

SPIS TREŚCI

- 3 Badania laboratoryjne w różnych stadiach rozwoju
 gammapatii monoklonalnych
 Laboratory tests in different stages
 of monoclonal gammopathy
 Alicja Kendzior, Dagna M. Bobilewicz
- 9 Użyteczność oznaczeń ferrytyny w różnych stanach klinicznych
 ze szczególnym uwzględnieniem chorób nowotworowych
 The usefulness of ferritin measurements
 in clinical practice with emphasis on cancer
 Ewa Leporowska, Aldona Karczewska-Dzionk
- 15 Od Tiseliusa do proteomiki – nowe perspektywy
 analizy składu białek moczu
 From Tiselius to proteomics – new perspectives
 of urine protein analysis
 Ryszard Drożdż, Joanna Tisończyk
- 23 Wpływ niedożywienia na parametry laboratoryjne
 Malnutrition and laboratory tests
 Natalia Kościuk
- 29 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.

kwiecień 2007

Zasady publikowania prac w IN VITRO EXPLORER

do wglądu u dr Beaty Olszewskiej

e-mail: bolszewska@pl.abx.fr

okładka: fragment japońskiego drzeworytu, Hiroshige Ando (1797 - 1858)

„A Full Moon View at Kanazawa of Musashi Province”.

BADANIA LABORATORYJNE W RÓŻNYCH STADIACH ROZWOJU GAMMAPATII MONOKLONALNYCH

LABORATORY TESTS IN DIFFERENT STAGES OF MONOCLONAL GAMMOPATHY

Alicja Kendziorek, Dagna M. Bobilewicz

Streszczenie

Gammapatie monoklonalne zarówno w postaci łagodnej, jak i formie złośliwej stanowią coraz większy problem medyczny. Podstawą ich rozpoznania jest stwierdzenie obecności i określenie rodzaju białka monoklonalnego produkowanego przez plazmocyty (elektroforeza, immunofiksacja), a w okresie leczenia także monitorowanie stężenia wszystkich klas immunoglobulin. Inne badania oceniają zaawansowanie choroby lub jej przejście z formy łagodnej w złośliwą.

Słowa kluczowe

gammapatie monoklonalne, wolne łańcuchy, badania laboratoryjne.

Summary

Monoclonal gammopathies, both MGUS and myeloma multiplex, have become a significant medical problem. Diagnosis is based on the detection and identification of monoclonal protein produced by plasmocytes (electrophoresis, immunofixation) and monitoring of the concentration of all classes of serum immunoglobulin. Other tests estimate the stage of the disease and/or the development from MGUS to myeloma.

Key words

gammopathy, free chains, laboratory tests.

Gammapatie monoklonalne, nazywane także paraneoplaszmiami, są to zespoły chorobowe, w których dochodzi do rozrostu komórki plazmatycznej. Komórka ta stanowi końcowe stadium różnicowania limfocytów B, wytwarza i wydziela określony rodzaj białek odpornościowych – immunoglobulin. Jeżeli więc komórka plazmatyczna zacznie się dzielić, to klon tych komórek będzie produkował ten sam rodzaj białka. Białko to nosi nazwę białka monoklonalnego, a jego rodzaj jest charakterystyczny dla poszczególnych rodzajów gammapatii monoklonalnych. Pojęciem gammapatii monoklonalnej określa się dominację jednego klonu komórkowego produkującego jeden rodzaj immunoglobulin, najczęściej przebiegającą z hipergamaglobulinemią.

Immunoglobuliny są zbudowane z dwóch łańcuchów ciężkich i dwóch łańcuchów lekkich, a ich klasyfikacja jest związana z rodzajem łańcuchów ciężkich. I tak:

Immunoglobulina klasy IgG ma łańcuchy ciężkie gamma (γ).

Immunoglobulina klasy IgA ma łańcuchy ciężkie alfa (α).

Immunoglobulina klasy IgM ma łańcuchy ciężkie (μ).

Immunoglobulina klasy IgD ma łańcuchy ciężkie delta (Δ).

Immunoglobulina klasy IgE ma łańcuchy ciężkie epsilon (ϵ).

Łańcuchy lekkie natomiast mogą być dwóch rodzajów: lambda (λ) lub kappa (κ). W każdej cząsteczce immunoglobuliny obydwa łańcuchy lekkie, jak również obydwa łańcuchy ciężkie są takie same.

Do gammapatii monoklonalnych należą:

- szpiczak mnogi
- makroglobulinemia Waldenströma
- choroba lekkiego łańcucha
- choroba ciężkiego łańcucha

- gammapatia łagodna o nieustalonym znaczeniu (monoclonal gammopathy of undetermined significance MGUS).

W szpiczaku mnogim białko monoklonalne jest zbudowane z całej cząsteczki immunoglobuliny i może być klasy IgG lub IgA (najczęściej), klasy IgD (rzadziej) lub klasy IgE (bardzo rzadko). Często towarzyszy temu białko Bence-Jonesa, czyli wolne łańcuchy lekkie typu kappa lub lambda obecne w moczu. W makroglobulinemii Waldenströma białko monoklonalne zbudowane jest także z całej cząsteczki immunoglobuliny, ale klasy IgM; ten rodzaj gammapatii różni się od szpiczaka obrazem klinicznym.

W chorobie lekkiego łańcucha klon komórek plazmatycznych produkuje tylko lekki łańcuch z cząsteczki immunoglobuliny i może być to białko typu kappa lub lambda. Choroba ciężkiego łańcucha, występująca bardzo rzadko, związana jest z produkcją tylko ciężkiego łańcucha z cząsteczki immunoglobuliny. Może to być ciężki łańcuch gamma, alfa lub mi.

MGUS oznacza występowanie gammapatii monoklonalnej bez innych zmian typowych dla rozrostu komórek chłonnych linii B (1). Jest ona dość często spotykana u osób w starszym wieku i dotyczy nawet do 5% populacji po 70. roku życia. Ze względu na to, że ten typ gammapatii łagodnej w ciągu kilku lat u 70% chorych przechodzi w szpiczaka, jest ona rozpatrywana również jako jego wczesne stadium.

Podstawą rozpoznania wszystkich rodzajów gammapatii jest wykrycie obecności białka monoklonalnego, a także określenie jego stężenia, które jest ściśle związane z zaawansowaniem choroby. We wczesnych stadiach gammapatii monoklonalnych nie zawsze występują charakterystyczne objawy kliniczne; u niektórych pacjentów są one nietypowe i mogą sugerować szereg innych schorzeń. Dlatego też wykorzystanie badań laboratoryjnych nabiera dużego znaczenia nie tylko w diagnostyce, ale również w monitorowaniu le-

czenia czy jak w przypadku MGUS ewentualnego postępu choroby (2).

Badania można podzielić na rutynowe, nasuwające podejrzenie gammapatii, i specjalistyczne, określające rodzaj i stężenie białka monoklonalnego (3). Morfologia jako rutynowe badanie podstawowe w pierwszym okresie może nie wykazywać zmian lub wykazywać niewielki spadek poziomu hemoglobiny i liczby krwinek czerwonych. Zmiany mają charakter normocytowy i normobarwliwy. Krwinki mogą ulegać rulonizacji – szczególnie w zaawansowanym stadium choroby, kiedy w krwi obwodowej znajdują się znaczne ilości białka monoklonalnego. Obecność tego białka może powodować także zasadochłonne wybarwienie tła między krwinkami czerwonymi. We krwi obwodowej rzadko pojawiają się pojedyncze plazmocyty. Liczba krwinek białych i płytek, zazwyczaj prawidłowa, może zmniejszać się wraz z postępem choroby. Charakterystycznym objawem laboratoryjnym jest przyspieszenie opadania krwinek czerwonych (OB) nawet do wartości ponad 100 mm/godz.

W badaniach podstawowych można stwierdzić hiperproteinemię przekraczającą 90 g/l. Stanowi ona bezwzględne wskazania do wykonania rozdziału białek surowicy. Badanie to wykonuje się techniką elektroforetyczną, najczęściej na podłożu agarozowym. W proteinogramie obecny jest charakterystyczny prążek białka monoklonalnego, najczęściej w regionie gamma lub beta, czasami w regionie alfa 2. Wysokość piku (odczytana densytometrycznie) jest proporcjonalna do stężenia białka monoklonalnego.

Kolejnym etapem jest określenie rodzaju białka monoklonalnego, do czego wykorzystuje się technikę immunofiksacji lub immunoelektroforezy przy użyciu przeciwciał swoistych dla poszczególnych immunoglobulin i lekkich łańcuchów. Białko monoklonalne w technice immunofiksacji daje homogeny ostro zaznaczony

prążek, w odróżnieniu od immunoglobuliny poliklonalnej, gdzie precipitat jest rozproszony i rozciągnięty wzdłuż drogi migracji białek. W technice immunoelektroforezy o obecności białka monoklonalnego decyduje kształt łuku precipitacyjnego.

Rodzaje poszczególnych białek monoklonalnych przedstawiają ryciny.

Tymi samymi technikami wykonuje się identyfikację białek monoklonalnych i wolnych łańcuchów lekkich w moczu (4). Przy stężeniu białka całkowitego w moczu poniżej 8 mg/dl konieczne jest jego zagęszczenie.

Istotnym badaniem tak diagnostycznym, jak i prognostycznym jest ilościowe oznaczenie stężenia białka monoklonalnego. Niestety, nie dysponujemy technikami oceny stężenia wyłącznie białka monoklonalnego w danej klasie immunoglobulin. Dokonując ilościowego oznaczenia immunoglobulin (metodą nefelometryczną lub turbidymetryczną) określa się stężenie zarówno immunoglobuliny produkowanej przez prawidłowe plazmocyty, jak i przez komórki nowotworowe.

Należy więc pamiętać, że termin „stężenie białka monoklonalnego” jest tylko pewnym skrótem myślowym, używanym w potocznym języku medycznym i *de facto* dotyczącym całkowitego stężenia immunoglobuliny danej klasy. Jednakże im więcej jest immunoglobuliny monoklonalnej, tym wyższe jest stężenie immunoglobuliny całkowitej.

W ostatnich latach doszedł jeszcze jeden parametr, który dobrze koreluje z zaostreniem procesu chorobowego. Jest to ilościowe oznaczanie wolnych łańcuchów lekkich i ocena stosunku stężenia wolnych łańcuchów lekkich typu kappa do wolnych łańcuchów lekkich typu lambda (5, 6). Podobnie jak w przypadku immunoglobulin oznaczenia te są wykonywane technikami immunonefelometrycznymi i immunoturbidymetrycznymi, ale ze względu na małą w porównaniu

do immunoglobulin cząsteczkę łańcuchów lekkich (około 20 kDa) przeciwciała anty-kappa i anty-lambda są opłaszczane na kuleczkach lateksu, co zwiększa czułość analityczną metody. U osób zdrowych poziom wolnych łańcuchów w surowicy jest bardzo niski, a ich stosunek wynosi od 0,26 do 1,65 i zmienia się wraz ze wzrostem stężenia białka monoklonalnego (7). Białko to ma jeden rodzaj łańcucha lekkiego i w procesie katabolizmu uwalnia się z cząsteczki immunoglobuliny. Rośnie więc stężenie jednego rodzaju łańcucha lekkiego, a stosunek kappa do lambda zmienia się. Z badań przeprowadzonych przez Rajhumara (8) wynika, że nieprawidłowy stosunek kappa do lambda w surowicy chorych w fazie MGUS świadczy o przejściu w fazę złośliwą.

Badanie cytomorfologiczne szpiku jest ostatecznym potwierdzeniem rozpoznania. Typowy dla szpiczaka jest wzrost odsetka plazmocytoz powyżej 10% wszystkich komórek szpiku. Plazmocyty mogą mieć wygląd prawidłowy lub wykazywać atypowe cechy, jak znaczny polimorfizm, wyraźną wielojądrzastość, drobno rozproszoną chromatynę i jąderka świadczące o niedojrzałości. Komórki mogą tworzyć „gniazda plazmocytoz”. Na początku choroby wzrost plazmocytoz jest jedynie umiarkowany – do 10-15%, w zaawansowanych stadiach sięga 80-90%.

Wzmoczone uwalnianie wapnia z kości powoduje wzrost jego stężenia w surowicy zarówno w postaci wolnej, jak i zjonizowanej. Wzrasta również stężenie mocznika i kreatyniny jako wyraz narastającej niewydolności nerek. Typowy jest również wzrost aktywności LDH, której oznaczanie znalazło zastosowanie w monitorowaniu leczenia, podobnie jak beta-2-mikroglobuliny.

Duże znaczenie ma również ocena radiologiczna kości. W szpiczaku występują charakterystyczne ubytki osteolityczne w kościach płaskich (czaszka, żebra, miednica). W makroglobulinemii zmian osteolitycznych się

Tabela Stadia zaawansowania szpiczaka wg Durie i Salmona (3).

