wynosi około 0,2g/l.

Przeciwciała klasy IgE produkowane są przede wszystkim miejscowo, głównie w tkance limfatycznej błon śluzowych układu oddechowego i pokarmowego i stąd przechodząc do krwi obwodowej rozprowadzane są po całym ustroju. Płód rozpoczyna ich wytwarzanie już około 11. tygodnia życia, ale są to ilości śladowe. Jeżeli jednak z organizmu matki przez łożysko przedostaną się alergen, to już w momencie urodzenia się dziecka poziom IgE może być u niego wyższy. Poziom IgE powoli wzrasta w ciągu pierwszych 10 lat życia, po

Tabela II. Poziom immunoglobuliny klasy IgE w różnych przedziałach wiekowych 1 IU/ml = 2,4 ng/ml IgE.

WIEK	ŚREDNIE STĘŻENIE IgE W SUROWICY IU/ml
0 – 11 miesięcy	1,30 – 14,99
1 – 1,5 roku	1,7 – 22,7
2 lata	1,9 – 24,20
3 – 4 lata	0,9 – 36,20
5 – 6 lat	3,0 – 36,4
7 – 9 lat	3,6 – 54,4
10 – 14 lat	2,9 – 103,5
15 – 21 lat	4,9 – 65,0
Dorośli	1,1 – 100

czym ok.12. roku życia nieco spada i osiąga stężenie ok. 250ng/ml (tabela II).

Przeciwciała klasy IgE wiążą się poprzez swoisty dla siebie receptor z powierzchnią komórek tucznych, bazo-filów i eozynofilów, co prowadzi do degranulacji tych komórek. Proces ten jest charakterystyczny dla I typu reakcji alergicznych, tzw. typu natychmiastowego.

Podwyższony poziom IgE stwierdza się w chorobach alergicznych, tzw. atopowych, co pomaga w diagnostyce tych chorób, a poprzez oznaczanie stężenia tzw. swoistych IgE, tj. skierowanych przeciw konkretnemu alergenowi, pozwala określić rodzaj alergenu, wywołującego wytwarzanie przeciwciał przez układ immunologiczny (1). Ilościowe oznaczanie IgE pozwala ponadto na rozpoznanie atopowego zapalenia skóry, alergii na pokarmy, a także astmy u niemowląt, ponieważ na badanie nie mają wpływu podawane wcześniej leki antyhistaminowe czy antybiotyki, a także zmiany skórne często obserwowane u małych dzieci. Ryzyko wystąpienia astmy jest proporcjonalne do stężenia IgE w surowicy.

Podwyższone stężenie IgE obserwuje się również w chorobach pasożytniczych, szczególnie w robaczycach, gdzie przeciwciała te pełnią funkcje protekcyjne, biorąc w ten sposób udział w zwalczaniu pasożytów. Zaburzenia w wytwarzaniu przeciwciał mogą mieć

charakter wrodzony (pierwotny) lub nabyty i mogą dotyczyć jednego rodzaju immunoglobuliny lub wszystkich. Według rejestrów światowych częstość występowania wrodzonych niedoborów odpornościowych wynosi 1 na 10.000 urodzeń (2). Spośród wrodzonych niedoborów najczęściej rozpoznawany jest selektywny niedobór IgA, który występuje z częstością 1:600 (3). Występuje też, choć znacznie rzadziej, tzw. zespół hiper-IgM, selektywny niedobór podklas IgG lub IgA, niedobór lekkich łańcuchów typu kappa, a także agammaglobulinemia sprzężona z chromosomem X. Zaburzenia te prowadzą do stałego lub okresowego upośledzenia odporności, w konsekwencji czego występują częste zakażenia przede wszystkim bakteryjne, ale także wirusowe, pasożytnicze i grzybicze (4). Najprostszym badaniem, które pozwala na wykrycie tych niedoborów, jest ilościowe oznaczanie stężenia immunoglobulin w surowicy.

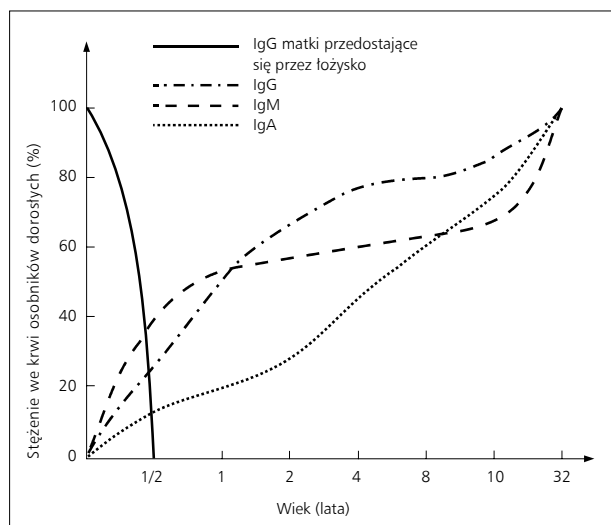
Osobną grupę stanowią wtórne niedobory immunologiczne (5), z których część związana jest z zaburzeniami odpowiedzi immunologicznej komórkowej (zespół AIDS), humoralnej lub obu.

Przyczyny wtórnych niedoborów są następujące:

- zakażenia ostre i przewlekłe
- immunosupresja (radioterapia, cytostatyki, glikokortykosteroidy)

- choroby limfoproliferacyjne (białaczki, gammapatie monoklonalne, chłoniaki ziarnicze, ziarnica złośliwa)
- rozległe i długotrwałe zabiegi chirurgiczne
- choroby przewodu pokarmowego (celiakia, choroba Crohna, przewlekłe zapalenie i marskość wątroby). Konsekwencją tych zaburzeń jest zwiększona podatność na zakażenia, w tym wywołane przez patogeny oportunistyczne, oraz wzrost występowania niektórych nowotworów (1).

Z wiekiem następuje proces starzenia się układu odpornościowego. Manifestuje się to z jednej strony osłabioną reakcją na rozpoznanie i niszczenie obcych antygenów, z drugiej – wzmożoną aktywnością limfocytów supresorowych odpowiedzialnych za wygaszanie odpowiedzi immunologicznej. U osób powyżej 70. roku życia maleje odczynowość alergiczna skóry, spada poziom IgE, IgG i IgM. Wzrasta też zachorowalność na choroby limfoproliferacyjne, tzw. gammapatie monoklonalne, w których dochodzi do nowotworowego namnażania się komórek plazmatycznych (4). W krwi obwodowej chorych pojawia się produkowane przez te komórki białko. Jest to immunoglobulina określonej klasy, charakteryzująca się jednorodnością zarówno pod względem budowy, jak i ładunku elektrycznego. Białko to nosi nazwę białka monoklonalnego i najczęściej należy do klasy IgG, IgA lub IgM, rzadziej IgD lub IgE. Najprostszym badaniem, które pozwala na wykrycie białka monoklonalnego i przybliżone określenie jego stężenia, jest elektroforeza białek surowicy. W chwili obecnej, gdy rozdział elektroforetyczny wykonywany jest na nośniku agarozowym, nawet słabo wysyczone dodatkowe prążki są dobrze widoczne i wykrywane bez problemów, co sprawia, że wyraźnie wzrosła wykrywalność białka monoklonalnego. Badania elektroforetyczne są również najprostszymi i najtańszymi badaniami pozwalającymi obserwować dynamikę procesu chorobowego. Stężenie białka monoklonalnego koreluje bowiem ze stanem zaawansowania



Rys. Stężenia immunoglobulin u dzieci i dorosłych.

choroby, a wysokość piku w proteinogramie jest proporcjonalna do stężenia tego białka.

