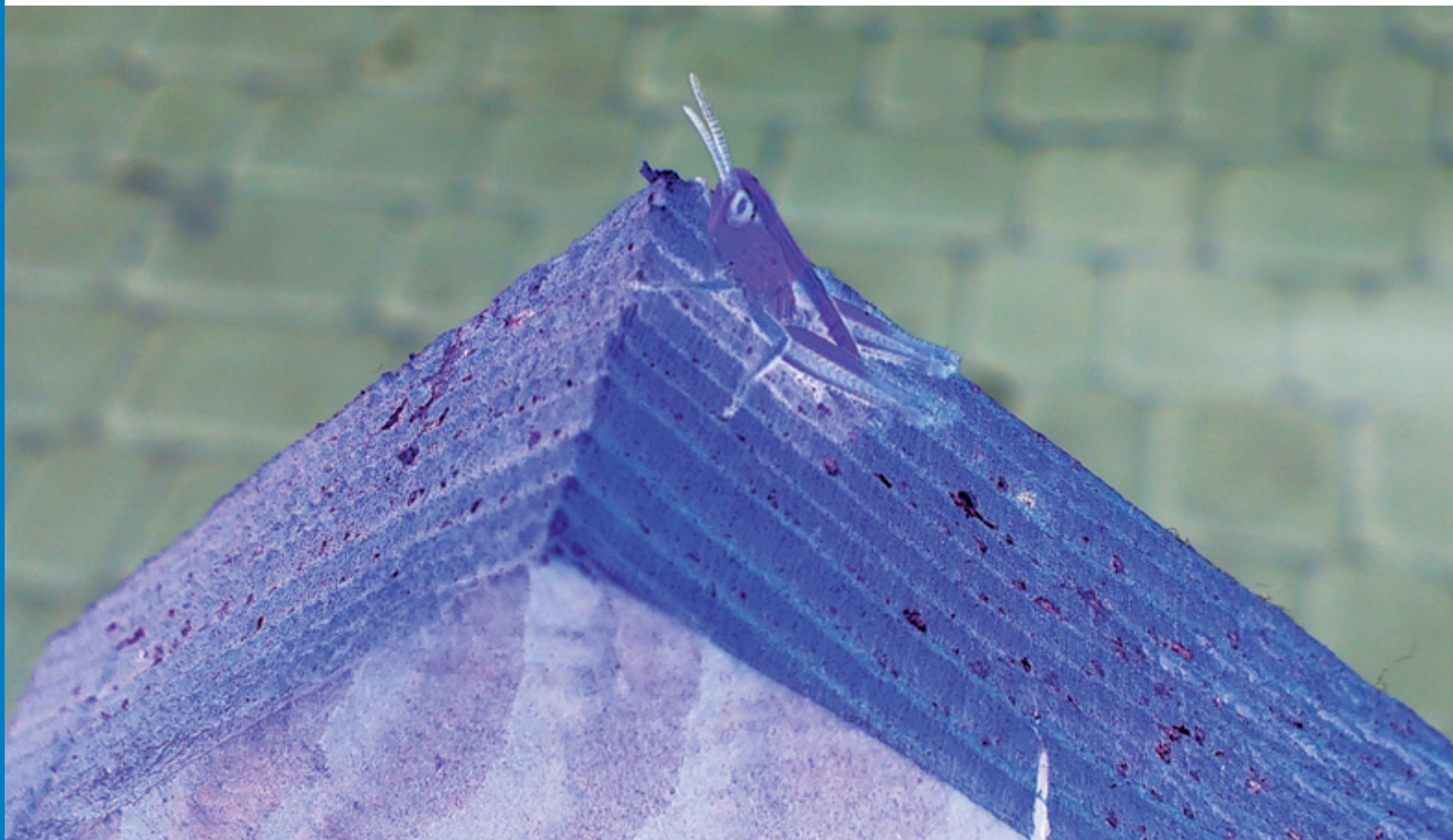


Around the Sample

zeszyt 1 (2) 2015 r.