STADIUM	KRYTERIA	MASA KOMÓRKOWA (kom. x 10 ¹² /m ²)
I	Wszystkie następujące objawy: 1. Stężenie HB > 100 g/l (> 6,205 mmol/l) 2. Stężenie Ca²⁺ w surowicy ≤ 2,75 mmol/l 3. W badaniu rtg bez zmian kostnych (skala 0*) lub pojedyncza zmiana osteolityczna 4. Białko monoklonalne a) stężenie IgG < 50 g/l b) stężenie IgA < 30 g/l c) wydalenie lekkich łańcuchów w moczu < 4 g/24 h	< 0,6
II	Objawy nie odpowiadające stadium I ani III	0,6-1,2
III	Jeden lub więcej następujących objawów: 1. Stężenie Hb < 85 g/l (< 5,27 mmol/l) 2. Stężenie Ca²⁺ w surowicy > 2,75 mmol/l 3. Zaawansowane zmiany osteolityczne (skala 3) 4. Białko monoklonalne a) stężenie IgG > 70 g/l b) stężenie IgA > 50 g/l c) wydalenie lekkich łańcuchów w moczu > 12 g/24 h	> 1,2
Postać A - prawidłowa czynność nerek, stężenie kreatyniny < 2 mg/dl (180 mmol/l). Postać B – nieprawidłowa czynność nerek, stężenie kreatyniny ≥ 2mg/dl (180 mmol/l).		

*Skala zmian kostnych w szpiczaku mnogim: 0 – bez zmian; 1 – osteoporoza; 2 – pojedyncze zmiany osteolityczne; 3 – nasilone zmiany osteolityczne.

nie obserwuje. W pozostałych gammapatiach zmiany są obecne w zaawansowanych stadiach choroby.

Spośród wymienionych wyżej gammapatii monoklonalnych najczęściej występującą jest szpiczak mnogi.

Według Kyle'a (9) wyróżnia się następujące okresy tej choroby:

- gammapatia o nieustalonym znaczeniu /MGUS/,
- szpiczak tlący (smouldering multiple myeloma SMM),
- szpiczak plazmocytowy uogólniony (myeloma multiplex, plazmocytoza MM).

Opracowane przez Durie i Salmona (3) kryteria diagnostyczne, pozwalające na określenie stanu zaawansowania choroby, zestawiono w tabeli.

Szczególne znaczenie ma wykrycie gammapatii w najwcześniejszym okresie, tj. w fazie MGUS (2). W tym stadium choroby wykrywa się tylko małe ilości białka monoklonalnego, a stężenie immunoglobuliny, w której jest to białko, nie przekracza 20 g/l. Wszystkie pa-

rametry diagnostyczne, z wyjątkiem obecności słabo zaznaczonego prążka białka monoklonalnego, są prawidłowe:

- liczba plazmocytów w szpiku nie przekracza 10%,
- nie stwierdza się obecności lekkich łańcuchów w moczu,
- nie stwierdza się obniżonego stężenia pozostałych immunoglobulin,
- parametry oceniające pracę nerek są prawidłowe.

W szpiczaku tlącym rośnie stężenie białka monoklonalnego do 30 g/l. Wzrasta liczba plazmocytów w szpiku do 30%, ale parametry laboratoryjne oceniające pracę nerek są prawidłowe. Poziom immunoglobulin, pozwalający ocenić humoralną odpowiedź immunologiczną, jest również prawidłowy.

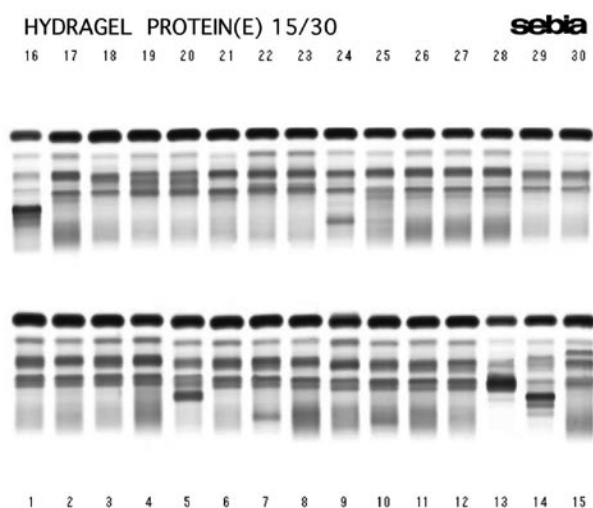
W ostatnim stadium choroby, czyli w szpiczaku uogólnionym, stężenie białka monoklonalnego jest wysokie, często rzędu 80 g/l, a liczba plazmocytów w szpiku

powyżej 50-70%. Dochodzi do uszkodzenia nerek. Powstaje tzw. nerka szpiczakowa cechująca się obecnością w kanalikach i cewkach zbiorczych złogów łańcuchów lekkich. W moczu również wykrywa się wolne łańcuchy lekkie. W nerkach mogą także odkładać się tworzące złogi konglomeraty immunoglobulin monoklonalnych i lekkich łańcuchów, co prowadzi do niewydolności nerek i zespołu nerczycowego. Postępujący proces nowotworowy prowadzi do osłabienia humoralnej odpowiedzi immunologicznej, manifestującej się spadkiem stężenia immunoglobulin. Charakterystyczny jest wynik badania laboratoryjnego: stężenie immunoglobuliny, w której jest białko monoklonalne, jest podwyższone, a nawet bardzo wysokie, a pozostałych – w różnym stopniu obniżone.

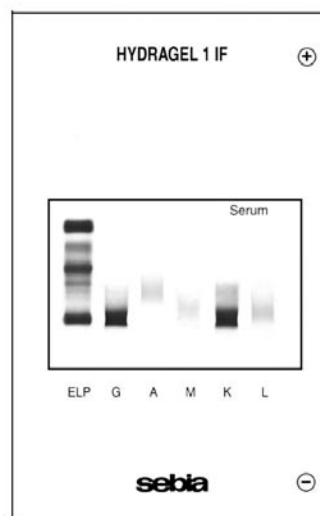
Istnieje jeszcze jedna postać szpiczaka przez jednych traktowana jako jego poronna postać, a przez innych jako osobna gammapatia; nosi ona nazwę choroby lekkiego łańcucha. W chorobie tej nowotworowo rozrastający się klon komórek plazmatycznych produkuje tylko łańcuch lekki, którego obecność w pierwszym okresie choroby wykrywa się w surowicy, w drugim – w surowicy i w moczu, a w trzecim – tylko w mo-

czu. Lekkie łańcuchy mają działanie nefrotoksyczne, dochodzi więc do uszkodzenia nerek, co ułatwia przechodzenie tego białka do moczu. Oznacza to konieczność wykonywania oznaczeń nie tylko w surowicy, ale i w moczu. W tej gammapatii dochodzi również do obniżenia humoralnej odpowiedzi immunologicznej, co manifestuje się niskim stężeniem wszystkich trzech klas immunoglobulin.

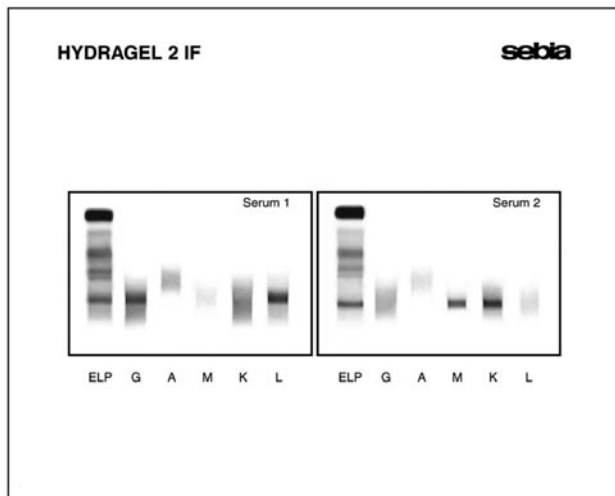
Gammapatie monoklonalne stanowią ok. 1% wszystkich nowotworów oraz 14% nowotworów hematologicznych. Najczęstszym rodzajem gammapatii jest szpiczak mnogi klasy IgG (ok. 50%), i klasy IgA (25%). Na trzecim miejscu jest choroba lekkiego łańcucha (ok. 15%). Liczba wykrywanych gammapatii rośnie z roku na rok i chociaż nie istnieją uznane standardy postępowania w ich diagnostyce, należy pamiętać, że grupę szczególnego ryzyka stanowią osoby z bezobjawową formą łagodną i to one właśnie powinny podlegać monitorowaniu głównie poprzez wykonywanie raz w roku elektroforezy białek. Przy stabilnym i bezobjawowym stanie w przez 3-5 lat biopsja szpiku wydaje się niecelowa, a przebieg może być uznany za łagodny i nie wymagający dalszej uwagi (2).



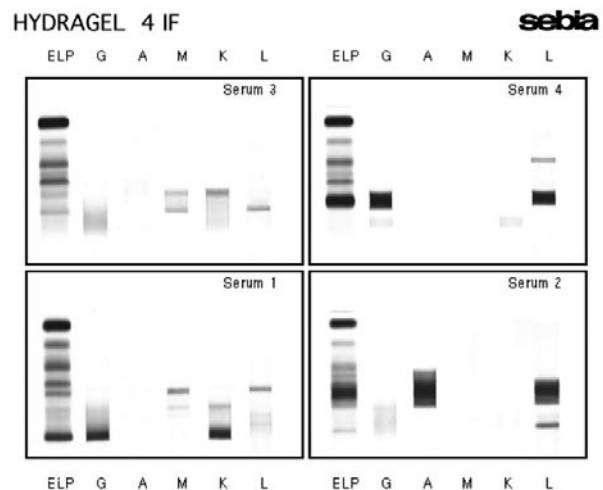
Rys. 1. Rozdział elektroforetyczny białek surowicy na żelu agarozowym. Płytką przeznaczoną do wykonania 30 rozdziałów jednocześnie przy użyciu zautomatyzowanego systemu Hydrasys (Sebia).



Rys. 2. Gammapatia monoklonalna IgG κ .



Rys. 3. 1. Gammapatia monoklonalna IgG λ 2. Gammapatia monoklonalna IgM κ .



Rys. 4. 1. Gammapatia trichonalna IgG κ , IgM κ , IgM λ . 2. Gammapatia monoklonalna IgA λ połączona z wolnym lekkim łańcuchem λ . 3. Gammapatia biklonalna IgM κ oraz IgM λ . 4. Gammapatia monoklonalna IgG λ połączona z wolnym lekkim łańcuchem λ .

Piśmiennictwo:

1. Cesana C., Klersy C.: Prognostic factors for malignant transformation in monoclonal gammopathy of undetermined significance and smouldering multiple myeloma. *J. Clin. Oncol.* 2002, 20, 1625-1634.
2. Walter-Croneck A.: Łagodna gammapatia – podstawy diagnostyki i różnicowania. *Blżej Diagnostyki* 2006, 10, 3-9.
3. Kraj M.: Zespoły chorobowe przebiegające z gammacją monoklonalną. W: Janicki K. (red.): *Hematologia kliniczna*. PZWL, Warszawa 1991.
4. Nowrousian M. R., Brandhorst D., Sammet C.: Serum free light chain analysis and urine immunofixation elektroforesis in patients with multiple myeloma. *Clin. Cancer Res.* 2005, 11, 8706-8714.
5. Drayson M. T., Tang L. X., Drew R. et al.: Serum free chain measurements for identifying and monitoring patients with nonsecretory multiple myeloma. *Blood* 2001, 97, 2900-2902.
6. Katzmann J., Abraham R. S., Dispenzieri A. et al.: Diagnostic performance of quantitative kappa and lambda free light chain assays in clinical practice. *Clin.Chem.* 2005, 52, 878-881.
7. Bradwell A. R., Mead G. P., Carr-Smith H. D.: *Serum free light chain analysis*. Binding Side Publication 2006.
8. Rajkumar S. V., Kyle R. A., Therneau T. M. et al.: Serum free chain ratio in an independent risk factor for progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 2005, 106, 812-817.
9. Kyle R. A.: The monoclonal gammopathies. *Clin.Chem.* 1994, 40/11B, 2154-2162.

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

UŻYTECZNOŚĆ OZNACZEŃ FERRYTYNY W RÓŻNYCH STANACH KLINICZNYCH ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM CHOROÓB NOWOTWOROWYCH

THE USEFULNESS OF FERRITIN MEASUREMENTS IN CLINICAL PRACTICE WITH EMPHASIS ON CANCER

Ewa Leporowska, Aldona Karczewska-Dzionk

Streszczenie

Ferrytyna jest białkiem występującym w każdej komórce organizmu, gdzie pełni funkcję magazynu żelaza. Oznaczenie poziomu ferrytyny jest szczególnie użyteczne w ocenie metabolizmu żelaza, monitorowaniu leczenia żelazem i diagnostyce niedokrwistości.

Wczesne doniesienia na temat poziomu ferrytyny u chorych na nowotwory zwracały uwagę na podwyższony poziom tego markera w surowicy. Oznaczenia poziomu ferrytyny w tkankach guza dawały różne wyniki w zależności od rodzaju nowotworu; np. w przypadkach raka jelita grubego, raka jądra czy raka piersi wykazano wyższy poziom ferrytyny w porównaniu do jej poziomu w tkankach zdrowych, w innych przypadkach, jak np. w pierwotnym raku wątroby, występował spadek poziomu ferrytyny.

Diagnostyczna wartość oznaczeń poziomu ferrytyny jako markera choroby nowotworowej była szeroko podkreślana w literaturze, jakkolwiek nie wyjaśniono mechanizmu tego zjawiska na poziomie molekularnym. Postuluje się trzy możliwe mechanizmy: (a) synteza i uwalnianie ferrytyny przez jednojądrzaste komórki fagocytarne, (b) synteza i uwalnianie ferrytyny z komórek nowotworowych, (c) uwalnianie ferrytyny do krwi wskutek cytolizy komórek guza. Ostatnie doniesienia podkreślają rolę ferrytyny jako markera prognostycznego.