Kolejnym badaniem, które jest niezbędne w diagnostyce gammapatii monoklonalnych, jest określenie rodzaju białka monoklonalnego techniką immunofiksacji lub immunoelektroforezy, a następnie ilościowe oznaczenie jego stężenia, które bardzo dobrze koreluje ze stanem zaawansowania choroby. Niestety nie są dostępne techniki umożliwiające ocenę stężenia w danej klasie immunoglobulin tylko białka monoklonalnego. Oznaczając ilościowo immunoglobuliny białka określa się zarówno stężenie białka produkowanego przez plazmocyty nowotworowe (czyli monoklonalnego), jak i przez plazmocyty prawidłowe. Jednakże im więcej jest immunoglobulin monoklonalnych, tym wyższe jest stężenie całkowite danej klasy. Tak więc ilościowe oznaczanie immunoglobulin pozwala na ocenę zaawansowania choroby w momencie przeprowadzania diagnostyki, jak też monitorowanie leczenia. Przy skutecznej terapii spada stężenie całkowite danej klasy immunoglobulin. Dodatkowe informacje na temat zaburzeń odpowiedzi immunologicznej humoralnej uzyskuje się oznaczając stężenie immunoglobulin klasy IgG, IgA i IgM. W zaawansowanych stadiach

gammapatii dochodzi bowiem do osłabienia tej odpowiedzi, co manifestuje się niskim stężeniem pozostałych immunoglobulin poza klasą immunoglobuliny, w której jest białko monoklonalne.

W gammapatiach monoklonalnych wg Kyle'a (6, 7) można wyróżnić następujące okresy:

- gammapatia monoklonalna o nieustalonym znaczeniu (monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS)
- szpiczak tłęcy (SMM)
- szpiczak plazmocytowy uogólniony (MM)

Pod względem etiopatologicznym MGUS, SMM i MM uważa się za kolejne fazy tego samego procesu.

Szczególne znaczenie ma wykrycie gammapatii i zdiagnozowanie chorych w najwcześniejszym okresie, tj. w fazie MGUS. Gammatie w tej fazie są wykrywane u 1% pacjentów powyżej 50. roku życia i u 3% powyżej 70. roku życia. Tak więc jest to choroba, z którą spotykamy się dosyć często (8). Pierwszą informacją pozwalającą na zdiagnozowanie choroby w fazie MGUS jest wykrycie w surowicy małych ilości białka monoklonalnego – poniżej 30g/l, przy prawidłowych pozostałych parametrach diagnostycznych, czyli ilość plazmocytów w szpiku poniżej 10%, brak białkomoczu, prawidłowe stężenie kreatyniny, mocznika i wapnia w surowicy.

Okres MGUS trwa różnie długo – średnio od 2 do 5 lat (4); okres ten może być dłuższy szczególnie w starszym wieku.

Oznaczanie ilościowe immunoglobulin jest wykonywane z zastosowaniem metod immunoturbidy-

metrycznych, dostępnych praktycznie na wszystkich analizatorach biochemicznych. Jednak ze względu na relatywnie wysoką cenę, jak również dlatego, że mała jest wśród lekarzy świadomość znaczenia klinicznego tego badania, jest ono rzadko wykonywane, szczególnie w mniejszych ośrodkach. Wyjątek stanowi tzw. specyficzne IgE, której oznaczenia są nierozdzielnie związane z diagnostyką alergii, zwłaszcza u dzieci.

Znajomość stężeń podstawowych klas immunoglobulin – IgG, IgA, IgM – pozwala na określenie zaburzeń procesów odpornościowych, w konsekwencji których dochodzi do nieprawidłowej odpowiedzi immunologicznej na różne antygeny, co obserwuje się u niemowląt w przebiegu wielu chorób (9).

U niemowląt i małych dzieci zaburzenia te związane są z niedojrzałym układem immunologicznym i wolno przebiegającym procesem jego dojrzewania. Jest to jednak proces fizjologiczny. Z wiekiem układ immunologiczny jest już wprawdzie sprawny, ale coraz bardziej narażony na wpływy środowiska zewnętrznego. Nieustanna zmienność antygenów bakteryjnych i wirusowych, skażenie środowiska i in. czynniki powodują konieczność ciągłej mobilizacji układu immunologicznego w neutralizacji tych antygenów. Z jednej strony prowadzi to do nadmiernej reakcji immunologicznej i chorób alergicznych lub autoimmunologicznych, z drugiej – do osłabienia funkcji komórek nadzorujących procesy immunologiczne i rozwoju chorób nowotworowych.

Piśmiennictwo:

1. Zeman K.: Niedobory odporności w praktyce lekarskiej. *Alergia, Astma Immunol.* 1999, 4 (supl. 1), 77-79.
2. Puck J. M.: Primary immunodeficiency diseases. *JAMA*, 1997, 278, 1835-1841.
3. Burrow P.D., Cooper M.D.: IgA deficiency. *Adv. Immunol.* 1997, 65, 245-276.
4. Greipp P.R., Lust J.A.: Monoclonal gammopathies of undetermined significance: their relation to multiple myeloma. in *Multiple myeloma* Eds.: Gahrton G., Durie B.G.M. London 1996, 83-98.
5. Stiehm E.R. Choroby spowodowane niedoborem odpornościowym. *Diagn. i Terapia*, Wrocław 1995, 338-357.
6. Bradwell A.R., Mead G.P., Carr-Smith H.D.: Serum free light chain analysis. *Binding Site Publication* 2005.
7. Kyle R.A.: The monoclonal gammopathies. *Clin. Chem.* 1994, 40/11 (B), 2154-2162.
8. Cesana C., Klersy C., Barbarano L.: Prognostic factors for malignant transformation in monoclonal gammopathy of undetermined significance and smouldering multiple myeloma. *J. Clin. Oncol.* 2002, 20, 1625-1634.
9. Kowalczyk D.: Wskazania do badań immunologicznych i diagnostyka odporności *Pol. J. Immunol.* 1995, 20 (supl. 2), 3-15.