HORIBA
Medical

Biuletyn Laboratoryjnej Diagnostyki Medycznej



- Krioglobuliny
- Rola oznaczeń retikulocytów w diagnostyce i monitorowaniu niedokrwistości
- Cystatyna C – wczesny wskaźnik niewydolności nerek
- Resweratrol - jego plejotropowe działanie a homeostaza wapniowa organizmu
- Ocena efektywności pracy medycznego laboratorium diagnostycznego
- Porównanie elektroforezy na żelu agarozowym w systemie Sebia HYDRASYS z elektroforezą kapilarną prowadzoną w nowym systemie Sebia CAPILLARYS 2 do analizy białka surowicy
- Doświadczenia własne pracy na wysokowydajnych analizatorach hematologicznych w dużym laboratorium szpitala klinicznego
- Funkcjonalność analizatora hematologicznego Pentra 80XLR w średniej wielkości laboratorium diagnostycznym

HbA1c

HORIBA
Medical

Rozdział o wysokiej rozdzielczości
Prosta formuła liczenia
Precyzja wyniku
Powtarzalność
Liniowość
Certyfikat IFCC

HbA1c
pomiar metodą
elektroforezy
kapilarnej

Minicap Flex Piercing

Szybki i precyzyjny
rodział

Formuła liczenia zgodnie z zaleceniami IFCC
$$HbA1c = HbA1c / (HbA1c + HbA0)$$

sebia

Explore the future

Automotive Test Systems | Process & Environmental | Medical | Semiconductor | Scientific

HORIBA

ABX Pentra 400

Analizator chemii klinicznej

Od testów rutynowych do specjalistycznych
– wszystko w jednym analizatorze

HORIBA
Medical



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

HORIBA ABX Sp. z o.o., Wał Miedzeszyński 598, 03-994 Warszawa, tel. +48 22 673 20 22, fax +48 22 673 20 26, www.horiba-abx.com.pl

Explore the future

Automotive Test Systems | Process & Environmental | Medical | Semiconductor | Scientific

HORIBA

Drodzy Czytelnicy,

Z przyjemnością przekazujemy Państwu kolejny numer naszego czasopisma, które kierujemy nie tylko do diagnostów i lekarzy, ale i do pragnących pogłębiać swoją wiedzę studentów kierunków medycznych.

W czasopiśmie zamieszczamy poglądowe artykuły, a także krótkie doniesienia dotyczące szeroko rozumianej diagnostyki laboratoryjnej, ze szczególnym uwzględnieniem hematologii, biochemii oraz elektroforezy, które są głównym obszarem działalności firmy HORIBA Medical. Autorami prac są znani naukowcy, dydaktycy, doświadczeni specjaliści z różnych dyscyplin diagnostyki laboratoryjnej.

Współczesna medycyna wymaga nieustannego podnoszenia kwalifikacji personelu, jak również wprowadzania nowości technologicznych, dlatego mamy nadzieję, że przedstawiona w niniejszym numerze tematyka wzbudzi Państwa zainteresowanie.

Czytelnikom i współpracownikom HORIBA Medical składamy najserdeczniejsze życzenia wszelkiej pomyślności w 2015 roku.

/ — / **dr Zbigniew Łagodziński**
Dyrektor Sprzedaży i Marketingu
HORIBA ABX Sp. z o.o.