Słowa kluczowe

ferrytyna, metabolizm żelaza, nowotwory.

Summary

Ferritin is the major iron-storage protein present in all cells. The determination of serum ferritin is particularly useful in the diagnosis of iron metabolism, in the monitoring of iron therapy and in the differential diagnosis of anemia. Its level increases rapidly as a result of acute phase reaction. Early views of the relationship between ferritin and cancer come from works demonstrating an increase in total ferritin in the serum of patients with cancer. However, subsequent evaluations of ferritin levels in tumor tissue have revealed a complex, perhaps disease-specific picture. For example, in some cases, such as colon cancer, testicular seminoma and breast cancer, increase of ferritin in tumor tissue versus normal tissue has been reported; in other cases, including liver cancer, decrease of ferritin is seen. The diagnostic value of serum ferritin concentration as a tumor marker has been widely suggested in the literature, although the molecular mechanisms responsible for the changes in the level of ferritin have not been clarified. There are three possible explanations: (a) synthesis and secretion of ferritin by the mononuclear phagocytic system, (b) production and release of ferritin from tumor cells, (c) release of intracellular ferritin into the blood stream due to activation of cytolysis. Recent works emphasize the role of ferritin level as a prognostic marker in various types of cancer. Contradictory findings concerning the relationship between ferritin and cancer reflect the relative paucity of experiments in this area.

Keywords

ferritin, iron metabolism, cancer.

Żelazo jest pierwiastkiem występującym we wszystkich komórkach organizmu. Wchodzi w skład pierścienia porfiryny będącej składnikiem białek hemowych (hemoglobina, mioglobina) uczestniczących w transporcie tlenu cząsteczkowego. Żelazo jest również niezbędnym

kofaktorem enzymów uczestniczących w zasadniczych procesach związanych z cyklem komórkowym: katalaz, peroksydaz, reduktaz rybonukleotydowych, akonitaz, cytochromów. Znaczenie żelaza dla organizmów żywych związane jest nie tylko ze zdolnością przenosze-

nia tlenu, ale również ze zdolnością do przenoszenia elektronów. Występowanie żelaza w postaci jonów żelazawych Fe^{2+} i żelazowych Fe^{3+} sprawia, że może być ono zarówno akceptorem, jak i donorem elektronów. Udział żelaza w procesach oksydacyjno-redukcyjnych opisuje reakcja Fentona:



W wyniku tej reakcji powstają toksyczne rodniki hydroksylowe ($\cdot\text{OH}$) i ponadtlenkowe ($\text{O}_2^{\cdot-}$), które mogą uszkadzać białka, lipidy, DNA, prowadząc do głębokiego zaburzenia mechanizmów komórkowych, a nawet śmierci komórki. Niezbędność żelaza i zarazem jego potencjalna toksyczność wymagają ścisłej kontroli wewnątrzkomórkowego metabolizmu tego pierwiastka (1).

Ferrytyna to białko występujące w każdej komórce organizmu, gdzie pełni funkcje magazynu żelaza i jednocześnie chroni komórkę przed jego szkodliwym działaniem. Ferrytyna zbudowana jest z 24 podjednostek tworzących kulistą powłokę, we wnętrzu której gromadzone są jony żelaza. Jedna cząsteczka ferrytyny o ciężarze cząsteczkowym 450 kDa może wiązać od 2000 do 4500 atomów żelaza.

Występują dwa typy podjednostek apoferrytyny: H i L, które mogą tworzyć ok. 20 izoform różniących się masą cząsteczkową i punktem izoelektrycznym. Stosunek podjednostek H do L w cząsteczce ferrytyny jest zróżnicowany i zależy od typu tkanki i stanu fizjologicznego komórek; w takich tkankach, jak wątroba i śledziona przeważają podjednostki L, zaś w sercu i nerkach przeważają izoformy H. Stosunek H i L nie jest stały i może ulegać zmianom pod wpływem różnych bodźców, takich jak stan zapalny, infekcja, stres

oksydacyjny czy różnicowanie komórki. Podjednostki ferrytyny H i L są kodowane przez różne geny. Gen dla podjednostki H zlokalizowany jest na chromosomie 11, a gen dla podjednostki L – na chromosomie 19. W surowicy znajduje się niewielka ilość ferrytyny L ubogiej w zasoby żelaza. Surowicza ferrytyna może zawierać tak zwaną podjednostkę G, czyli glikozylowaną postać ferrytyny (2). W komórce ferrytyna może występować w postaci rozproszonej lub w lizosomach, zwanych syderosomami, obecnych w makrofagach i syderoblastach.

Wewnątrzkomórkowy metabolizm żelaza opiera się na białkach regulatorowych IRP (iron regulatory proteins) i sekwencjach IRE (iron responsive element), występujących w niepodlegających translacji regionach 5' lub 3' mRNA ferrytyny i mRNA receptora transferyny (TfR). W stanie niedoboru jonów żelaza w komórce IRP przyłącza się do IRE obu mRNA. Związanie IRP z IRE mRNA ferrytyny powoduje zahamowanie translacji i syntezy ferrytyny. Wiązanie IRP z IRE mRNA TfR powoduje wzrost stabilności i w konsekwencji wzrost syntezy receptora transferyny, co skutkuje zwiększeniem transportu żelaza do komórki. Odwrotna sytuacja zachodzi wówczas, gdy mamy do czynienia z nadmiarem żelaza w cytoplazmie komórki (3).

Regulacja syntezy ferrytyny jest uzależniona nie tylko od obecności jonów żelaza. Cytokiny prozapalne, takie jak czynnik martwicy nowotworów ($\text{TNF-}\alpha$), interleukina-1-alfa ($\text{IL-1}\alpha$), IL-6 czy kachektyna indukują syntezę podjednostki H ferrytyny niezależnie od obecności jonów żelaza. Wzrost stężenia ferrytyny w cytoplazmie skutkuje zwiększonym wychwytem żelaza szczególnie przez komórki układu monocytarno-makrofagowego. Regulacja ekspresji ferrytyny odbywa się również przy udziale hormonów i czynników wzrostu. Hormony tarczycy, insulina i insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF-1) mogą indukować ekspresję mRNA podjednostki H i L ferrytyny.

Stężenie ferrytyny w surowicy jest niewielkie w porównaniu z zawartością we wnętrzu komórek. Jej poziom uzależniony jest od biernego pasażu z cytoplazmy komórek do krwi i od czynnego wydzielania przez komórki układu siateczkowo-śródbłonkowego, będącego głównym magazynem żelaza. Obniżone stężenie ferrytyny świadczy o wyczerpaniu się jego zapasów. Dlatego oznaczenie poziomu ferrytyny jest niezwykle przydatne w diagnostyce niedokrwistości z niedoboru żelaza. Prawidłowy lub podwyższony poziom nie zawsze wyklucza niedobór żelaza, ponieważ ferrytyna należy do grupy białek ostrej fazy, a wzmożona synteza może być wywołana aktywacją kaskady cytokin. Cytokiny zarówno hamują uwalnianie żelaza z komórek układu siateczkowo-śródbłonkowego, jak również zwiększają wytwarzanie ferrytyny w aktywowanych makrofagach. Nagromadzenie komórkowego żelaza powoduje spadek dostępności tego pierwiastka dla komórek układu erytrocytarnego, co prowadzi do niewydolności erytropoezy. Taka sekwencja zdarzeń występuje w niedokrwistości towarzyszącej chorobom przewlekłym (przewlekłe zakażenia, zapalenia, choroby nowotworowe, choroby z autoagresji), gdzie stężenie żelaza w surowicy jest obniżone, natomiast stężenie ferrytyny może być prawidłowe lub podwyższone. Tak więc można stwierdzić, że największe znaczenie w odniesieniu do oceny zasobów żelaza ma niskie stężenie ferrytyny, ponieważ jednoznacznie świadczy o jego niedoborze.

Wskazaniem do oznaczeń stężenia ferrytyny jest podejrzenie niedoboru żelaza w grupach podwyższonego ryzyka, do których zalicza się osoby narażone na okresową utratę krwi (krwiodawcy, kobiety po licznych porodach lub obficie miesiączkujące) bądź mające zwiększone zapotrzebowanie na żelazo (ciężarne, szybko rosnące dzieci, rekonwalescenci). Kontrola stężenia ferrytyny jest także zalecana przy substytucji żelazem oraz przed i w czasie tera-

pii erytropoetyną, ponieważ informuje, czy poziom zasobów żelaza umożliwia efektywną erytropoezę. Przyczyn podwyższonego stężenia ferrytyny może być wiele. Do chorób przebiegających ze zwiększonym wychwytem i magazynowaniem żelaza w tkankach należy pierwotna i wtórna hemochromatoza. Hemochromatoza pierwotna jest chorobą dziedziczną wywołaną mutacją w genach HFE, HJV, HAMP bądź TFR2. W wyniku tych mutacji dochodzi do nadmiernego magazynowania żelaza w hepatocytach. Przyczyną wtórnej hemochromatozy może być wzrost podaży żelaza, doustne lub domięśniowe podawanie Fe, nieefektywna erytropoeza, nieprawidłowa synteza hemoglobiny (talasemie) oraz liczne przetoczenia krwi.

W chorobie wywołanej mutacją podjednostki H ferrytyny dochodzi do nadmiernego gromadzenia żelaza z towarzyszącym wzrostem syntezy transferyny (4). W zespole dziedzicznej katarakty związanej z hiperferrytynemią dochodzi do nadmiernej syntezy podjednostki L, która odkłada się w soczewce gałki ocznej (5). Zwiększona ekspresja ferrytyny i odkładanie się żelaza w komórkach nerwowych może doprowadzić do zmian neurodegeneracyjnych.

Podwyższony poziom ferrytyny może być również skutkiem jej uwalniania przez uszkodzone narządy obfitujące w ferrytynę, takie jak wątroba czy śledziona. Podwyższone stężenie stwierdzono również w chorobach przebiegających z uszkodzeniem kłębków nerkowych i proteinurią (6). W wyniku wydalania z moczem transferyny może dochodzić do wzrostu stężenia niezwiązanych jonów żelaza w surowicy, które mogą przyczyniać się do tworzenia wolnych rodników tlenowych uszkadzających komórki śródbłonka naczyń. Odpowiedzią na wzrost poziomu wolnego żelaza jest nasilenie syntezy ferrytyny. W badaniach przeprowadzonych w grupie chorych z zespołem metabolicznym wykazano pod-

wyższy poziom surowiczej ferrytyny; u tych chorych stwierdzono równocześnie podwyższone stężenia triglicerydów i glukozy (7).

Doniesienia na temat podwyższonego poziomu ferrytyny w surowicy chorych na różne rodzaje raka pojawiły się już w latach 70. Źródłem ferrytyny w przypadku choroby nowotworowej mogą być jednojądrzaste komórki fagocytarne oraz komórki guza produkujące i uwalniające ferrytynę na drodze transportu aktywnego lub cytolizy. Badano również poziom ferrytyny w tkankach różnych guzów nowotworowych, uzyskując różne wyniki w zależności od rodzaju nowotworu. W tkankach raka jelita grubego, raka jądra i piersi stwierdzono podwyższony poziom ferrytyny w porównaniu do poziomu w tkankach zdrowych, natomiast jej obniżone poziomy stwierdzono w tkankach pierwotnego raka wątroby (8).

Żelazo oraz jego białka nośnikowe mają właściwości immunomodulacyjne. Zarówno niedobór, jak i nadmiar tego pierwiastka może powodować istotne dla organizmu zaburzenia dotyczące funkcjonowania systemu immunologicznego. Zbyt duża ilość żelaza obniża indukowaną przez przeciwciała oraz stymulowaną przez mitogeny fagocytozę monocytów i makrofagów, powodując przesunięcie w liczebności subpopulacji limfocytów w stronę limfocytów supresorowych oraz zaburzenia dystrybucji komórek immunokompetentnych w różnych przedziałach systemu immunologicznego. Żelazo jest regulatorem ekspresji receptorów powierzchniowych limfocytów, co ma zasadniczy wpływ na ich efektywność. Powyższe zaburzenia w funkcjonowaniu systemu immunologicznego wpływają nie tylko na podwyższoną skłonność do zapadania na różnego rodzaju infekcje, ale też na zwiększone występowanie nowotworów (9). Ostatnio pojawiły się w piśmiennictwie doniesienia dotyczące prognostycznego znaczenia poziomu ferrytyny w chorobach nowotworowych. U chorych na

raka piersi stwierdzono istotną statystycznie korelację pomiędzy poziomem ferrytyny w surowicy oraz poziomem ekspresji ferrytyny w tkankach guza z istnieniem przerzutów nowotworu w węzłach chłonnych. Im wyższe stężenia ferrytyny, tym wyższe ryzyko wystąpienia przerzutów. Jest to o tyle ważne, że przerzuty w węzłach chłonnych są w raku piersi najistotniejszym czynnikiem prognostycznym czasu przeżycia (10).