dr farm. Alicja Kendziorek
prof. dr hab. Dagna M. Bobilewicz
Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej
Wydziału Nauki o Zdrowiu AM w Warszawie

OKSYDATYWNIE ZMODYFIKOWANA ALBUMINA (IMA) JAKO WSKAŹNIK NIEDOTLENIEŃ MIĘŚNIA SERCOWEGO

ISCHEMIA MODIFIED ALBUMIN (IMA) AS A MARKER OF MYOCARDIAL HYPOXIA

Jerzy W. Naskalski

Streszczenie

Oznaczanie markerów sercowych i badanie EKG stanowi obecnie podstawę dla rozpoznania zawału mięśnia sercowego. Jednak we wczesnej fazie ostrej choroby wyniki badania EKG i oznaczenia markerów sercowych często nie są ze sobą zgodne. Przyczyną tego stanu jest to, że markery sercowe pojawiają się we krwi w stosunkowo późnej fazie niedokrwiennego uszkodzenia mięśnia serca, kiedy dochodzi do powstania ognisk martwicy, które stają się źródłem markerów sercowych. Obecnie rolę wczesnego markera ostrego niedotlenienia mięśnia sercowego przypisuje się niedawno wykrytej frakcji „albuminy zmodyfikowanej w ognisku niedokrwienia” (IMA). Powstawanie IMA związane jest ze zjawiskiem stresu oksydacyjnego, który przyczynia się do uszkodzenia tkanek w miejscu odczynu zapalnego. IMA jest frakcją albuminy, która w wyniku kontaktu z reaktywnymi pochodnymi tlenu w miejscu niedokrwienia utraciła N-końcową resztę lizyny, co powoduje zanik zdolności do wiązania i transportowania metali przejściowych, w tym jonów kobaltu (2+) i niklu (2+). Wykrywanie IMA jest stosunkowo proste i opiera się na spektrofotometrycznym oznaczeniu zmian widma surowicy, do której dodano jony kobaltu (jako CoCl_2) i ditiotreitol. Ditiotreitol z wolnymi jonami kobaltu tworzy granatowo zabarwiony kompleks, którego stężenie zależy od ilości albuminy niezdolnej do wiązania kobaltu. Od kilku lat dostępny jest gotowy test pozwalający na oznaczenie IMA w laboratoriach klinicznych pod nazwą Albumin Cobalt Binding – ACB-test. Test ten ma wskazywać na obecność obszarów niedokrwienia i deficytu tlenowego w mięśniu sercowym, powstałych w wyniku postępującej niedrożności naczynia wieńcowego w pierwszej fazie zawału. Test ACB również stwarza możliwość oceny wielkości „szkod reperfuzyjnych”, występujących jako efekt zwiększenia przepływu krwi przez pierwotnie niedotlenioną tkankę w wyniku udrożnienia naczyń wieńcowych. Test IMA jest mało swoistym markerem niedotlenienia mięśnia sercowego. Może on wychodzić dodatkowo u tych chorych, u których występują epizody niedokrwienia w mięśniu sercowym, mięśniach szkieletowych lub innych narządach. Wzrost IMA występuje również w niedokrwinnym udarze mózgu, u chorych ze schyłkową niewydolnością nerek i u niektórych chorych z nowotworami. Jednak oznaczanie stężenia IMA, stwarzając możliwość oceny stopnia niedokrwienia mięśnia sercowego zarówno u chorych z zawałem serca, jak i u chorych z nawracającym niedotlenieniem mięśnia sercowego w przebiegu niestabilnej dławicy piersiowej, wprowadza nową informację w diagnostyce laboratoryjnej niedokrwiennej choroby serca.

Słowa kluczowe

wiązanie metali przez albuminy, oksydacyjna modyfikacja albuminy, niedokrwienie mięśnia sercowego, stres oksydacyjny, perfuzja.

Summary

Recognition of myocardial infarction is based on assay of cardiac injury markers and assessment of ECG test. However, in early phase of acute coronary disease results of ECG examination and cardiac markers are often discrepant. This discrepancy is an effect of a relatively late appearance of cardiac injury markers, which release is secondary to cardiac cells death and formation of necrotic lesions. Recently, an assay of ischemia modified albumin (IMA) in plasma was introduced as an early marker of myocardial hypoxia. IMA is produced in the ischemic areas of myocardium in effect of the oxidative stress, which contribute to hypoxic tissue injury. IMA consists a fraction of plasma albumin which lost N-terminal lysine residue and is deprived of cobalt and nickel binding ability. Detection of IMA is relatively simple and employs light absorption spectrophotometric assay of serum with added dithiothreitol and cobalt ions. Dithiothreitol produces a dark blue colored complex with free cobalt ions, which concentration is related to concentration of albumin which is not able to bind cobalt. Since several years there is available a commercial test for IMA called Albumin Cobalt Binding (ACB) test. It is supposed that this test indicate the presence of tissue ischemia and oxygen deficit in cardiac muscle fragments in the initial phase of acute coronary disease, due to coronary artery occlusion. The ACB is also considered a marker of reperfusion injuries which occur when blood flow is restored in the formerly hypoxic tissues, in effect of opening of occluded coronary vessels. The IMA assay is not specific to cardiac muscle ischemia. It is also detectable in patients with ischemic episodes in skeletal muscles and other tissues. There are some data indicating that IMA may also increase in ischemic stroke, in some patients with cancer and in end stage renal disease. Beside its low specificity, assays of IMA provide a new tool for detection of cardiac muscle hypoxia leading both to myocardial infarction and to recurring ischemic episodes in patients with unstable angina.

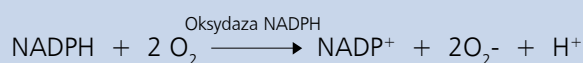
Key words

albumin metal binding, albumin oxidative modification, cardiac hypoxia, oxidative stress, reperfusion.