SPIS TREŚCI

- 3 Krioglobuliny**
CRYOGLOBULINS
Joanna Tisończyk, Ryszard Drożdż
- 11 Rola oznaczeń retikulocytów w diagnostyce i monitorowaniu niedokrwistości**
RETICULOCYTES IN DIAGNOSIS AND MONITORING OF ANEMIA
Danuta Haertle
- 15 Cystatyna C – wczesny wskaźnik niewydolności nerek**
CYSTATIN C - EARLY INDICATOR OF KIDNEY FAILURE
Marzena Iwanowska
- 18 Resweratrol - jego pleiotropowe działanie a homeostaza wapniowa organizmu**
RESVERATROL ITS PLEIOTROPIC ACTION AND CALCIUM HOMEOSTASIS
Lukasz Szternel
- 22 Warto wiedzieć**
- 23 Ocena efektywności pracy medycznego laboratorium diagnostycznego**
Zbigniew Łagodziński, Dagna Bobilewicz
- 25 Porównanie elektroforezy na żelu agarozowym w systemie Sebia HYDRASYS z elektroforezą kapilarną prowadzoną w nowym systemie Sebia CAPILLARYS 2 do analizy białka surowicy**
Genevieve Hennache
- 27 Doświadczenia własne pracy na wysokowydajnych analizatorach hematologicznych w dużym laboratorium szpitala klinicznego**
Emilia Czyżewska, Agnieszka Wiśniewska
- 29 Funkcjonalność analizatora hematologicznego Pentra 80XLR w średniej wielkości laboratorium diagnostycznym**
Bożena Gałuszka, Tadeusz Kujawski

Wydawca Around the Sample

HORIBA ABX Sp. z o.o.

Wał Miedzeszyński 598, 03-994 Warszawa

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

www.horiba-abx.com.pl

Redaktor koordynujący: dr Zbigniew Łagodziński, Martyna Mikołajczyk

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

Redakcja: Iwona Knechta

Projekt graficzny: Andrzej Famielec

Skład i łamanie: Gopher U.R.P.

Okładka: Materiały własne Horiba

ISSN 2353-7191

Nakład 1000 egz.

luty 2015

Zasady publikowania prac w Around the Sample

do wglądu u p. Martyny Mikołajczyk

e-mail: martyna.mikolajczyk@horiba.com

Krioglobuliny

CRYOGLOBULINS

Joanna Tisończyk, Ryszard Drożdż

Streszczenie

Krioglobuliny to immunoglobuliny monoklonalne lub kompleksy immunologiczne precipitujące *in vivo* i *in vitro* po oziębieniu krwi w naczyniach włosowatych lub w probówkach po jej pobraniu, do celów diagnostycznych. Biologicznie fenomen krioglobulinemii jest tylko wycinkiem zjawiska niestabilności fizykochemicznej immunoglobulin i ich kompleksów z antygenami i białkami układu dopełniacza. W praktyce laboratoryjno-klinicznej krioglobulinemia jest równie zróżnicowana jak same immunoglobuliny. Różna bywa manifestacja i nasilenie objawów klinicznych, bardzo odmienne bywają formy i własności fizykochemiczne krioprecypitatów. Stosowana obecnie definicja i klasyfikacja krioglobulin nie uwzględnia całej różnorodności biologicznej tego zjawiska. Wobec braku wystandaryzowanych i zoptymalizowanych procedur wykrywania i ilościowego oznaczania krioglobulin, autorzy pragną zwrócić uwagę na użyteczność powszechnie stosowanych procedur analitycznych (elektroforeza, immunofiksacja, ilościowe oznaczenia immunoglobulin i wybranych białek układu dopełniacza), które mogą być pomocne w interpretacji szerokiego spektrum obrazów klinicznych powiązanych z krioglobulinemią.

Adres kontaktowy:

Zakład Diagnostyki Medycznej
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
ul. Świętej Anny 12
31-008 Kraków
joanna.tisonczyk@uj.edu.pl
ryszard.drozd@uj.edu.pl

Summary

Cryoglobulins are monoclonal immunoglobulins or immunological complexes precipitating *in vivo* and *in vitro* in capillary blood vessels or laboratory test tubes in reduced temperature. Biologically cryoglobulinemia comprise only fragment of physicochemical instability of immunoglobulins and their complexes with antigens and complement proteins. In clinical and laboratory practice cryoglobulinemia manifestations are as heterogeneous as immunoglobulins themselves. Differences include clinical manifestations, severity of the disease and physicochemical properties of cryoprecipitates. Widely used definition and classification of cryoglobulins does not cover the full biological heterogeneity of that phenomena. With lack of standardized and optimized procedures of detection and quantitative determination of cryoglobulins authors would like to point out on the utility of commonly used laboratory tests (electrophoresis, immunofixation, quantitative determination of immunoglobulins and selected proteins of complement) which can be useful in interpretation of wide spectrum of cryoglobulin associated clinical syndromes.