W raku jelita grubego stwierdzono odwrotną zależność pomiędzy poziomem ferrytyny w surowicy a ryzykiem zachorowania na ten nowotwór (iloraz szans $OR = 0,4$, natomiast 95% przedział ufności CI: 0,2-0,9). Badania były prowadzone w ramach projektu prewencyjnego z użyciem alfa-tokoferolu i beta-karotenu (11). Identyczną zależność stwierdzono we wcześniejszym badaniu dotyczącym kobiet. Jest wiele mechanizmów, za pomocą których żelazo może wpływać na proces kancerogenezy. Żelazo może katalizować powstawanie cząsteczek reaktywnego tlenu, który indukuje uszkodzenia DNA i powoduje zwiększoną proliferację komórek krypt jelitowych oraz tworzenie kancerogennych związków nitrozowych. U chorych z zaawansowanym nowotworem nie stwierdzono zależności pomiędzy poziomem ferrytyny czy żelaza a stopniem zaawansowania raka.

Badano również użyteczność oznaczeń ferrytyny jako markera u chorych z nowotworami głowy i szyi, jednak z powodu niskiej czułości, wynoszącej 10-19%, w porównaniu do np. 89% dla LSA (lipid-associated sialic acid), zrezygnowano z dalszych badań.

Ciekawe są wyniki badań nad stężeniem ferrytyny u pacjentów z rakiem nerki. Z jednej strony stwierdzono, że wyższe stężenie ferrytyny w surowicy wiąże się ze zmniejszeniem ryzyka zachorowania na nowotwór nerki, z drugiej zaś strony zaobserwowano istotny statystycznie wzrost poziomu ferrytyny w surowicy pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem, u których poziom markera rósł wraz ze wzrostem

średnicy guza (12). Ponadto stwierdzono wyższe poziomy ferrytyny w surowicy krwi pobranej wprost z żyły nerkowej, co sugeruje, że jej źródłem mogą być komórki guza. W związku z powyższym w przypadku raka nerki poziom ferrytyny może być markerem prognostycznym.

U chorych na raka płuca czułość oznaczeń ferrytyny w surowicy jako markera wczesnej postaci nie przekracza 40%, a jej swoistość jest niska z uwagi na wielość towarzyszących schorzeń wpływających na metabolizm żelaza, jak np. dysfunkcje wątroby czy przewlekłe infekcje. Większą wartość ma oznaczanie poziomu ferrytyny w popłuczynach oskrzelowych. W przypadku nowotworu stężenia ferrytyny są znacznie wyższe niż w przypadku zmian o charakterze zapalnym czy odczynowym. Spostrzeżenia te potwierdzają teorię o gromadzeniu się ferrytyny w tkankach otaczających guz płuca. Pojawiają się również doniesienia, że wysoki poziom ferrytyny w surowicy (powyżej 300 µg/l) jest związany ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na ten nowotwór.

W przypadku neuroblastoma u dzieci ferrytyna jest istotnym statystycznie markerem prognostycznym. Źródłem ferrytyny są komórki nowotworowe uwalniające ją na drodze transportu aktywnego, a wysoki poziom w surowicy może przemawiać za niekorzystnym rokowaniem.

Badania ekspresji ferrytyny w różnych typach nowotworów na poziomie DNA i RNA przynoszą często sprzeczne wyniki. Modjtahedi i wsp. badali subklony linii komórkowej raka jelita grubego SW 613-S, które różnią się zdolnością do wytwarzania guzów u nagich myszy. Wykazano wyższy poziom ekspresji mRNA ferrytyny H w stosunku do ferrytyny L w klonach o wyższej zdolności tworzenia guzów z jednoczesną wysoką

ekspresją mRNA genu c-myc. Podobnie w linii komórek raka piersi MCF-10 oraz w tkankach raków przewodowych piersi wykazano również wysoką ekspresję mRNA ferrytyny H w porównaniu do tkanek zdrowej piersi. Jednak w przypadku raka przejściowokomórkowego pęcherza komórki o najwyższym potencjale przerzutowania wykazywały najniższe poziomy mRNA ferrytyny w reakcji ilościowej PCR. Niestety w żadnym z powyższych badań nie analizowano poziomu funkcjonalnego białka, co znacznie utrudnia ocenę i interpretację uzyskanych wyników.

W roku 1993 po raz pierwszy udowodniono, że onkogen E1A selektywnie unieczynnia gen ferrytyny H, blokując produkcję tego białka. Podobny mechanizm zaobserwowano również w liniach komórek białaczki. Stwierdzono również, że ponowna wysoka ekspresja genu ferrytyny H w komórce przeciwdziała transformacji nowotworowej.

Transformacja nowotworowa jest związana ze zmianami w kontroli proliferacji komórek. W niektórych typach nowotworów obserwowano zwiększony poziom ferrytyny w przypadku zahamowania podziałów komórek. Odblokowanie genu ferrytyny powodowało również większe różnicowanie się i zahamowanie podziałów komórek szeregu linii hematopoetycznych, a także różnicowanie się preadipocytów do adipocytów.

Z przedstawionych danych wynika, że oznaczanie poziomu ferrytyny zarówno w surowicy, jak i na poziomie komórkowym może być użyteczne nie tylko w ocenie zasobów żelaza, ale również w prognozowaniu i monitorowaniu chorób nowotworowych. Jednakże uzyskane wyniki powinny być rozpatrywane wraz z innymi parametrami klinicznymi i laboratoryjnymi zależnie od typu i stanu zaawansowania nowotworu.

Piśmiennictwo:

1. Halliwell B., Gutteridge J. M.: Protection against oxidants in biological systems: the superoxide theory of oxygen toxicity. In: Free radicals in biology and medicine. New York, NY, Oxford University Press 1989, 86-179.
2. Torti F. M., Torti S. V.: Regulation of ferritin genes and protein. Blood 2002, 99 (10), 3505-3516.
3. Lipiński P., Starzyński R. R.: Rola białek IRP (iron regulatory proteins) w regulacji ogólnoustrojowej homeostazy żelaza: lekcje płynące z badań na myszach z nokautem genów Irf1 i Irf2. Postępy Hig. Med. Dośw. 2006, 60, 322-330.
4. Romanowski T., Sikorska K., Bielawski K. P.: Molekularne podstawy dziedzicznej hemochromatozy. Postępy Hig. Med. Dośw. 2006, 60, 217-226.
5. Cazzola M., Foglieni B., Bergamaschi G. et al.: A novel deletion of the L-ferritin iron-responsive element responsible for severe hereditary hyperferritinaemia-cataract syndrom. Br. J. Haematol. 2002, 116, 667-670.
6. Branten A. J., Swinkles D. W., Klasen I. S. et al.: Serum ferritin levels are increased in patients with glomerular diseases and proteinuria. Nephrol. Dial. Transplant. 2004, 19, 2754-2760.
7. Gonzalez A. S., Guerrero D. B., Soto M. B. et al.: Metabolic syndrome, insulin resistance and the inflammation markers C-reactive protein and ferritin. Eur. J. Clin. Nutr. 2006, 60 (6), 802-809.
8. Vaughn C. B., Weinstein R., Bond B. et al.: Ferritin content in human cancerous and noncancerous colonic tissue. Cancer Invest. 1987, 5, 7-10.
9. Walker E. M. Jr, Walker S. M.: Effects of iron overload on the immune system. Ann. Clin. Lab. Sci. 2000, 30 (4), 354-365.
10. Ulbrich E. J., Lebrecht A., Schneider I. et al.: Serum parameters of iron metabolism in patients with breast cancer. Anticancer Res. 2003, 23, 5107-5109.
11. Cross A. J., Gunter M. J., Wood R. J. et al.: Iron and colorectal cancer risk in the alpha-tocopherol, beta-carotene prevention study. Int. J. Cancer. 2006, 118 (12), 3147-3152.
12. Kashyap M. K., Kumar A., Emelianenko N. et al.: Biochemical and molecular markers in renal cell carcinoma and update and future prospects. Biomarkers 2005, 10 (4), 258-294.

mgr Ewa Leporowska

dr n. med. Aldona Karczewska-Dzionk

Zakład Diagnostyki i Immunologii Nowotworów

Wielkopolskie Centrum Onkologii

Garbary 15, 61-866 Poznań

OD TISELIUSA DO PROTEOMIKI – NOWE PERSPEKTYWY ANALIZY SKŁADU BIAŁEK MOCZU

FROM TISELIUS TO PROTEOMICS – NEW PERSPECTIVES OF URINE PROTEIN ANALYSIS

Ryszard Drożdż, Joanna Tisończyk

Streszczenie

Rzeczywistość technik elektroforetycznych umożliwia wykrycie zmian białkowych moczu oraz diagnostykę procesów patologicznych prowadzących do powstania tych zmian. Metody proteomiczne oparte na kombinacji metod rozdzielania białek, spektrografii masowej i analizie numerycznej wyników dają nowe ekscytujące możliwości diagnostyczne. Jest to nowa jakość, ponieważ diagnostyka procesu chorobowego przy użyciu metod proteomicznych nie polega na monitorowaniu jednego specyficznego markera, lecz na równoczesnej analizie setek białek lub peptydów i tworzeniu unikalnej kilkudziesięcioparametrowej kombinacji markerów. Unikalna kombinacja biomarkerów białkowych może służyć do diagnostyki i wczesnego wykrywania stanów chorobowych. Nowe konstelacje markerów będą się charakteryzować większą czułością i specyficznością, dzięki czemu, jak się oczekuje, powinny sygnalizować istnienie zmian patologicznych na wczesnym etapie ich rozwoju. O dalszym rozwoju technik proteomicznych i ich przydatności w laboratorium analitycznym zadecyduje rozwój technik analitycznych, informatycznych i opracowanie ujednoliconych procedur przygotowania (frakcjonowania) i analizy materiału oraz opracowania procedur walidacji otrzymanych wyników.

Słowa kluczowe

proteomika, elektroforeza, spektrografia masowa, białkomocz.

Summary

The development of electrophoretic techniques makes it possible to detect the urine protein composition and diagnose corresponding pathologies. New proteomic methods based on the combination of protein separation techniques, mass spectroscopy and numerical analysis create new exciting possibilities for clinical laboratory diagnostics. This is due to the fact that the diagnosis of pathological process is based not on monitoring a single marker but on simultaneous analysis of hundreds of proteins or peptides and generating a unique combination of markers and parameters. This unique combination of protein biomarkers constitutes a sensitive tool for early detection of the disease. New marker constellations should display higher sensitivity and specificity, which makes possible early detection of the disease. Future application of proteomics in clinical laboratories will depend on the development of new analytical methods, standardization of the initial material preparation (fractionation) and elaboration of validation procedures.

Keywords

proteomics, electrophoresis, mass spectrometry, proteinuria.

Arne Tiselius w swoim wykładzie wygłoszonym 13 grudnia 1948 r. w trakcie uroczystości związanych z wręczeniem nagrody Nobla podkreślił, że elektroforeza jest jedną z technik separacji, która szczególnie dobrze nadaje się do rozdzielania makrocząsteczek o fundamentalnym znaczeniu dla przebiegu procesów biologicznych. W swoich pracach podawał przykłady wpływu zmian w żywych organizmach na profile rozdzielców elektroforetycznych

białek. Przewidywał także dalszy rozwój elektroforezy związany ze zwiększeniem czułości metod wykrywania białek. W czasach, kiedy Tiselius rozpoczynał swoje pionierskie prace, nie wiedzano niemal nic na temat składu poszczególnych frakcji białkowych ani biologicznej funkcji poszczególnych białek. Następujący w latach 50. i 60. szybki rozwój technik elektroforetycznych doprowadził do tego, że elektroforeza stała się jedną z powszechnie stosowanych metod

diagnostycznych, służących do badania składu białek surowicy i innych płynów ustrojowych – przede wszystkim moczu.

Prawidłowy mocz zawiera niewielkie ilości białka w stężeniu nie przekraczającym 100 mg/l.

Przyczyną zwiększonego stężenia białka w moczu może być przechodzenie białek osocza przez zmienioną w wyniku procesu chorobowego błonę podstawną kłębka nerkowego lub zaburzony proces absorpcji białek w cewkach proksymalnych kanalików nerkowych. Niekiedy przyczyną białkomoczu jest nadmierne wytwarzanie lub uwalnianie do osocza białek o niskiej masie cząsteczkowej, które przechodzą do moczu przez prawidłowo funkcjonującą nerkę. W chorobach związanych z uszkodzeniem błony podstawnej kłębka stopień uszkodzenia strukturalnej integralności błony podstawnej koreluje z wielkością porów błony, a więc z przepuszczalnością dla białek o wysokiej masie cząsteczkowej. Przepuszczalność błony wpływa również na stopień uszkodzenia kłębka, co znajduje odzwierciedlenie w masie cząsteczkowej przechodzących przez nią białek.

W początkowych etapach procesu chorobowego przez błonę podstawną nie przechodzą białka o masie cząsteczkowej większej niż 75 000 D. W moczu stwierdzić można wówczas obecność albuminy – m. cz. 64 000, transferryny – m. cz. 74 000, alfa-1-antytrypsyny – m. cz. 54 000, kwaśnego alfa-1-glikoproteidu – m. cz. 42 000. Ten typ białkomoczu określany jest mianem białkomoczu selektywnego.

W miarę postępującego uszkodzenia błony podstawnej kłębka zaczynają przedostawać się przez nią białka o większych masach cząsteczkowych. Pojawienie się w moczu immunoglobulin świadczy o utracie selektywności kłębka. Ten typ białkomoczu nazywamy nieselektywnym.