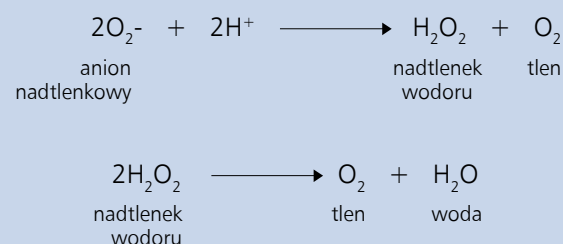
Ból w klatce piersiowej jest jedną z najczęściej występujących przyczyn zgłaszania się chorych do izby przyjęć i na oddziały intensywnej terapii. W tej grupie od 10% do 20% stanowią chorzy z zawałem serca ewoluującym w kierunku martwicy mięśnia sercowego. Aby wyodrębnić tych chorych, a także zdiagnozować postęp niedokrwiennego uszkodzenia mięśnia serca stosuje się obecnie szereg metod diagnostycznych, wśród których szczególną rolę odgrywają badanie elektrokardiograficzne serca i oznaczanie markerów uszkodzenia mięśnia sercowego – troponiny I, troponiny T i izoenzymu sercowego CK (CKMB). Jednak we wczesnej fazie ostrej choroby wieńcowej, kiedy występują największe szanse skutecznego leczenia, wynik badania EKG i oznaczenia stężenia markerów sercowych często nie są ze sobą zgodne, co w wielu wypadkach powoduje opóźnienie decyzji dotyczącej potwierdzenia lub wykluczenia zawału (1). Przyczyną tego stanu jest to, że markery sercowe pojawiają się we krwi w stosunkowo późnej fazie niedokrwiennego uszkodzenia mięśnia serca, kiedy deficyt tlenowy prowadzi do powstania ognisk martwicy, w wyniku której obumierające komórki stają się źródłem markerów sercowych (2). Dlatego uwaga kardiologów skierowana jest obecnie na poszukiwanie markerów niedokrwienia mięśnia sercowego wyraźnie wyprzedzających powstawanie ognisk martwiczych w niedokrwionym mięśniu sercowym i wydzielanie markerów sercowych.

Rolę wczesnego markera ostrego niedotlenienia mięśnia sercowego może spełnić oznaczenie w osoczu obecności niedawno wykrytej frakcji „albuminy zmodyfikowanej w ognisku niedokrwienia” (ang. ischemia modified albumin – IMA) (3). Powstawanie IMA związane jest ze zjawiskiem stresu oksydacyjnego, czyli procesu generowania wolnych rodników, które przyczyniają się do uszkodzenia tkanek w miejscu odczynu zapalnego. U chorych z zaawansowaną miażdżycą naczyń wieńcowych przejściowo występują obszary

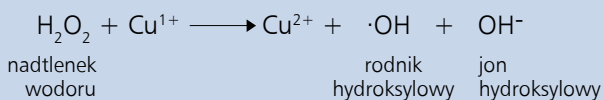
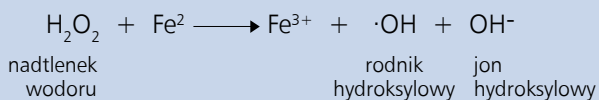
znacznego deficytu tlenowego w niedokrwionych obszarach mięśnia sercowego. W wyniku kwasicy powstającej w obszarach niedokrwienia następuje aktywacja fagocytów krwi obwodowej, które wydzielają do otoczenia enzymy proteolityczne i reaktywne związki tlenu. Proces rozpoczyna aktywacja tzw. „błonowego enzymatycznego kompleksu oksydazy NADPH”, który z udziałem NADPH^+ katalizuje jednoelektronową redukcję cząsteczki tlenu prowadzącą do wytworzenia anionorodnika ponadtlenkowego (O_2^-).



Proces syntezy O_2^- w fagocytach jest również zależny od stymulacji w wyniku działania cytokin zapalnych (IL-2, IL-6, IL-8), które równocześnie stymulują syntezę CRP i innych białek ostrej fazy. W środowisku zapalnym O_2^- jest substratem dla syntezy substancji bakteriobójczych. Normalnie w ustroju nadmierne tworzenie reaktywnych form tlenu zapobiega działanie dysmutazy nadtlenkowej (SOD) i katalazy, które stanowią naturalną obronę komórki przed stresem oksydacyjnym, rozkładając anionorodnik nadtlenkowy do cząsteczki wody i cząsteczki tlenu (4). Jednak w miarę dopływu świeżej krwi (reperfuzji), niosącej do obszarów niedokrwionych nowe fagocyty ulegające pobudzeniu, produkcja reaktywnych form



tlenu zwiększa się i nadmiar O_2^- w niedokrwionych tkankach staje się źródłem nierównowagi pomiędzy wewnątrzkomórkowymi procesami utleniania i redukcji, określanej jako stres oksydacyjny. Powstający przejściowo nadtlenek wodoru, który wraz z wodą swobodnie przemieszcza się przez błony komórkowe, może częściowo nie podlegać rozkładowi, natomiast może reagować z substancjami redukującymi (np. zawierającymi grupy $-SH$), przenosząc czynnik stresu oksydacyjnego do przestrzeni pozakomórkowej. Prowadzi to do zmniejszenia stężenia glutationu, cysteiny, kwasu askorbinowego, a także wewnątrzkomórkowych zasobów witaminy E oraz modyfikacji lipoprotein krążących we krwi (4). W konsekwencji dochodzi do upośledzenia systemu komórkowej obrony antyoksydacyjnej, co umożliwia powstawanie toksycznych dla komórki wolnych rodników. W obecności śladowych ilości metali przejściowych (Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+}) H_2O_2 ulega jednoelektronowej redukcji tworząc jon wodorotlenowy (OH^-) i bardzo toksyczny rodnik hydroksylowy ($\cdot OH$).



Działanie rodnika hydroksylowego na reszty aminokwasowe białek może prowadzić do zmian konformacyjnych i fragmentacji. Białka tracą grupy $-SH$, dochodzi do degradacji tryptofanu i tworzenia grup hydroksylowych i karbonylowych w białkach. Zmienne działaniem wolnych rodników białka i lipidy tracą swoje własności biologiczne, co prowadzi do uszkodzenia i obumierania komórek.

IMA jest frakcją albuminy, która w wyniku kontaktu z reaktywnymi pochodnymi tlenu w miejscu niedokrwienia utraciła N-kończącą resztę lizyny, co powoduje zanik zdolności do wiązania i transportowania metali przejściowych, w tym jonów kobaltu ($2+$) i niklu ($2+$) (5). Wykrywanie IMA jest stosunkowo proste i opiera się na spektrofotometrycznym oznaczeniu zmian widma surowicy, do której dodano jony kobaltu (jako $CoCl_2$) i ditiotreitol. Ditiotreitol z wolnymi jonami kobaltu tworzy granatowo zabarwiony kompleks. Ilość powstającego barwnego kompleksu Co^{2+} z ditiotritolem zależy zatem od ilości albuminy niezdolnej do wiązania kobaltu. Im większa frakcja albuminy pozbawionej zdolności wiązania kobaltu, tym większa wartość absorpcji światła przy 500nm, zależnej od stężenia kompleksu Co^{2+} z ditiotritolem.