Białka w roztworach wodnych są labilne

Białka osocza to niezwykle skomplikowane tworzy o bardzo uporządkowanej strukturze, których funkcja doskonalila się w długim procesie ewolucji. Występujące sporadycznie mutacje, w których dochodzi do zamiany pojedynczej reszty aminokwasowej, skutkują najczęściej zmianami konformacyjnymi, zmniejszającymi stabilność białka w roztworze i podwyższoną zdolnością do denaturacji. Białka, aby pełnić swoje funkcje biologiczne, muszą odznaczać się zdolnością do zmiany konformacji przestrzennej. Zmiany konformacyjne białek zachodzą po związaniu substratu (w przypadku enzymów), czy specyficznych ligandów (w przypadku białek transportowych). To właśnie zmiany konformacyjne białek umożliwiają niezwykle skomplikowane procesy zachodzących po sobie i precyzyjnie regulowanych przemian. Funkcjonalna elastyczność ma swoją cenę. Niektóre białka są niestabilne termodynamicznie i zmiany konformacyjne, zachodzące

pod wpływem różnorodnych czynników fizycznych i chemicznych, prowadzą do precipitacji i tworzenia bezpostaciowych lub precyzyjnie uformowanych depozytów [1]. Immunoglobuliny stanowią szczególną grupę białek, w której ze względu na naturalną zmienność sekwencji aminokwasów w obrębie obszaru cząsteczki odpowiedzialnej za wiązanie antygeny oraz mechanizmy rekombinacji genów generujące zmienność struktury pierwszorzędowej, określenie prawidłowej sekwencji aminokwasów nie jest możliwe. Upraszczając zagadnienie, każda cząsteczka immunoglobuliny jest prototypem zbudowanym z kilku segmentów. Taka zmienność immunoglobulin umożliwia skuteczne wiązanie patogenów, z drugiej jednak strony powstałe „na zamówienie” cząsteczki mają nieprzewidywalne własności fizyczne. Trzeba jednak podkreślić, że o własnościach fizycznych i biologicznych immunoglobulin decyduje nie tylko struktura części hiperzmiennej, odpowiedzialnej za wiązanie antygenów lecz także struktura (zależna od klasy i typu) pozostałych fragmentów białka.

Immunoglobuliny ulegają zmianom konformacyjnym po związaniu z antygenem, umożliwiając w dalszym etapie wiązanie i aktywację białek cytotoksycznej kaskady dopełniacza.

Część stałą łańcuchów lekkich kodują dwie grupy homologicznych genów tworzących dwa odmienne immunologicznie typy łańcuchów lekkich - kappa albo lambda (które dodatkowo można podzielić odpowiednio na 4 lub 6

immunologicznych jest jednym z ważniejszych etapów pozwalających na efektywne usuwanie patogenów, immunoglobuliny są białkami, które w roztworze wodnym są mało stabilne. W opracowanej przez Cohna metodzie frakcjonowania białek osocza immunoglobuliny wytrącają się już na początkowych etapach procedury, przy znacznie niższych stężeniach czynników precypitujących niż, np. albumina, która wytrąca się dopiero w 40% etanolu.