Przez pory błony podstawnej kłębka w prawidłowo funkcjonującej nerce nie przechodzą białka o masie

cząsteczkowej większej niż 40 000 D. Białka drobno-cząsteczkowe o masie poniżej 40 000 D, które normalnie przechodzą przez błonę podstawną kłębka, są w ponad 90% resorbowane w cewkach. Pojawienie się białek drobnocząsteczkowych świadczy o uszkodzeniu struktury kanalik nerkowego. Ten typ białkomoczu nazywany jest białkomoczem cewkowym. Oznaczanymi najczęściej markerami uszkodzenia cewek nerkowych jest beta-2-mikroglobulina – m. cz. 10 600, alfa-1-mikroglobulina – m. cz. 13 600, białko wiążące retinol – m. cz. 21 000.

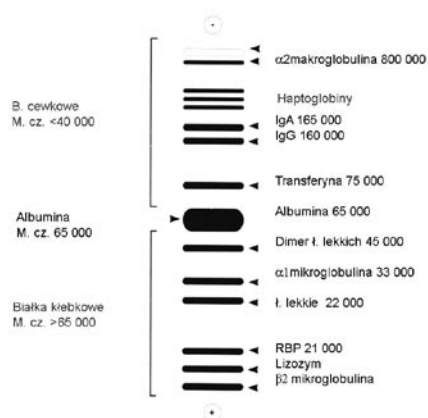
Pochodzące z rozpadu komórek mięśniowych cząsteczki mioglobiny o m. cz. 17 000 przechodzą bez przeszkód nawet przez prawidłową błonę podstawną kłębka i po wysyceniu zdolności absorpcyjnej cewki pojawiają się w moczu. Ten typ białkomoczu, powiązany z nadmiarem wytwarzanych w organizmie białek drobnocząsteczkowych, nazywany jest białkomoczem z nadmiaru.

W chorobach związanych z nowotworowym rozrostem plazmacytów syntetyzowana jest znaczna ilość wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin o masie cząsteczkowej ok. 22 000 D. Po przejściu przez błonę podstawną są przyczyną białkomoczu Bence-Jonesa. Z kolei duże (800 kDa) cząsteczki alfa-2-makroglobuliny, pełniące w osoczu funkcję uniwersalnego inhibitora enzymów proteolitycznych, nie przechodzą nawet przez błonę podstawną kłębka nerkowego o poważnie uszkodzonej strukturze. Ich obecność w moczu świadczy o przechodzeniu białek osocza w wyniku uszkodzenia dolnych części układu moczowego (najczęściej pęcherza). Obecność alfa-2-makroglobuliny nie może być związana z uszkodzeniami jakiegokolwiek struktury nerki. Białkomocz, w którym występuje alfa-2-makroglobulina, określany jest jako białkomocz pozanerkowy (1).

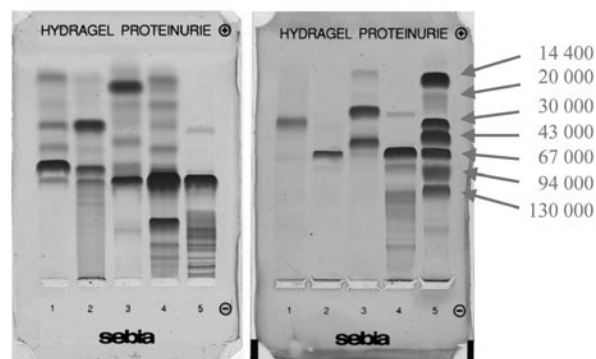
Jak widać, analiza masy cząsteczkowej białek przechodzących do moczu ma istotne znaczenie w usta-

leniu stopnia i miejsca uszkodzenia nerki. Referencyjną metodą pozwalającą na ocenę spektrum mas cząsteczkowych jest SDS-elektroforeza. W metodzie tej opłaszczony detergentem anionowym (siarczanem dodecylu – SDS) cząsteczki białek wędrują w polu elektrycznym, przemieszczając się w trójwymiarowej strukturze żelu poliakrylamidowego. Białka o niskiej masie cząsteczkowej wędrują szybciej. Napotykać przeszkody steryczne ze strony podłoża białka o dużych masach cząsteczkowych wędrują wolniej. Liniowa zależność pomiędzy logarytmem masy cząsteczkowej a szybkością wędrówki na żelu pozwala na określenie masy cząsteczkowej białka (2). Wizualna analiza rozdziału elektroforetycznego białek moczu pozwala na szybką ocenę przyczyny powstawania białkomoczu i ułatwia diagnostykę nieprawidłowości funkcjonowania nerki (ryc. 1).

SDS-elektroforezę prowadzi się najczęściej na żelach poliakrylamidowych, wykonywanych w laboratorium, w złożonym układzie buforowym. Samodzielne wykonywanie żeli poliakrylamidowych bezpośrednio w laboratorium stwarza problemy z powtarzalnością rozdziałów, a przygotowania próbki i dalsza



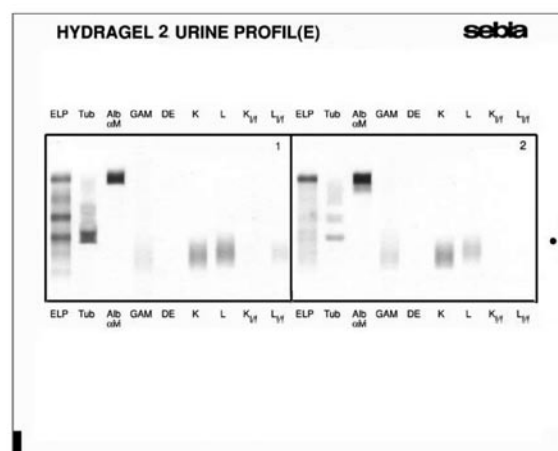
Rys. 1. Schemat migracji białek w SDS-elektroforezie. Migrujące (z góry na dół) opłaszczony detergentem białka w usieciowanej strukturze żelu rozdzielają się wg kryterium masy cząsteczkowej. Rycina przedstawia położenie białek, które mogą służyć za markery klasyfikacji białkomoczu.



Rys. 2. Przykładowe rozdziały białek moczu przeprowadzone na podłożach przeznaczonych do rutynowej diagnostyki laboratoryjnej. Z prawej strony zaznaczono położenia białek wzorca mas cząsteczkowych.

procedura barwienia żelu jest pracochłonna. System Hydrigel 5 Proteinurie firmy Sebia służy do analizy masy cząsteczkowej białek moczu (ryc. 2).

Zautomatyzowany system pozwala na rozdział białek niezagęszczonych próbek moczu, a procedura obróbki żelu wykonywana jest automatycznie. Sebia opracowała także system analizy białek moczu, polegający na wykrywaniu specyficznych dla określonego typu dysfunkcji nerki białek przy użyciu specyficznych przeciwciał (ryc. 3)



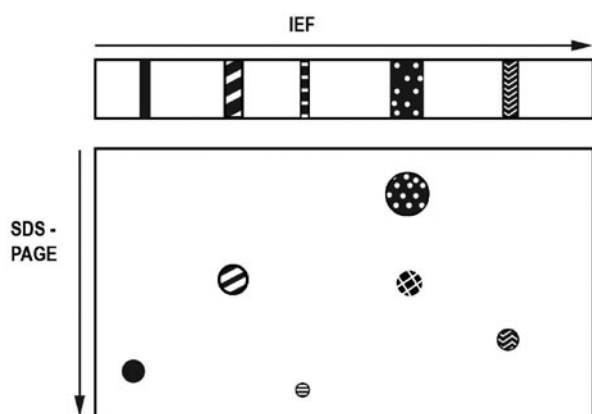
Rys. 3. Profil białek moczu można określić rozdzielając elektroforetycznie białka na żelu agarozowym. Białka markery: białkomoczu cewkowego – Tub, pozanerkowego alfa-M, nieselektywnego kłębkowego – GAM, DE, łańcuchy lekkie κ , λ oraz wolne łańcuchy lekkie wykrywane są metodą immunofiksacji przy użyciu odpowiednich przeciwciał.

Do spektakularnych zmian w składzie białek moczu dochodzi w wyniku procesów patologicznych związanych z zaburzeniami funkcji nerek. Jednak profil białek moczu ulega także zmianie w wyniku procesów patologicznych zachodzących w obszarze układu moczowo-płciowego. Ponieważ białka obecne w moczu są ultrafiltratem białek osocza, zmiany składu białek moczu odzwierciedlają także procesy patologiczne niezwiązane z uszkodzeniami nerek czy dróg moczowo-płciowych. Do niedawna najczęstszą strategią postępowania przy analizie białek moczu było ilościowe oznaczanie wybranych białek, będących uznanymi markerami określonych procesów patologicznych. W miarę rozwoju coraz bardziej złożonych technik analitycznych, pozwalających na równoczesną analizę całego spektrum białkowego obecnego w badanym materiale, coraz wyraźniej dojrzeła koncepcja badania unikalnej konfiguracji kilku lub kilkudziesięciu białek równocześnie. Taka analiza proteomiczna jak odcisk palca w sposób jednoznaczny może wskazywać na proces chorobowy przebiegający w organizmie. Unikalne zmiany w składzie białek moczu mogą pozwalać na wykrywanie chorób, które nie wiążą się z uszkodzeniami nerek. Większość chorób o podłożu genetycznym (w tym nowotworów) wiąże się ze zmianami ekspresji więcej niż jednego genu. Badanie proteomu białkowego moczu (PBM) pozwala na określenie aktywacji genów związanych z ekspresją odpowiadających im białek.

Próbki moczu są materiałem łatwo dostępnym i w związku z tym służą jako idealny materiał do badań laboratoryjnych. Istnieje wiele metod analitycznych pozwalających na proteomiczną analizę profilu białkowego moczu. Ostatnio powstaje coraz więcej prac mających na celu standaryzację procedur służących do analizy proteomu prawidłowego moczu i poszukiwanie profili białkowych związanych z istnieniem określonych procesów chorobowych.

Mimo że mocz jako materiał do badań jest łatwo dostępny, to jest równocześnie uważany za jeden z trudniejszych materiałów do badań proteomicznych. Trudności wynikają ze zmienności składu, a także braku powszechnie przyjętych metod analitycznych. Metody te mogą być łączone w różnych kombinacjach, co utrudnia opracowanie i przyjęcie powszechnie akceptowanego standardu.

Jednym z najczęściej stosowanych etapów analizy PBM jest elektroforeza dwukierunkowa (2-D-elektroforeza) na żelu poliakrylamidowym. Pierwszy etap przygotowania materiału polega na zagęszczeniu i odsoleniu próbki poprzez zastosowanie procedur dializy, liofilizacji, ultrafiltracji, precypitacji acetonem, acetonitrylem lub kwasem trichlorooctowym oraz na selektywnym usunięciu głównych białek moczu (albuminy, transferryny, immunoglobulin). Wzbogacona w białka drobnocząsteczkowe próbka materiału poddawana jest ogniskowaniu izoelektrycznemu. W trakcie tej procedury wzdłuż paska żelu wytwarza się stabilny gradient pH, a cząsteczki białek zatrzymują swoją wędrówkę w polu elektrycznym w takim punkcie żelu, w którym pH odpowiada punktowi izoelektrycznemu (w punkcie izoelektrycznym ładunek cząsteczki białkowej jest równy zero i nie wędruje ona w polu elektrycznym). Po zakończonej procedurze ogniskowania izoelektrycznego otrzymujemy grupy białek o jednakowym punkcie izoelektrycznym. W drugim etapie rozdziału pasek żelu nakłada się na górną część kolejnego żelu i prowadzi się w kierunku prostopadłym elektroforezę w żelu poliakrylamidowym w obecności detergentu (najczęściej siarczanu dodecyłu – SDS). W SDS-elektroforezie, w usieciowanej strukturze żelu, białka rozdzielają się na podstawie masy cząsteczkowej. Po zakończonym rozdziale i wybarwieniu żelu na obecność białka otrzymujemy zespół plamek odpowiadających białkom o ściśle określonej masie



Rys. 4. Schemat elektroforezy dwukierunkowej (2-D). W pierwszym etapie mieszanina białek rozdzielana jest wg kryterium ładunku elektrycznego metodą ogniskowania izoelektrycznego (IEF). W drugim etapie białka są rozdzielane w kierunku prostopadłym wg kryterium masy cząsteczkowej metodą SDS-elektroforezy. Po wybarwieniu otrzymane rozdziały, zawierające setki plamek odpowiadających określonym białkom, są opracowywane metodami cyfrowej analizy obrazu lub po wycięciu z żelu identyfikowane metodami spektrofotografii masowej.

cząsteczkowej i punkcie izoelektrycznym (ryc. 4) 2-D-elektroforeza pozwala, w zależności od rozmiaru żelu, na wyodrębnienie od kilkuset do 2000 białek (3, 4). Analiza złożonego rozdziału elektroforetycznego, składającego się z kilkuset plamek odpowiadających wielu białkom, wymaga specjalnych procedur analitycznych. Jedną z możliwych metod pozwalających na porównanie obrazu rozdziału elektroforetycznego dwóch próbek jest dwukierunkowa elektroforeza różnicowa (two-dimensional difference gel electrophoresis: 2-D DIGE). Białka ba-

danej próbki sprzęgane są z barwnikiem fluorescencyjnym, np. czerwonym. Białka próbki referencyjnej sprzęgane są z innym barwnikiem, np. zielonym. Po zmieszaniu obie próbki rozdzielane są równocześnie na tym samym żelu. Zmiana długości światła wzbudzającego pozwala na przemienne uwidocznienie białek próbki badanej i referencyjnej. Metoda ta umożliwia porównanie stężeń białek pochodzących z dwóch różnych materiałów i ocenę białek, których ekspresja ulega zwiększeniu lub zmniejszeniu.