Przed kilku laty firma Ischemia Technologies z Denver w USA opracowała i opatentowała gotowy test pozwalający na oznaczenie IMA w laboratoriach klinicznych pod nazwą Albumin Cobalt Binding – ACB™. Test ten ma wskazywać na obecność obszarów niedokrwienia i deficytu tlenowego w mięśniu sercowym, powstałych w wyniku postępującej niedrożności naczyń wieńcowych w pierwszej fazie zawału (6). Test ACB™ również stwarza możliwość oceny wielkości „szkod reperfuzyjnych”, występujących jako efekt zwiększenia przepływu krwi przez pierwotnie niedotlenioną tkankę w wyniku udrożnienia naczyń wieńcowych (4). Propozycja oznaczania stężenia IMA w niedokrwionym fragmencie mięśnia sercowego stwarza nadzieję lepszej oceny uszkodzenia mięśnia sercowego zarówno u chorych z zawałem serca, jak i u chorych z nawracającym i przewlekłym niedotlenieniem mięśnia sercowego w przebiegu niestabilnej dławicy piersiowej (7). Wartość kliniczna testu ACB jest jeszcze przedmiotem ocen. Potencjalnie test ten posiada wiele zalet

Tabela Cechy albuminy (IMA).

Pojawia się wcześniej po wystąpieniu niedokrwienia
Jest stabilna we krwi przez wiele godzin
Powraca do wartości wyjściowych po 24 godzinach od ustąpienia niedokrwienia
Łatwa do mierzenia i niski koszt oznaczeń
Dobre cechy analityczne testu (wysoka czułość i swoistość)
Wysoka swoistość diagnostyczna w stosunku do reperfuzji niedokrwiennej tkanki mięśniowej
Brak wzrostu w warunkach czynnościowego niedotlenienia mięśni po skrajnym wysiłku

(tabela). Ze względu na nieodwracalny charakter reakcji tworzenia IMA oczekuje się, że test ten będzie cechować się większą wartością predykcyjną dla niedotlenienia mięśnia serca niż dotychczasowe badania czynnościowe (7, 8), dzięki temu IMA ma być markerem wyprzedzającym powstanie zmian martwiczych typowych dla rozwiniętego zawału. Wu i wsp. (9) badali wartość dyskryminacyjną testu ACB w 1.-2. godzinie trwania bólów stenokardialnych. Niedokrwienie potwierdzone podwyższonymi wartościami testu ACB wystąpiło u 63% tych chorych i było silnie skorelowane z wynikami badania EKG i obecnością podwyższonej troponiny w 4.-5. godzinie trwania ostrej fazy choroby. Obecność IMA miała wyższą czułość dla rozpoznania ostrej niewydolności wieńcowej od samego badania EKG i od samego oznaczenia troponiny.

T. Bhagavan i wsp. (6) badali test IMA jako wskaźnik niedotlenienia mięśnia serca u chorych z dławicą piersiową i w przebiegu zawału. Chorych diagnozowano wykonując badania CKMB_{mass} i troponiny I. Uzyskane wyniki odnoszono do liczby jednostek stężenia IMA w tych samych próbkach. Przyjmując jako wartość odcięcia górny 95. percentyl dla testu ACB u ludzi zdrowych, czułość dla rozpoznania niedotlenienia mięśnia serca wynosiła 88%, a swoistość 94%. Dodatnia wartość predykcyjna dla niewydolności wieńcowej wynosiła 92%, a ujemna wartość predykcyjna dla wykluczenia niewydolności wynosiła 91%.

Zgodnie z mechanizmem powstawania IMA w ognisku niedokrwienia test wiązania jonów kobaltu słabo różni chorych z ostrym przemijającym niedokrwieniem mięśnia serca w przebiegu dławicy niestabilnej od chorych ze zdefiniowanym zawałem serca. Zdolność dyskryminacyjna testu dla różnicowania zawału serca od ataku dławicy piersiowej była znacznie niższa od obecnie używanych do oceny niedokrwienia mięśnia sercowego troponiny T lub I (10, 11). Jednak brak dowodów niedokrwienia i reperfuzji ma wysoką wartość predykcyjną dla wykluczenia ostrego niedokrwienia mięśnia serca, ponieważ przy negatywnym wyniku badania EKG i braku wykrywalnej troponiny praktycznie w 100% wyklucza się ostry zespół wieńcowy. Test ACB zatem nie może być stosowany zamiast oznaczania markerów sercowych, lecz obok tych markerów, pozwalając na lepsze zdefiniowanie grupy chorych z ostrą niewydolnością wieńcową, którzy w ciągu najbliższych godzin mogą ewoluować do pełnoobjawowego zawału serca. Szacuje się, że zastosowanie badań IMA może zmniejszyć liczbę pacjentów kierowanych na badania angiograficzne o około 10%.

Innym zastosowaniem oznaczeń IMA jest kontrola skuteczności udrożnienia tętnicy wieńcowej. Nowoczesne metody kardiologii inwazyjnej umożliwiają przywrócenie przepływu krwi w tętnicy wieńcowej zagrożonej zakrzepem i niedrożnością, co prowadzi do reperfuzji niedokrwionego fragmentu mięśnia serca. Utrzymujący się podwyższony poziom IMA może wskazywać na

pozostałe niedokrwienie mięśnia serca, nie wykrywalne za pomocą wzrostu stężenia troponin sercowych. Odczynniki do oznaczania IMA są obecnie oferowane przez kilku dostawców testów diagnostycznych in vitro. Można oczekiwać również pojawienia się w najbliższym czasie immunochemicznych testów IMA opartych na wykorzystaniu różnic w sekwencji aminokasów wynikających z oksydatywnej modyfikacji cząsteczki albuminy. Dane publikowane na temat testu ACB™ wskazują, że konieczna jest międzylaboratoryjna standaryzacja tego testu. Gidenne i wsp. (12) dokonali oceny cech analitycznych testu ACB. Stwierdzili oni, że w grupie referencyjnej ludzi zdrowych, bez niedokrwiennej choroby serca, wartości ACB rozkładają się symetrycznie w zakresie od 57,87- 92,00U/ml wokół średniej wynoszącej 76,6U/ml. Zaobserwowano znamioną różnicę pomiędzy grupą kobiet (średnia 77,7U/ml) i mężczyzn (średnia 75,83U/ml). Wartości 95. percentyla dla kobiet i mężczyzn wynosiły odpowiednio 92,00U/ml i 96,43U/ml. Współczynnik zmienności analitycznej testu wynosi 1,67% w serii i 2,35% między seriami, dla stężeń albuminy w zakresie 2-8g/l. Wyniki te różniły się od danych dotyczących grupy referencyjnej uzyskanej w międzyośrodkowym badaniu amerykańskim, w którym uzyskano u ludzi zdrowych stężenia IMA mieszczące się w zakresie od 25U/ml do 84,5U/ml i wartość średnią wynoszącą 58,7U/ml (bez rozróżnienia na kobiety i mężczyzn). Wartość 95. percentyla wynosiła 80,2 U/ml (9).