Zróznicowanie własności i funkcji immunoglobulin

Klasa	Podklasa	Masa cz.	Wybrane własności	Okres półtrwania	Wiązanie dopełniacza	Przechodzenie przez łożysko	Inne
IgG	IgG1	Monomer 150kDa	Wiąże antygeny białkowe	20 dni	Tak	Tak	Aktywacja dopełniacza następuje na agregatach immunologicznych
	IgG2	Monomer 150kDa	Wiąże antygeny oligosacharydowe	4 dni	Tak	?	
	IgG3	Monomer 150kDa	Wiąże antygeny białkowe	20 dni	Tak	Tak	
	IgG4	Monomer 150kDa		20 dni	Nie	Tak	
IgA	IgA1	Monomer lub dimer sekrecyjny 160/385kDa	Wytwarzana głównie w szpiku monomer	4 dni	Nie	?	Formy wydzielnicze połączone z peptydowym białkiem wiążącym i receptorem sekrecyjnym
	IgA2		Błony śluzowe dimer	4 dni	Nie	?	
IgM		Pentamer 900kDa	Euglobulina	4 dni	Tak	Nie	Pojedyncza cz. aktywuje dopełniacz

podtypów). Łańcuchy ciężkie immunoglobulin występują w pięciu podstawowych formach określających klasę przeciwciała. Immunoglobuliny klasy IgG podzielono na cztery podklasy a IgA na dwie podklasy. Zarówno klasa przeciwciała, jak i jego podklasa, determinują szereg własności fizycznych i biologicznych cząsteczki.

Podsumowując immunoglobuliny to duża grupa białek o zróżnicowanej strukturze i własnościach biologicznych. Podstawową funkcją przeciwciał jest usuwanie patogenów – zarówno komórkowych, jak i rozpuszczalnych struktur zbudowanych, np. z białek, oligosacharydów, lipidów, kwasów nukleinowych i innych. Antygeny, które łączą się z immunoglobulinami tworzą wielkocząsteczkowe agregaty, które precypitując, tracą swoją aktywność biologiczną a następnie w procesie fagocytozy mogą być poddawane dalszej destrukcji przez szerokie spektrum enzymów litycznych. Ze względu na fakt, że precypitacja kompleksów

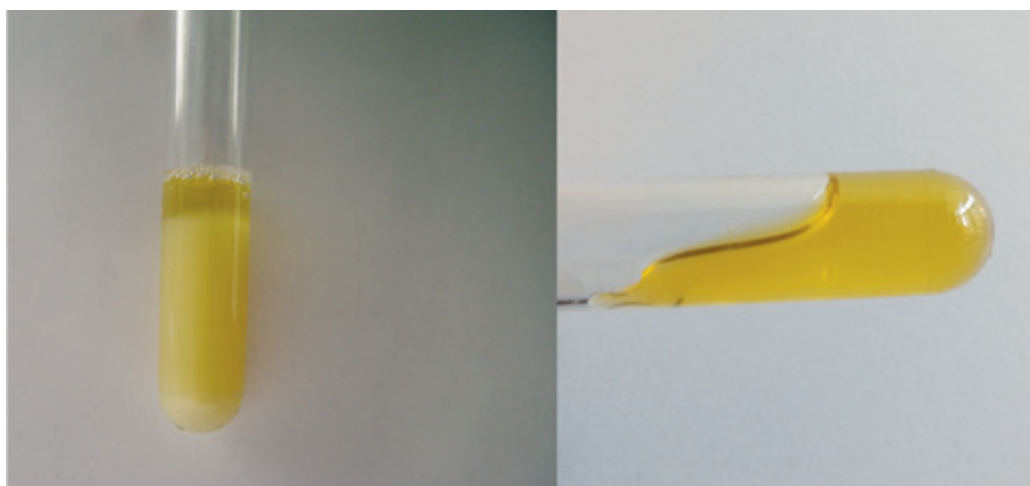
Depozyty białkowe są przyczyną wielu chorób

Istnieje wiele jednostek chorobowych, których mechanizm związany jest z tworzeniem depozytów białkowych. Jedną z takich grup chorób są amyloidozy. Cechą charakterystyczną amyloidoz jest tworzenie fibrylarnych uporządkowanych depozytów białkowych w przestrzeni pozakomórkowej. Strunowe, poskręcane depozyty białkowe formowane są przez prawidłowe białka (transtyretynę w amyloidzie starczej, białko amyloidowe A w amyloidzie odczynowej), jak i białka, w których w wyniku mutacji doszło do zmiany struktury pierwszorzędowej (fibrynogen czy niektóre formy apolipoproteiny A1). Niestabilna cząsteczka hemoglobiny zawierająca pojedynczą mutację w strukturze łańcucha beta globiny przy niskich ciśnieniach parcjalnych tlenu wytrąca się z roztworu, tworząc fibrylarne wewnątrzkomórkowe depozyty wpływające na kształt krwinki w anemii sierpowatej.