Białko odpowiadające określonej plamce może być także zidentyfikowane po wycięciu z żelu i analizie z zastosowaniem technik spektrofotografii masowej. W najprostszym wariancie techniki spektrofotografii masowej pozwalają na dokładne określenie masy cząsteczkowej białka lub peptydu. Kombinacje różnych wariantów spektrofotografii masowej i wcześniejszego przygotowania próbki oraz analiza numeryczna otrzymanych danych umożliwia nie tylko identyfikację białka, lecz także określenie sekwencji aminokwasowej i ewentualnych posttranslacyjnych modyfikacji łańcucha polipeptydowego. Istnieje ogromna różnorodność technik identyfikacji białek wykorzystujących technologie spektrofotografii masowej. Poniżej w tabelach przedstawiono schematy ilustrujące różne możliwości analizy proteomu.

Źródłem cząsteczek białkowych wprowadzanych do spektrofotografu masowego może być nie tylko wyciek

Tabela I.

PROCEDURA ANALITYCZNA	UZYSKANY EFEKT
Precypitacja białek moczu acetonem.	Odsolenie i zagęszczenie materiału.
2-D-elektroforeza.	Rozdzielenie poszczególnych białek, możliwość porównania z rozdziałem referencyjnym.
Wycięcie pojedynczych plamek białkowych z żelu, trawienie trypsyną. Otrzymany produkt jest mieszany z nośnikiem organicznym. Krótki impuls światła laserowego powoduje desorpcję i jonizację fragmentów peptydowych (matrix assisted laser desorption ionisation – MALDI). Otrzymana wiązka jonów jest poddana spektrofotografii masowej.	Pocięty w miejscach występowania lizyny i argininy łańcuch polipeptydowy białka daje kombinację krótkich fragmentów peptydowych o ściśle określonej masie cząsteczkowej, co po przeszukaniu bazy danych umożliwia jednoznaczną identyfikację białka. Spektrofotografia masowa jest techniką o dużej czułości. Do analizy wystarcza 10-20 ng białka.

Tabela II.

PROCEDURA ANALITYCZNA	UZYSKANY EFEKT
Precypitacja białek moczu acetonem.	Odsolenie i zagęszczenie materiału.
Rozdział białek metodą wysoko sprawnej chromatografii cieczowej lub elektroforezy kapilarnej	Rozdzielenie poszczególnych białek, możliwość porównania z rozdziałem referencyjnym.
Wyciek z kolumny, zawierający frakcje złożone z niewielkiej ilości białek, wprowadzany jest do spektrografu masowego. Kropelki cieczy są jonizowane i tworzą aerozol (electrospray ionisation – ESI). Czas przelotu (time of flight – TOF) zależy od masy cząsteczkowej białka i jego ładunku elektrycznego. W pierwszej części spektrografu określana jest masa cząsteczkowa białka.	Otrzymana kombinacja krótkich fragmentów peptydowych o ściśle określonej masie cząsteczkowej po przeszukaniu bazy danych umożliwia jednoznaczną identyfikację białka.
W drugiej części spektrografu masowego (tandem mass spektrometry – MS/MS) cząsteczka białka zderza się z atomami obojętnego gazu (collision induced dissociation – CID). W wyniku zderzeń cząsteczka traci kolejne aminokwasy co powoduje ściśle określoną zmianę masy cząsteczkowej.	Na podstawie zmiany masy cząsteczkowej łańcucha polipeptydowego określana jest sekwencja aminokwasowa białka. Możliwe jest także wykrycie posttranslacyjnych modyfikacji białka związanych z hydroksylacją, fosforylacją, glikozylacją itp. Analiza numeryczna otrzymanych danych i zestawienie z bazą danych umożliwia identyfikację nie tylko białek, lecz także zmian posttranslacyjnych związanych z modyfikacją funkcji białka.

z kolumny chromatograficznej lub wycięte z żelu poliakrylamidowego plamki, lecz także matryca zbudowana z wielu aluminiowych płytek pokrytych specyficznymi sorbentami. Każde z pokrytych inną substancją absorbującą pół wiąże grupy białek wg kryterium specyficznego rodzaju oddziaływania, mianowicie grupy: hydrofobowe, hydrofilowe, jonowymienne (wymieniacze kationowe, anionowe), grupy oddziałujące ze skompleksowanymi jonami metali (miedź), grupy wiążące specyficzne substraty, przeciwciała, receptory lub fragmenty kwasów nukleinowych. Powierzchnia matrycy pokrywana jest roztworem analizowanego materiału biologicznego (np. moczu) bez konieczności jego wstępnej obróbki. Po krótkim okresie inkubacji powierzchnia matrycy jest przemywana. Na powierzchni każdego pola pozostają białka oddziałujące ze specyficznym materiałem pokrywającym to pole.

W kolejnym etapie wszystkie pola matrycy (chipa) pokrywane są warstwą substancji organicznej ab-

sorbującej energię światła lasera. Po umieszczeniu w czytniku spektrografu masowego każde z pół kolejno oświetlane jest wiązką lasera. Zaabsorbowana energia powoduje wyparowanie i jonizację białek i peptydów z poszczególnych pół matrycy. Informacje o masie cząsteczkowej, określane w systemie pomiaru czasu przelotu (TOF) spektrografu masowego, a także informacje o intensywności sygnałów z każdego z pola matrycy gromadzone są w bazie danych i poddawane dalszej obróbce numerycznej.

Technologia SELDI-TOF (surface enhanced laser desorption/ionisation) powierzchniowej absorpcji/jonizacji zapewnia wstępne zagęszczenie materiału, oczyszczenie z substancji interferujących (soli), wstępny podział na frakcje według wielu różnych kryteriów oraz analizę profilu peptydowego dla każdego z pół frakcji. Opisana procedura może być w dużej mierze zautomatyzowana, a istniejące obecnie systemy pozwalają na analizę kilkuset próbek materiału dziennie. Ostateczny wynik analizy zawiera tysiące

danych opisujących profile białkowe dla każdego z pól absorpcyjnych. Informacje o intensywności sygnałów białkowych oraz o masach cząsteczkowych białek stanowią unikalny zestaw danych, który jak odcisk palca jednoznacznie identyfikuje określony proces patologiczny. Metody proteomiczne stanowią nową jakość, ponieważ diagnostyka procesu chorobowego nie polega na monitorowaniu jednego specyficznego markera, lecz na równoczesnej analizie setek białek lub peptydów i tworzeniu unikalnej kilkudziesięcioparametrowej kombinacji markerów (5, 6, 7, 8).

Publikowane w ostatnich latach wyniki prac eksperymentalnych wskazują, że analiza składu białek moczu może dostarczać informacji o procesach patologicznych zachodzących w organizmie człowieka (9, 10). Kombinacja elektroforezy kapilarnej i spektrofotografii masowej pozwoliła na analizę 2000 peptydów w moczu pacjentów z nefropatią IgA. Udało się wykryć istnienie specyficznych profili białkowych związanych z przebiegiem choroby, nawet gdy poziom białka całkowitego nie odbiegał od normy (11, 12, 13). Zmiany w składzie białek moczu odzwierciedlają nie tylko zaburzenia funkcji nerek, lecz pozwalają także na wykrycie procesów chorobowych zachodzących w innych narządach, np. raka pęcherza (14, 15), raka prostaty (16) i innych (17).

Metody proteomiczne stanowią nowy ekscytujący dział diagnostyki laboratoryjnej. Umożliwiają wykrycie nowych biomarkerów białkowych służących do diagnostyki i wczesnego wykrywania stanów choro-

bowych. Powinny także dawać możliwość lokalizacji tkankowej/narządowej zmian chorobowych. Nowe konstelacje markerów będą się charakteryzować większą czułością i specyficznością oraz powinny sygnalizować istnienie zmian patologicznych na wczesnym etapie ich rozwoju. Jest to parametr krytyczny w leczeniu nowotworów czy wykrywaniu zmian prowadzących do odrzucenia przeszczepu (18, 19). O dalszym rozwoju metod proteomicznych i ich przydatności w laboratorium analitycznym zadecyduje rozwój technik analitycznych i informatycznych i wypracowanie ujednoliconych procedur przygotowania i analizy materiału, a także opracowanie metod walidacji otrzymanych wyników (20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27).

Wykaz skrótów

ESI (electrospray ionisation) – elektrojonizacja aerozolu w spektrofotografii.

TOF (time of flight) – czas przelotu cząsteczki w spektrofotografii masowej.

MALDI (matrix assisted laser desorption ionization) – jonizacja z udziałem matrycy absorbującej energię lasera.

SELDI-TOF (surface enhanced laser desorption/ionization) – powierzchniowa absorpcja/jonizacja na aktywnej matrycy.

CID (collision induced dissociation) – jonizacja indukowana kolizją cząsteczek.

2-D DIGE (two-dimensional difference gel electrophoresis) – dwukierunkowa elektroforeza różnicowa.

Piśmiennictwo:

1. Amico G., Bazzi C.: Pathophysiology of proteinuria. *Kidney International* 2003, 63, 809-825.
2. Drożdż R.: Zastosowanie spolimeryzowanych form lizozymu do badań ciężarów cząsteczkowych białek w SDS-elektroforezie na żelu poliakrylamidowym. *Diagn. Lab.* 1985, 21, 199-205.
3. Pieper R., Gatlin C. L., McGrath A. M., Makusky A. J. et al.: Characterization of the human urinary proteome: a method for high-resolution display of urinary proteins on two-dimensional electrophoresis gels with a yield of nearly 1400 distinct protein spots. *Proteomics* 2004, 4, 1159-74.
4. Zerefos P. G., Vougas K., Dimitraki P. et al.: Characterization of the human urine proteome by preparative electrophoresis in combination with 2-DE. *Proteomics* 2006, 15, 4346-55.
5. Hu S., Loo J. A., Wong D. T.: Human body fluid proteome analysis. *Proteomics* 2006, 6, 6326-53.
6. Baak J. P., Path F. R., Hermsen M. A. et al.: Genomics and proteomics in cancer. *Eur. J. Cancer* 2003, 39, 1199-215.
7. Boguski M. S., McIntosh M. W.: Biomedical informatics for proteomics. *Nature* 2003, 422, 233-7.
8. Righetti P. G., Castagna A., Antonucci F. et al.: Proteome analysis in the clinical chemistry laboratory: myth or reality? *Clin. Chim. Acta* 2005, 357, 123-39.
9. Thongboonkerd V., Malasit P.: Renal and urinary proteomics: current applications and challenges. *Proteomics* 2005, 5, 1033-42.
10. Schiffer E., Mischak H., Novak J.: High resolution proteome/peptidome analysis of body fluids by capillary electrophoresis coupled with MS. *Proteomics* 2006, 6, 5615-27.
11. Haubitz M., Wittke S., Weissinger E. M. et al.: Urine protein patterns can serve as diagnostic tools in patients with IgA nephropathy. *Kidney Int.* 2005, 67, 2313-20.
12. Park M. R., Wang E. H., Jin D. C. et al.: Establishment of a 2-D human urinary proteomic map in IgA nephropathy. *Proteomics* 2006, 6, 1066-76.
13. Chalmers M. J., Mackay C. L., Hendrickson C. L. et al.: Combined top-down and bottom-up mass spectrometric approach to characterization of biomarkers for renal disease. *Anal. Chem.* 2005, 77, 7163-71.
14. Lin C. Y., Tsui K. H., Yu C. C. et al.: Searching cell-secreted proteomes for potential urinary bladder tumor markers. *Proteomics* 2006, 6, 4381-9.
15. Lokeshwar V. B., Selzer M. G.: Urinary bladder tumor markers. *Urol. Oncol.* 2006, 24, 528-37.
16. Downes M. R., Byrne J. C., Dunn M. J. et al.: Application of proteomic strategies to the identification of urinary biomarkers for prostate cancer: a review. *Biomarkers* 2006, 11, 406-16.
17. Pisitkun T., Johnstone R., Knepper M. A.: Discovery of urinary biomarkers. *Mol. Cell Proteomics* 2006, 5, 1760-71.
18. Schaub S., Wilkins J. A., Rush D., Nickerson P.: Developing a tool for noninvasive monitoring of renal allografts. *Expert Rev. Proteomics* 2006, 3, 497-509.
19. Clarke W.: Proteomic research in renal transplantation. *Ther. Drug Monit.* 2006, 28, 19-22.
20. Gonzalez-Buitrago J. M., Ferreira L., Lorenzo I.: Urinary proteomics. *Clin. Chim. Acta* 2007, 375, 49-56.
21. Thongboonkerd V., Chutipongtanate S., Kanlaya R.: Systemic evaluation of sample preparation methods for gel-based human urinary proteomics: quantity, quality and variability. *J. Proteome Res.* 2006, 5, 183-91.
22. Colantonio D. A., Chan D. W.: The clinical application of proteomics. *Clin. Chim. Acta* 2005, 357, 151-8.
23. Plebani M.: Proteomics: the next revolution in laboratory medicine? *Clin. Chim. Acta* 2005, 357, 113-22.
24. Lin C. Y., Tsui K. H., Yu C. C. et al.: Searching cell-secreted proteomes for potential urinary bladder tumor markers. *Proteomics* 2006, 6, 4381-9.
25. Patterson S. D., Aebersold R. H.: Proteomics: the first decade and beyond. *Nat. Genet.* 2003, 33, 311-23.
26. Aldred S., Grant M. M., Griffiths H. R.: The use of proteomics for the assessment of clinical samples in research. *Clin. Biochem.* 2004, 37, 943-52.
27. Fliser D., Wittke S., Mischak H.: Capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry for clinical diagnostic purposes. *Electrophoresis* 2005, 26, 2708-16.