Ostatecznie oznaczanie IMA powinno być oceniane raczej jako wskaźnik prognostyczny dla zagrażającego niedokrwienia niż jako test potwierdzający ostry epizod wieńcowy. Należy pamiętać, że test IMA jest mało swoistym markerem niedotlenienia mięśnia sercowe-

go. Może on wychodzić dodatnio u wszystkich tych chorych, u których występują epizody niedokrwienia w mięśniu sercowym, w mięśniach szkieletowych lub innych narządach (10,11). Podejrzewa się również wzrost IMA w niedokrwinnym udarze mózgu, u chorych ze schyłkową niewydolnością nerek i u niektórych chorych z nowotworami.

Z drugiej strony możliwość oceny występowania stref niedokrwienia i stresu oksydacyjnego stanowi pewną nową jakość w diagnostyce laboratoryjnej. Rozważa się potencjalną użyteczność tego testu do oceny uszkodzenia mięśnia serca u chorych z niestabilną dławicą piersiową. Obecnie dla oceny stanu tych chorych oznacza się poziom CRP, który odzwierciedla zjawisko gromadzenia się komórek zapalnych na niestabilnych blaszkach miażdżycowych, a pośrednio wskazuje na ryzyko agregacji płytek i powstawania zakrzepów ograniczających drożność tętnic wieńcowych.

Wskazując na znaczenie procesu zapalnego przypuszcza się, że stężenie IMA może być dodatkowym parametrem biochemicznym pomocnym do oceny stanu chorych z postępującym uszkodzeniem mięśnia sercowego w przebiegu niestabilnej dławicy piersiowej, narażonych na powtarzające się niedotlenienie, u których nawracające epizody niedokrwienia związane są z „tłącym się” procesem zapalnym tak w obszarze tętnic wieńcowych, jak i być może również we fragmentach mięśnia sercowego (13). Zatem oznaczanie IMA może być pomocne w rozpoznaniu niedokrwiennej choroby serca w fazie określanej jako „minimal myocardial damage”, obecnie identyfikowanej jedynie za pomocą subkrytycznych wzrostów stężenia troponiny I lub T.

Piśmiennictwo:

1. Freas G.C.: Medicolegal aspects of acute myocardial infarction. *Emerg. Med. Clin. North. Am.* 2001, 144, 511-521.
2. Graff L.G., Dallara J., Ross M.A. et al.: Impact on the care of the emergency department chest pain patient from the chest pain evaluation registry (CHEPER) study. *Am. J. Cardiol.* 1997, 80, 563-568.
3. Bar-Or D., Winkler J.V., Van Bengthuisen K. et al.: Reduced cobalt albumin binding with transient myocardial ischemia after elective percutaneous transluminal coronary angioplasty. A preliminary comparison to creatine kinase MB, myoglobin and troponin. I. *Am. Heart J.* 2001, 131, 985-991.
4. Naskalski J.W., Bartosz G.: Oxidative modifications of protein structures. W: *Advances of Clinical Biochemistry*. Academic Press Heartcourt Publ. Comp. San Diego-London-Sydney 2000, Vol. 35, 134-195.
5. Bar-Or D., Curtis G., Rao N. et al.: Characterization of the Co²⁺ and Ni²⁺ binding aminoacid residues of the N-terminus of human albumin. *Eur. J. Biochem.* 2001, 268, 42-47.
6. Bhagavan N.V., Lai E.M., Rios PA. et al.: Evaluation of human serum albumin cobalt binding assay for the assessment of myocardial ischemia and myocardial infarction. *Clin. Chem.* 2003, 49, 581-585.
7. Christensson R.H., Duh S.H., Sanhai W.R. et al.: Characteristics of an albumin cobalt binding test for assessment of acute coronary syndrome patients. A multicenter study. *Clin. Chem.* 2001, 47, 464-470.
8. Morrow D.A., de Lemos J.A., Sabatine MS. et al.: The search of a biomarker of cardiac ischemia. *Clin. Chem.* 2003, 49, 537-539.
9. Wu A.H.B., Morris D.L., Fletcher D.R. et al.: Analysis of the Albumin Cobalt Binding Test (ACBTM) as an adjunct to cardiac troponin I for the early detection of acute myocardial infarction. *Cardiovasc. Toxicol.* 2001, 1, 147-152.
10. Zapico-Muniz E., Santalo-Bel M., Merce-Muntanola J. et al.: Ischemia modified albumin during skeletal muscle ischemia. *Clin. Chem.* 2004, 50, 1063-1065.
11. Borderie D.L., Allanoire Y., Meune C. et al.: High ischemia modified albumin concentration reflects oxidative stress but not myocardial involvement. *Clin. Chem.* 5 (2004), 50, 2191-2193.
12. Gidenne S., Ceppa F., Fontan E. et al.: Analytical performance of the albumin cobalt binding test ACBR on the Cobas MIRA Plus analyzer. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2004, 42, 455-461.
13. Pearson T.A. et al.: Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Center for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation* 2003, 107, 499-511.

prof. dr hab. Jerzy W. Naskalski

Zakład Diagnostyki Katedry Biochemii Klinicznej

Collegium Medicum UJ w Krakowie

OCENA PROTEINURII W PRZYPADKOWYCH PORCJACH MOCZU

MEASUREMENTS OF PROTEINURIA ON RANDOM URINE SAMPLES

Dagna M. Bobilewicz

Streszczenie

Ze względu na uciążliwość poprawnego wykonania dobowej zbiórki moczu w celu określenia dobowego wydalania białka zwrócono uwagę na możliwość wykorzystania współczynnika białko:kreatynina w przypadku, kiedy oba parametry oznaczane są w tej samej porcji moczu. Dotychczasowe badania wykazały, że współczynnik ten koreluje z wartością oznaczoną w zbiórce dobowej i są podstawy do zastosowania go w badaniach skriningowych w celu wykluczenia obecności proteinurii.

Słowa kluczowe

białkomocz, dobowy zbiórka moczu, przypadkowe porcje moczu, stosunek białko:kreatynina.

Summary

As 24 hour urine collection is troublesome and unreliable it has been shown that random urine protein:creatinine ratio correlates with 24 hour protein estimation and provides evidence to rule out the presence of significant proteinuria.

Keywords

proteinuria, 24 hour urine collection, random urine sample, protein:creatinine ratio.