Patologiczne depozyty białkowe mogą tworzyć zarówno kompletne cząsteczki immunoglobulin, jak i ich fragmenty. Syntetyzowane w przebiegu gammapatii monoklonalnych wolne łańcuchy lekkie mogą tworzyć zarówno uporządkowane fibrylarne struktury białkowe (AL amyloidoza), jak i amorficzne depozyty w przypadku choroby depozytów łańcuchów lekkich (Light Chains Deposition Disease). Charakterystyczne jest to, że w przypadku AL amyloidozy dominują łańcuchy typu lambda, podczas gdy amorficzne depozyty powstające w obrębie błony podstawnej kłębuszka nerkowego tworzone są znacznie częściej przez łańcuchy typu kappa). Istnieją nieliczne przypadki amyloidozy,

a gdy wraz ze strumieniem krwi docierają do miejsc o wyższej temperaturze, aktywowany zostaje układ dopełniacza. Masywna hemoliza powodowała pojawienie się w moczu znacznych ilości hemoglobiny, zabarwiając mocz na kolor brunatno-brązowy [7]. Szczegółowy mechanizm lizy erytrocytów jest zróżnicowany i powiązany z klasą i typem autoprzeciwciał [8, 9].

Po obniżeniu temperatury (np. w wystawionych na chłód naczyniach włosowatych skóry) precypitują także niezwiązane z antygenem immunoglobuliny lub kompleksy antygen przeciwciała (Ryc. 1).



Ryc. 1. Różne formy precypitatów krioglobulinowych (kłaczkowaty, szklisty) odzwierciedlają zróżnicowane własności fizykochemiczne immunoglobulin.

w których uporządkowane włókna zbudowane były z łańcuchów ciężkich. W zespole Fanconiego wolne łańcuchy lekkie immunoglobulin tworzą wewnątrzkomórkowe białkowe struktury krystaliczne [2].

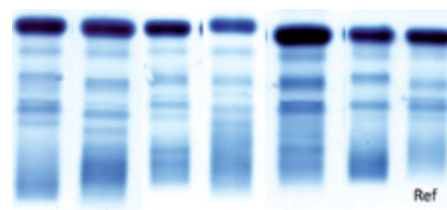
Opisano także rzadkie przypadki powstawania zewnątrz i wewnątrzkomórkowych struktur krystalicznych w kształcie prętów, igieł lub prostopadłościanów związanych z chorobami limfoproliferacyjnymi [3]. Obecność romboidalnych kryształów białkowych wykryto także w płynie stawowym pacjentki ze szpiczakiem mnogim. Co ciekawe, w surowicy i płynie stawowym pacjentki wykryto obecność krioglobulin [4, 5, 6].