dr hab. Ryszard Drożdż

Zakład Diagnostyki Katedry Biochemii Klinicznej

Collegium Medicum UJ w Krakowie

mgr Joanna Tisończyk

Pracownia Chemii Białek

Zakład Diagnostyki

Szpital Uniwersytecki w Krakowie

WPŁYW NIEDOŻYWIENIA NA PARAMETRY LABORATORYJNE

MALNUTRITION AND LABORATORY TESTS

Natalia Kościuk

Streszczenie

Prawidłowe żywienie jest niezbędne dla zachowania podstawowych procesów życiowych. Niedostateczne dostarczanie substancji odżywczych lub ich niewłaściwa jakość prowadzi do niedożywienia, którego najczęstszą formą jest niedożywienie kaloryczno-białkowe (PEM) o różnym nasileniu, stwierdzone u około 50% populacji pacjentów szpitalnych. Niedożywienie wydłuża czas pobytu w szpitalu, prowadzi do powikłań, szczególnie pooperacyjnych, i zwiększa śmiertelność, dlatego jego ocena jest istotnym elementem terapii zarówno chorych którzy zostali przyjęci do szpitala w stanie niedożywienia, jak i tych, u których rozwinęło się ono w trakcie hospitalizacji. badania laboratoryjne, w tym oznaczanie albuminy, niektórych białek specyficznych i innych parametrów stanowią – poza badaniami klinicznymi i antropometrycznymi – istotny element tak w ocenie stanu odżywienia, jak i monitorowaniu terapii żywieniowej, szczególnie u chorych hipermetabolicznych.

Słowa kluczowe

niedożywienie, badania laboratoryjne.

Summary

Proper nutrition is essential for maintaining the physiological metabolic processes. Inadequate supply of nutrients or their low nutritional quality lead mainly to different intensity of energy- protein malnutrition (PEM) which is observed in 50% of hospital patients. Malnutrition increases length of stay, causes postoperative complications, impairs wound healing and increases mortality rate so assessment of nutritional status is of a great importance for patients on admission as well as during the stay in hospital. Besides of clinical and anthropometric evaluation, the laboratory tests including albumin and some specific proteins are helpful in assessment of nutritional state and monitoring nutritional therapy especially in hypermetabolic patients.

Keywords

malnutrition, laboratory tests.

Prawidłowe żywienie jest niezbędne dla zachowania podstawowych procesów metabolicznych organizmu. Zaspokojenie zapotrzebowania minimalnego chroni przed wystąpieniem objawów niedoboru i zapewnia tzw. stan równowagi metabolicznej. Jednak optymalny stan zdrowia wymaga dostarczania składników pokarmowych, których ładunek kaloryczny wykracza ponad minimalne zapotrzebowanie, zgodnie z normami żywieniowymi zależnymi m.in. od wieku, płci, rodzaju wykonywanej pracy czy stanów fizjologicznych, takich jak ciąża i okres karmienia. Szczególną grupę stanowią pacjenci, dla których właściwe odżywianie jest dostosowanym do stanu klinicznego elementem leczenia.

Niedożywienie i otyłość to przykłady stanów patologicznych związanych z nieprawidłowym żywieniem. Współcześnie obserwuje się rosnącą grupę osób, czę-

sto młodych, u których zaburzone żywienie ma podłoże psychogenne lub jest efektem nieprawidłowego trybu życia (1, 2, 3).

Niedożywienie jest spowodowane brakiem substratów egzogennych, niezbędnych do wytwarzania energii. Brak ten może być wynikiem niedostatecznej podaży w stosunku do zapotrzebowania lub też niemożliwością odpowiedniego wykorzystania podawanych składników z powodu choroby zasadniczej. Głodzenie proste, któremu nie towarzyszą inne stany patologiczne, prowadzi do pewnego rodzaju adaptacji organizmu, polegającej na obniżeniu tempa przemian metabolicznych. To przystosowanie pozwala na oszczędzanie białek ustrojowych poprzez ograniczenie ich katabolizmu i maksymalne wykorzystanie lipidów jako głównego źródła energii. Ulega zmniejszeniu objętość krwi i wydłuża

się okres półtrwania białek – aczkolwiek utrata białek w granicach 40% zapasów ustrojowych może prowadzić do zgonu. Obserwuje się obniżone stężenie cholesterolu, co jest wynikiem głównie zahamowania jego syntezy. Tego rodzaju niedożywienie nosi nazwę niedożywienia kaloryczno-białkowego (Protein-Energy Malnutrition – PEM). Najcięższe jego formy to: marazm – stan kliniczny przebiegający bez obrzęków, ale prowadzący do opóźnień rozwoju umysłowego u dzieci, niedokrwistości, utraty masy mięśniowej z długo zachowanym poziomem białek i elektrolitów w surowicy; kwashiorkor to postać obrzękowa z bardzo niskim stężeniem albumin, zmianami skórnymi i zanikami mięśniowymi (3). Występują również formy mieszane.

Stan niedożywienia, kojarzony głównie z krajami Trzeciego Świata, w tym obszarze nadal często przybiera formy ekstremalne. W krajach rozwiniętych manifestuje się przede wszystkim ogólnie złym stanem zdrowia, spowodowanym narastającymi niedoborami poszczególnych związków metabolicznych, witamin i mikroelementów, a także zaburzeniami fizjologicznych proporcji pomiędzy nimi (kwasy tłuszczowe, aminokwasy). Prowadzi to do objawów ze strony wielu narządów (zmniejszenie masy i wydolności serca, zaburzenia funkcji przewodu pokarmowego, gruczołów wydzielania wewnętrznego, układu immunologicznego), rzutuje na stan kliniczny i musi być uwzględniane w leczeniu chorych zarówno tych, którzy zostali przyjęci do szpitala w stanie niedożywienia, jak i tych, u których niedożywienie wystąpiło w trakcie hospitalizacji (2, 4). Okazuje się, że w krajach rozwiniętych około 50% pacjentów hospitalizowanych jest niedożywionych. Jak wykazano, niedobory żywieniowe mają istotny wpływ na czas trwania hospitalizacji, dłużej trwa pooperacyjna rekonwalescencja ze względu na powikłania, w tym infekcje ogólne oraz gorsze gojenie się ran.

Przyczyny niedożywienia są różne (1, 2, 3, 4). Najczęstsze z nich:

- zwiększone zapotrzebowanie na pokarmy np. w okresie intensywnego wzrostu, ciąży i laktacji, zwiększonej aktywności fizycznej, nadczynności tarczycy,
- upośledzone wchłanianie z przewodu pokarmowego, wymioty,
- brak łaknienia (w przebiegu chorób pasożytniczych, u osób starszych),
- utrata wysokoenergetycznych związków drogą nerek, płuc, skóry,
- wzajemna niekorzystna interakcja między różnymi składnikami pokarmowymi,
- brak dostępności pożywienia,
- zaburzenia psychiczne lub zmiany charakterologiczne.

U większości chorych sam fakt pobytu w szpitalu, zmiana diety i nawyków żywieniowych powodują obniżenie łaknienia.

U chorych hospitalizowanych możemy mieć dodatkowo do czynienia z niedożywieniem powikłanym zakażeniami bakteryjnymi, sepsą, urazem czy stresem pooperacyjnym, przebiegającymi z podwyższoną ciepłotą ciała. Chorzy hipermetaboliczni nie adaptują się do obniżonego dowozu substratów energetycznych. Aminokwasy są zużywane w procesie glukoneogenezy, mającej na celu zapewnienie stałego poziomu glukozy, i do syntezy białek czynnościowych; dochodzi do utraty białek mięśniowych i wisceralnych, w krótkim okresie narastają niedobory również substancji wysokoenergetycznych. Dotyczy to głównie pacjentów oddziałów intensywnej opieki medycznej, oddziałów zabiegowych, oddziałów onkologicznych. Chorzy ci, nawet przy zastosowaniu terapii żywieniowej (różne formy sztucznego odżywiania), nie są w stanie w pełni wykorzystywać podawanych substratów (3).

Ubytek masy ciała jest jednym z objawów niedożywienia. Zgodnie ze Światową Organizacją Zdrowia niedożywienie stwierdzane jest, gdy wartość parametru

antropometrycznego BMI (Body Mass Index) wynosi poniżej 18,5 kg/m². W zależności od BMI wyróżnia się trzy stopnie niedożywienia: lekkie, gdy BMI mieści w przedziale 17-18,5 kg/m², umiarkowane – BMI 16-17 kg/m² i ciężkie – BMI poniżej 16 kg/m² (1, 2). Klasyfikacja stanu niedożywienia w zależności od wartości BMI wskazuje na istotną rolę badań klinicznych. Badania podmiotowe (wywiad) i przedmiotowe (fizykalne) stanowią pierwszy kontakt lekarza z pacjentem i rzetelnie przeprowadzone pozwalają na wstępną ocenę stanu odżywienia i dobór innych, bardziej szczegółowych metod. W wielu krajach, w tym m.in. w Wielkiej Brytanii, w szpitalach istnieją szczegółowe procedury przeprowadzania wstępnej oceny stanu odżywienia przez zespół pielęgniarski u wszystkich chorych w ciągu 24-48 godzin od przyjęcia.

Celem przeprowadzenia oceny stanu odżywienia jest:

- identyfikacja pacjentów pod kątem korzyści, jakie mogą odnieść z zastosowania leczenia żywieniowego,
- uzyskanie tzw. wartości wyjściowych, względem których będzie można mierzyć efektywność prowadzonego leczenia żywieniowego,
- określenie rodzaju niedoborów i wdrożenie odpowiedniego leczenia.

Ustalenie stopnia niedożywienia ma również znaczenie prognostyczne, pozwala wstępnie przewidzieć dynamikę przebiegu choroby i ustalić postępowanie dietetyczne, co w efekcie przyspiesza proces zdrowienia i skraca okres hospitalizacji. Niedocenianie rozpoznania niedożywienia sprzyja powikłaniom, w tym także infekcjom i w rezultacie przyczynia się do zwiększenia śmiertelności.

Wykazanie istniejących niedoborów i monitorowanie ich uzupełniania powinno być kompleksowym postępowaniem, obejmującym badanie kliniczne, badania antropomorficzne i laboratoryjne. Wśród tych ostatnich poszukuje się wskaźników dostępnych w rutynowym panelu badań laboratorium medycznego (2, 3, 4, 6).

Wprawdzie nie ma idealnego markera stanu białkowo-energetycznego, mogą tu jednak być przydatne ogólne stosowane badania bądź jako pojedyncze, bądź wchodzące w skład wyliczanych wskaźników diagnostycznych i prognostycznych. Markerami stanu odżywienia jest szereg białek syntetyzowanych w wątrobie, aczkolwiek należy pamiętać, że ich stężenia podlegają wpływom również innych czynników, takich jak zmienność biologiczna, funkcje biologiczne, stan nawodnienia, czynność wątroby i nerek (zmiana szybkości syntezy i katabolizmu), czynniki przedanalityczne, leki, terapia hormonalna, stany zapalne. Czynniki te muszą być uwzględnione przy ostatecznej interpretacji wyników. Do najczęściej oznaczanych zalicza się stężenie albuminy i transferyny jako białek o relatywnie długim okresie półtrwania, a także prealbuminy (transtyrektyny), białka wiążącego retinol (RBP), i fibronektyny – jako białek o krótkim czasie półtrwania (fibronektyna – 4 godziny, RBP – 12 godzin).

Stężenie albuminy, badanie ogólnie dostępne i najszersze stosowane, uważane jest za dobry czynnik predykcyjny długości hospitalizacji. Wartości poniżej 30 g/l wskazują na niedożywienie, natomiast poniżej 21 g/l wskazują raczej na znaczną utratę tego białka drogą nerek lub znaczne zmniejszenie syntezy. Istnieją pewne ograniczenia stosowania oznaczeń albuminy. Jej stężenie wzrasta w odwodnieniu, natomiast ponieważ jest ona tzw. ujemnym białkiem ostrej fazy, w stanach zapalnych i infekcjach bakteryjnych jej stężenie obniża się. Należy również pamiętać o tym, że w każdej kolejnej dekadzie życia stężenie albuminy obniża się o około 0,8 g/l.

Rozróżnienie przyczyny hipalbuminemii: stan zapalny czy niedożywienie, jest możliwe dzięki równoległemu oznaczeniu stężenia białka CRP. Ze względu na długi okres półtrwania albuminy (około 20 dni) nie jest możliwe wykorzystanie jej do oceny

krótkoterminowych zmian w stanach niedożywienia. Obniżone stężenie prealbuminy poniżej 10 mg/dl może charakteryzować niedożywienie białkowo-energetyczne (PEM). Poziom prealbuminy w odróżnieniu od albuminy wykazuje stabilność do 9. dekadzie życia. Krótki, wynoszący 2 dni okres półtrwania tego białka sprawia, że zmiany stężeń wykazują dużą dynamikę i wzrost stężenia po wprowadzeniu diety bogatobiałkowej można obserwować już po 72 godzinach (1, 3, 5).