Choroby nerek stanowią problem populacyjny ze względu na to, że przebiegają przez długi czas bezobjawowo i nie są rozpoznawane na tyle wcześnie, aby wprowadzone leczenie mogło być skuteczne. Rozwijają się one na różnym tle, a jedną z najczęstszych przyczyn ich powstawania jest cukrzyca typu 2, w wielu przypadkach prowadząca do krańcowej niewydolności narządu. Do podstawowych badań laboratoryjnych, oceniających funkcje nerek jeszcze w okresie ich wydolności funkcjonalnej, zalicza się przede wszystkim ocenę przesączania kłębuszkowego, które jest określane bezpośrednio jako klirens kreatyniny endogennej bądź wyliczane w oparciu o opracowane wzory (1).

W badaniach populacyjnych przeprowadzanych u osób o podwyższonym ryzyku uszkodzenia nerek duże znaczenie ma określanie dobowego wydalania białka, zalecane m.in. przez National Kidney Foundation jako badanie skriningowe, a także wykonywane okresowo w celu monitorowania tej grupy pacjentów (2). Są również opinie, że śladowa proteinuria jest objawem

wcześniejszym niż zmiany przesączania kłębuszkowego. Poza objawem wczesnego uszkodzenia nerek proteinuria jest uznana za jeden z czynników ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego. Jej oznaczenie odgrywa rolę również w stanach przedrzucawkowych w okresie ciąży, a także w ocenie nefrotoksyczności stosowanych leków (3).

Jako złoty standard uznana została metoda, polegająca na ocenie wydalania białka w zbiórce moczu wykonanej w ciągu 24 godzin. Należy jednak liczyć się z trudnościami w prawidłowym wykonaniu tej zbiórki, szczególnie w odniesieniu do pacjentów ambulatoryjnych. Badania wykazały, że aż do 20% materiału dostarczonego do laboratorium nie spełnia wymagań, zbiórka jest niekompletna i musi zostać odrzucona. Z drugiej strony wiadomo, że wydalanie białka w ciągu doby ulega zmianom od 100 nawet do 500%, co zależy od takich czynników, jak podaż płynów i ich wydalanie drogą nerek, szybkość diurezy, aktywność fizyczna, dieta, a także

zmiany ciśnienia tętniczego (4). Tak więc oznaczanie wydalania w przypadkowych próbkach moczu też jest obarczone błędem.

W celu zobiektywizowania wyników wprowadzono określanie ilości białka (w mg) w odniesieniu do kreatyniny oznaczonej w tej samej próbce moczu i wyrażonej w milimolach (4). Wykazano, że zmienność wewnątrzsobnicza tego współczynnika określanego w ciągu doby wynosi około 38,6%, czyli znacznie mniej niż samego białka. Stwierdzono też dobrą korelację z oznaczonym dobowym wydalaniem białka (0,972). Jako próbkę z wyboru zalecano mocz z drugiej porannej mikcji.

Z założenia oznaczanie wydalania białka jako test skринingowy powinno generować jak najmniej wyników fałszywie dodatnich i fałszywie ujemnych. Kiedy ujemny wynik badania jest parametrem wykluczającym obecność zmian i nie są podejmowane dalsze kroki diagnostyczne, lecz zalecana jest obserwacja i okresowa kontrola, szczególne znaczenie ma maksymalne zmniejszenie liczby wyników fałszywie ujemnych. W przypadku bowiem wyniku dodatniego postępowaniem z wyboru jest powtórzenie badania i oznaczenie białka w dobowej zbiórce, co eliminuje ewentualne wyniki fałszywie dodatnie uzyskane w badaniu skринingowym.

Price i wsp. (4) opracowali wyniki 16 badań prowadzonych w ostatnich latach, obejmujących porównania w różnych grupach pacjentów współczynnika białko:kreatynina z dobowym wydalaniem białka. Doprowadziło ich to do ogólnego wniosku, że istnieją wystarczające dowody na to, że współczynnik ten wykazuje dobrą korelację z dobowym wydalaniem białka i może znaleźć zastosowanie do wykluczenia obecności istotnej proteinurii. Pozwala tym samym zmniejszyć liczbę badań wykonywanych ze zbiórki 24-godzinnej, często obarczonej błędami. Należy jednak zdać sobie sprawę, że wymagają rozwiązania różne problemy, m.in. przedstawione poniżej.

Różne metody oznaczeń

Dotyczy to zarówno kreatyniny, jak i białka. Dużą zmienność uzyskiwanych wartości powoduje zastosowanie wielu modyfikacji klasycznych oznaczeń stężenia kreatyniny z wykorzystaniem metody z kwasem pikrynowym w środowisku zasadowym, a także innych metod, wprowadzanych głównie w odniesieniu do surowicy (enzymatyczna, HPLC i rozcieńczeń izotopowych ze spektrometrią masową jako metodą referencyjną) (1). Problem stanowi również brak międzynarodowego wzorca, którego propozycje zostały przedstawione i są w trakcie wprowadzania do odczynnikowych zestawów firmowych (1). Pozostaje pytanie, czy i w jaki sposób standaryzacja metod i harmonizacja oznaczeń kreatyniny w surowicy wpłynie na jej oznaczenia w moczu i zwiększy porównywalność wyników.

Metody oznaczania białka w moczu również są zróżnicowane i obejmują modyfikacje metody biuretowej, metody turbidymetryczne z kwasem sulfosalicylowym lub trichlorooctowym oraz metody barwnikowe. Nie są również określone materiały odniesienia stosowane do ich kalibracji. Trwają badania dotyczące zastąpienia oznaczeń białka pomiarami wydalania albumin, co zmniejszy zmienność metodyczną, jest jednak związane ze wzrostem kosztów. W chwili obecnej jednak nie ma jeszcze dostatecznej ilości danych, aczkolwiek dobowe wydalanie albumin znalazło zastosowanie szczególnie w monitorowaniu zagrożenia nefropatią cukrzycową.

Różnice w określeniu punktu odcięcia dla wydalania białka

Dane odnośnie ilości białka wydalanego w ciągu doby przez prawidłowo funkcjonujące nerki nie są ściśle zdefiniowane. Przyjmuje się, że w warunkach fizjologicznych dobowe wydalanie waha się w grani-

cach 150-200mg/24 godz., a przekroczenie 300mg wskazuje na istotny białkomocz. Jednak autorzy różnych publikacji (wg 4) przyjmują różne wartości, co sprawia trudności w porównywaniu wartości klinicznej wyników, a jednocześnie sugeruje, że wartości odcięcia mogą być różne dla różnych populacji. Może więc być celowe uwzględnienie tzw. „prawdopodobieństwa przed badaniem” (ang. pretest probability). Dla populacji, w której możliwość wystąpienia proteinurii jest niższa, wartości te powinny być niższe i odwrotnie. Taki sposób postępowania,

uwzględniający ryzyko kliniczne, znalazł zastosowanie również w odniesieniu do innych testów wykluczających.