Stężenie transferyny w niedoborach białkowych jest obniżone często poniżej 100 mg/dl. Transferyna podobnie jak albumina i prealbumina jest ujemnym białkiem ostrej fazy, a dodatkowo jej stężenie może być modyfikowane towarzyszącymi często PEM niedoborami żelaza (1, 2, 3).

Stężenie RBP koreluje ze stanem kaloryczno-białkowym PEM, aczkolwiek ma na niego wpływ jego współczynnik przesączania kłębuszkowego i rośnie w niewydolności nerek. Podobnie jak fibronektyna ten wskaźnik znalazł zastosowanie do oceny skuteczności leczenia żywieniowego, szczególnie parenteralnego, w krótkim czasie od jego wprowadzenia.

Są dane wskazujące na to, że insulinopodobny czynnik wzrostu IGF-1 (Insulin-like Growth Factor) może być dobrym markerem PEM, w przeciwieństwie do prealbuminy u chorych septycznych wykazuje dobrą korelację z bilansem azotowym, nie podlega zmianom okołodobowym ani wpływowi innych czynników, jak np. wysiłek fizyczny. Zastosowanie praktyczne tego parametru jest ograniczone ze względu na małą dostępność metod oznaczania (3).

W celu różnicowania pomiędzy stanem ostrej fazy a postępującym niedożywieniem, zwanym stresem metabolicznym, wprowadzono wskaźnik PINI (Prognostic Inflammatory and Nutritional Index) wyliczany według wzoru:

$$\text{PINI} = \frac{\text{CRP mg/l} \times \text{AAG mg/l}}{\text{prealbumina mg/l} \times \text{albumina g/l}}$$

gdzie AAG to alfa-1-kwaśna glikoproteina.

U prawidłowo odżywionych zdrowych ludzi wskaźnik jest niższy od 1. Chorzy z niskim, średnim i wysokim ryzykiem mają wskaźnik odpowiednio 1-10, 11-20, 21-30. Wartość PINI >30 wskazuje na stan zagrożenia życia (2).

Do pośredniej oceny masy mięśniowej znalazło zastosowanie dobowe wydalanie kreatyniny i współczynnik kreatynina/wzrost. Kreatynina powstaje w wyniku hydrolizy kreatyny, uwolnionej w procesie defosforylacji fosfokreatyny; jej wydalanie dobowe jest proporcjonalne do masy mięśni i obniża się w wyniku nasilonego katabolizmu mięśniowego. Wskaźnik kreatynina/wzrost (CHI – Creatinine-Height Index) ocenia beztłuszczową masę ciała.

$$\text{CHI} = \frac{100 \times \text{kreatynina w moczu mg/dobę}}{\text{kreatynina w moczu mg/dobę zdrowej osoby o tym samym wzroście}}$$

Obniżenie masy mięśniowej wyraża się obniżeniem CHI, a wartości 70% wskazują na znaczny jej ubytek.

Do oceny masy mięśni szkieletowych z prawdopodobieństwem +/- 4 kg (kreatynina +/- 5 kg) u osoby o wadze 50-82 kg jest wykorzystywane oznaczanie wydalania 3-metylohistydyny, aczkolwiek trzeba mieć świadomość, że wyniki uzyskiwane metodą HPLC są modyfikowane przez szereg czynników, takich jak dieta o wysokiej zawartości mięsa, a także nasilony katabolizm białek u chorych septycznych (3).

Do innych markerów przydatnych do planowania modelu żywienia i monitorowania leczenia można zaliczyć oznaczanie wolnych aminokwasów w surowicy, których profil jest uzależniony od współistniejącej patologii narządowej. W głodzeniu niepowikłanym ulega obniżeniu stosunek aminokwasów podstawowych do pozostałych, aczkolwiek stężenie aminokwasów nie jest dobrym wskaźnikiem rozwijającego się PEM.

Niedożywienie jest związane z obniżeniem odporności i oznaczanie poziomu immunoglobulin, dopełnia

oraz liczby limfocytów dostarcza dodatkowych informacji. Jednym z podstawowych wskaźników stopnia niedożywienia jest liczba limfocytów. Jej spadek poniżej 800/ml świadczy o znacznym zaawansowaniu niedoborów (2, 3).

Istotną rolę w monitorowaniu terapii żywieniowej, szczególnie u chorych hospitalizowanych, odgrywa oznaczanie bilansu azotowego, który z pewnym uproszczeniem wylicza się w następujący sposób (3).

$$\text{Bilans azotowy} = \text{dobowa podaż azotu (g)} - [\text{dobowe wydalanie azotu w moczu (g)} + 2\text{g}]$$

Istnieją również inne, zbliżone wzory (2).

Azot jest wydalany głównie z moczem w postaci mocznika, kreatyniny i kwasu moczowego, a 2g (w powyższym wzorze) to straty drogą przewodu pokarmowego i skóry. W warunkach nasilonego katabolizmu wzrasta wydalanie azotu. W praktyce bilans azotowy najczęściej jest wykonywany u chorych sztucznie odżywianych (możliwość dokładnej oceny podaży azotu) po rozległych zabiegach chirurgicznych, kiedy zachowanie lub przywrócenie równowagi kaloryczno-białkowej stanowi podstawę gojenia się ran (2, 3).

Ze względu na konieczność uwzględnienia wielu czynników w ocenie stanu odżywienia żaden z pojedynczych parametrów nie spełnia wymogów wskaźnika stanu białkowo-kalorycznego. Zostały podjęte próby opracowania wskaźników wieloparametrowych, z których najprostszym jest pomiar stężenia albuminy i liczby limfocytów.

I tak obniżenie jednego z tych parametrów u pacjentów w stanie ciężkim wskazywał na 20-krotnie większe prawdopodobieństwo zgonu. Tzw. prognostyczny wskaźnik odżywienia (PNI – Prognostic Nutritional Index) uwzględnia stężenie albuminy, transferyny, grubość fałdu skórno i test opóźnionej reakcji skórnej. W praktyce klinicznej znalazło zastosowanie wiele innych wskaźników wieloparametrowych, na ogół łączących badania laboratoryjne i pomiary antropometryczne, żaden z nich nie stanowi jednak optymalnego rozwiązania.

Powyżej omówione wskaźniki dotyczą głównie oceny stanu kaloryczno-białkowego ze względu na to, że narastające niedobory zwłaszcza u chorych hipermetabolicznych mogą stanowić zagrożenie życia.

Odrębny problem stanowią niedobory wybiórcze, które są oceniane szczególnie w ich wczesnej fazie przy pomocy badań laboratoryjnych. Ich najczęstsze przyczyny to:

- zaburzone wchłanianie; często dotyczy witamin i mikroelementów,
- zwiększona utrata pojedynczych składników,
- zwiększone zapotrzebowanie na pojedyncze składniki, często wynikające z uwarunkowań środowiskowych; regulowane powszechnie stosowaną suplementacją żywności,
- nieprawidłowe nawyki żywieniowe; dotyczy często diet drastycznie ograniczających spożycie wybranych produktów.

Piśmiennictwo:

1. Januszewicz W., Kokot F.: Interna. PZWL, Warszawa 2003, 1360-1367.
2. Sobuta E.: Laboratoryjne markery niedożywienia. Badanie i Diagnoza. 2006, 12, 41-51.
3. Megan S., Veldee M. S.: Nutritional assessment therapy and monitoring w Tietz Fundamentals in Clinical Chemistry. Red. Burtis CA, Ashwood ER, Saunders Company 2001, 936-953.
4. Kelly I. E. et al.: Still hungry in hospital: identifying malnutrition in acute hospital admissions. Q. J. Med. 2000, 93, 93-98.
5. Stasik Z., Kulpa J.: Prealbumina jako wskaźnik odżywienia u chorych na nowotwory. Diagn. Lab. 2002, 38, 85-92.
6. Neumeister B., Besenthal I., Liebich H.: Diagnostyka Laboratoryjna. Urban&Partner, Wrocław 2001.

dr n. med. Natalia Kościuk

Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej

Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

ul. Kopcińskiego 22

90-153 Łódź

tel. +48 042 677 66 10

NIEDOKRWISTOŚĆ A ALERGIA

Terapia, październik 2006

Niedokrwistość z niedoboru żelaza występuje najczęściej u niemowląt i dzieci młodszych do 2. roku życia oraz w okresie dojrzewania. Do różnych przyczyn niedoboru, takich jak wzrost zapotrzebowania, niedobory pokarmowe, nawracające infekcje, czynniki upośledzające łaknienie, należy dołączyć również alergię pokarmową. Typową cechą towarzyszącą alergiom pokarmowym niedoborów jest to, że podaż żelaza nie daje oczekiwanych efektów; mogą być one osiągnięte dopiero po wykluczeniu z diety szkodliwego pokarmu, co zostało opisane m.in. u dzieci z nietolerancją białek mleka krowiego. Warunkiem skutecznego leczenia jest zastosowanie diety eliminacyjnej i wspomagającego leczenia antyalergicznego.

CZY CZOSNEK NAS CHRONI

Arch Intern Med. 2007, 167, 125

Czosnek i jego preparaty są szeroko stosowane szczególnie w Stanach Zjednoczonych jako czynnik obniżający stężenie cholesterolu. Wykazano zahamowanie syntezy cholesterolu pod wpływem biologicznie czynnych składowych czosnku *in vitro*. Jednak badania przeprowadzone na grupie 192 osób, otrzymujących 6 razy w tygodniu przez 6 miesięcy czosnek lub jego preparaty w ilości odpowiadającej jednemu ząbkowi dziennie, nie wykazały żadnych zmian w stężeniu cholesterolu LDL, HDL i triglicerydów. Nie wykluczono jednak innego korzystnego działania czosnku, np. jako czynnika przeciwzapalnego czy obniżającego ciśnienie krwi. Jego antyaterogenne działanie może być również związane z faktem spożywania go łącznie z innymi produktami o uznanym znaczeniu, jak pieczywo pełnoziarniste czy popularne potrawy azjatyckie, składające się z dużej ilości warzyw.

SZYBKI TEST WYKRYWAJĄCY ETIOLOGIĘ ZAPALENIA OPON MÓZGOWYCH

www.fda.gov

FDA (Food and Drug Administration, instytucja o wysokim światowym autorytecie, dopuszczająca do sprzedaży m.in. testy diagnostyczne głównie w Stanach Zjednoczonych) dopuścił na rynek najnowszy zestaw testowy, umożliwiający szybkie różnicowanie pomiędzy wirusowym i rzadszym, ale niebezpieczniejszym bakteryjnym zapaleniem opon mózgowych. Ze względu na podobieństwo wczesnego obrazu klinicznego, a jednocześnie możliwość groźnych dla życia powikłań występujących w ciągu kilku dni w zapaleniu bakteryjnym, zastosowanie odpowiedniego leczenia jest sprawą kluczową. Test jest zautomatyzowany, opiera się na izolacji z płynu mózgowo-rdzeniowego materiału genetycznego wirusa i amplifikacji metodą reakcji łańcuchowej odwrotnej transkryptazy. Dotyczy enterowirusów, odpowiedzialnych za ok. 90% wirusowych zapaleń opon mózgowo-rdzeniowych. Wynik uzyskuje się po 2,5 godzinach.

[illegible]

ZAPRASZAMY NA STRONĘ www.horiba-abx.com.pl

o firmie

Horiba Group/Horiba ABX/
Horiba ABX w Polsce/zarys historii firmy

oferta

hematologia/chemia kliniczna/
szybkie testy/elektroforeza f-my Sebia/
technologie informatyczne/weterynaria

serwis

o serwisie/zakres usług/kontakt

technologie

w hematologii/w chemii klinicznej/
szybkie testy/technologie informatyczne

publikacje

in vitro explorer

kluby

klub teraz pentra/klub użytkowników sebia/
pe klub/vet club

ENSOH

W japońskiej kulturze silnie zakorzeniona jest
Buddyjska Szkoła Zen. Wśród jej nauk istnieje
pojęcie „O ENSOH”, które odzwierciedla stan
umysłowej koncentracji oraz zrozumienia.

Poprzez medytację uczy rezygnować z małych
bezwartościowych rzeczy i ostatecznie uwalniać się
od nich. ENSOH znaczy „okrąg”, co zarazem obrazuje
jedną z ważniejszych buddyjskich nauk, że wszystko
co robimy wraca do nas bez względu na to czy jest
dobre czy złe. Człowiek, który ma tego głęboką
świadomość, rozwija w sobie „osobowość ENSOH”.
Staje się łagodny i czysty, żyje w pokoju i harmonii
ze sobą i światem. Taka też idea przyświeca firmie
HORIBA, a znak ENSOH jest tego wyrazem.

Dr Masao Horiba powiedział:

*„Jeśli ludzie na świecie byłiby w stanie
zastosować w życiu duchową świadomość, którą
obdarza nas ENSOH, wszyscy rozumielibyśmy się
i ufali sobie nawzajem, pomimo różnic kultur,
narodów i ras, gdyż byłibyśmy wolni od małych
rzeczy bez znaczenia: mam nadzieję, że nasi
pracownicy będą rozwijać tę postawę”.*