W cytowanej pracy (4) podawane przez różnych autorów wartości odcięcia dla wydalanania białka wahały się od 150 do 300mg na dobę, natomiast dla współczynnika białko:kreatynina wynosiły one od 17,1 do 56,5mg/mmol, co potwierdza sugestię odnośnie weryfikacji metod wyznaczania wartości granicznych.

Piśmiennictwo:

1. Improving serum creatinine measurements. Report from Laboratory Working Group of the NKDEP. Clin. Chem. 2006, 52, 5.
2. National Kidney Foundation clinical practice guidelines for chronic kidney disease; evaluation, classification and stratification. Am. J. Kidney Dis. 2002, 39, Suppl.
3. Dunwald C., Mercer B.: A prospective comparison of total protein/creatinine ratio versus 24 hour urine protein in women with suspected preeclampsia. Am. J. Obstet. Gynecol. 2003, 189, 848.
4. Price C.P., Newall R.G, Boyd J.C.: Use of protein:creatinine ratio measurements on random urine samples for prediction of significant proteinuria: a systematic review. Clin. Chem. 2005, 51, 1577.

prof. dr hab. Dagna M. Bobilewicz

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

ĆWIERĆ WIEKU WALKI Z AIDS

www.medscape.com/viewarticle

W tym roku przypadają dwie ważne rocznice związane z AIDS, które warto przypomnieć. 25 lat temu 5 czerwca 1981 roku CDC (Center of Disease Control and Prevention) w Stanach Zjednoczonych zgłosiło kilka pierwszych przypadków AIDS, wówczas jeszcze nie posiadającego własnej nazwy. Mija jednocześnie 10 lat od chwili wprowadzenia HAART, czyli wysoko aktywnej terapii antyretrowirusowej (highly active antiretroviral therapy), zwanej „koktajlem” AIDS. Jeszcze w 1995 roku śmierć była nieodłączną konsekwencją choroby. W lutym 1996 roku urząd FDA (Food and Drug Administration) w Stanach Zjednoczonych oficjalnie zarejestrował pierwszy lek – ritonavir, a następnie indinavir. Wkrótce potem zostały zarejestrowane inne inhibitory proteaz. Nadal nie wiemy, czy te leki wytrzymają konkurencję z szybko narastającymi mutantami wirusa. Wiadomo, że szczepionka przeciwko wirusowi HIV to nadal odległa przyszłość, i dlatego problemy prewencji wysuwają się na pierwsze miejsce. W Stanach Zjednoczonych praktycznie został rozwiązany problem przekazywania wirusa noworodkom dzięki stosowaniu terapii lekami przeciwwirusowymi. Liczba zakażonych dzieci w 2004 roku wynosiła tylko 80 w porównaniu z 1000 na początku lat 90. Do zapobiegania infekcji wśród osób dorosłych narażonych na ekspozycję wirusem również przyczyniło się natychmiastowe zastosowanie terapii antyretrowirusowej. Istotnym celem do realizacji jest szerokie udostępnienie badań laboratoryjnych w kierunku zakażenia, a następnie objęcie osób z dodatnim wynikiem programem zapobiegającym przekazywaniu zakażenia, z angielska „prevention for positives”.

Program HAART w formie dostępnej dzisiaj różni się w zasadniczy sposób od formuły sprzed 10 lat. W chwili obecnej jest dostępnych 25 leków w formie dogodnej do przyjmowania przez pacjentów, a kolejnych 20 jest w trakcie ostatniej fazy badań klinicznych.

Problem zakażeń wirusem HIV ma różne natężenie w różnych krajach. W Stanach Zjednoczonych ocenia się, że rocznie wykrywa się 40 tysięcy nowych przypadków, a liczba zakażonych to 1,1 miliona, z czego tylko około 25% otrzymuje właściwe leczenie. Wynika to stąd, że zakażenia dotyczą głównie ludzi z najbardziej niebezpiecznych i najmniej uświadomionych warstw społeczeństwa.

PROBLEM OTYŁOŚCI TRZEWNEJ

Br. J. Diabetes Vasc. Dis. 2006, 6, 58-61., Clinical Laboratory, May 2006, vol.30 No 3.

Otyłość, będąca jedną z przyczyn chorób cywilizacyjnych takich jak cukrzyca, nowotwory, choroby układu krążenia, stanowi problem ogólnoswiatowy. Jest porównywana do epidemii i w różnym stopniu dotyczy różnych krajów. Największa populacja ludzi otyłych (również dzieci) jest w Stanach Zjednoczonych i Wielkiej Brytanii. Ocenia się, że na świecie ponad miliard osób ma BMI > 25, czyli nadwagę, a 300 milionów jest otyłych, czyli posiada BMI > 30. Szczególne zagrożenie stanowi otyłość brzuszna lub wisceralna. W patogenezie otyłości znaczącą rolę przypisuje się prozapalnym adipokinom, produkowanym przez adipocyty. One przyczyniają się m.in. do rozwoju oporności tkanek na insulinę, co pośrednio zwiększa ryzyko wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych. Wykazano również związek otyłości z procesami zapalnymi toczącymi się w ścianie naczyń i manifestującymi się podwyższeniem stężenia hsCRP u osób otyłych. W badaniach INTERHEART oceniających znaczenia poszczególnych czynników ryzyka w wystąpieniu pierwszego zawału serca wykazano, że tak u kobiet, jak i u mężczyzn znaczenie otyłości jest zbliżone do znaczenia nadciśnienia. Leczenie otyłości to poza ograniczeniami dietetycznymi i wysiłkiem fizycznym również leczenie farmakologiczne. Ostatnio zwraca się uwagę na możliwość wykorzystania grupy selektywnych antagonistów receptora kanabinoidowego CB1. W szczególnych przypadkach klinicznych są stosowane zabiegi chirurgiczne – by-pass jelitowy wyłączający część żołądka i jelita cienkiego z procesu trawienia i wchłaniania, lub też dożołądkowe założenie elektrody hamującej apetyt. Największą rolę odgrywają działania zapobiegawcze, głównie populacyjne. Są one realizowane w różny sposób. Przykładowo w Belgii osoby z BMI > 30 mają prawo do bezpłatnych konsultacji z dietetykiem. Kładzie się nacisk na zintegrowane podejście obejmujące również zachęcanie do zwiększenia aktywności ruchowej zarówno w miejscu zamieszkania, jak i szkołach lub zakładach pracy, oraz akcje informacyjne o konieczności odpowiedniego żywienia. W Stanach Zjednoczonych poddaje się pod rozagę wprowadzenie restrykcyjnych ustaleń legislacyjnych w odniesieniu do produktów szczególnie niewskazanych, podobnie jak dzieje się w przypadku papierosów (ściśle określone przepisy o reklamie, konieczność informacji o szkodliwym działaniu na zdrowie).