Konformacja i stabilność białek zależą od temperatury

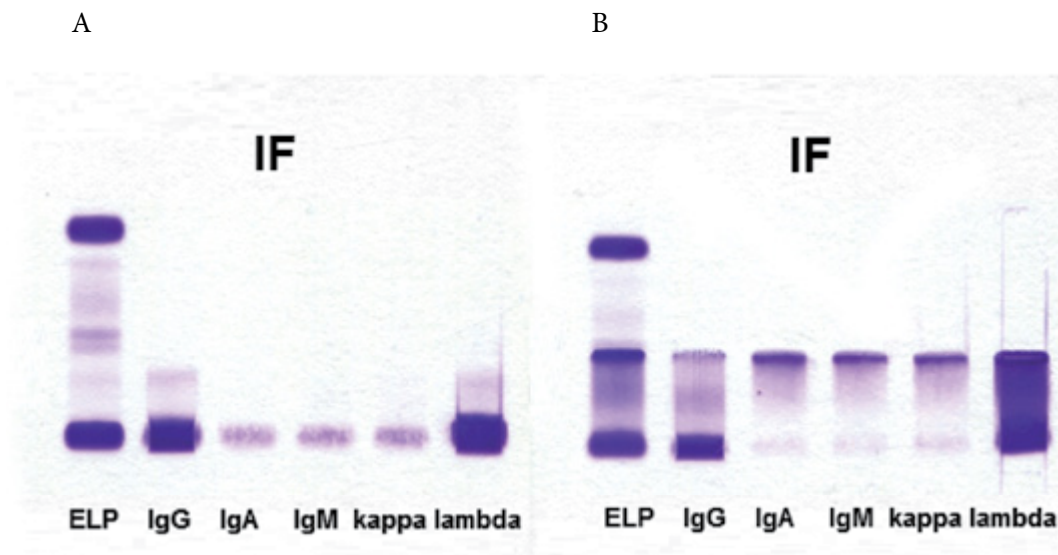
Immunoglobuliny i kompleksy immunologiczne zmieniają swoje właściwości fizykochemiczne także w wyniku działania temperatury. Historycznie istnieje wiele opisów napadowej zimnej hemoglobiunurii oraz choroby zimnych hemaglutynin, towarzyszących niektórym chorobom zakaźnym. Po obniżeniu temperatury, opłaszczające krwinki czerwone przeciwciała ulegają zmianom konformacyjnym,



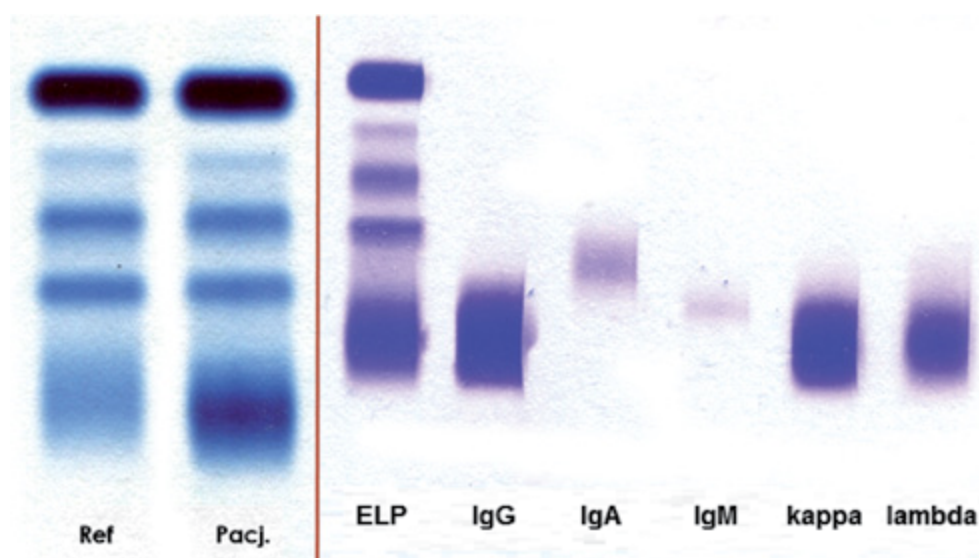
Ryc. 2. Wstęga Waltmana. Po dodaniu surowicy zawierającej duże ilości IgM do wody destylowanej widoczne są białe pasma nierozpuszczalnej w wodzie euglobuliny.



Ryc. 3. Elektroforetyczne rozdziały „krioglobulinowe”. Na tle hipergammaglobulinemii poliklonalnej w obszarze gamma widać słabo zarysowane prążki. Ref – prawidłowy rozdział surowicy.



Ryc. 4. W trakcie ogrzewania krioglobuliny mogą zmieniać swoją konformację, stopień agregacji i ruchliwość elektroforetyczną. Immunofiksacja krioglobuliny typu I przed (A) i po (B) ogrzaniu próbki.



Ryc. 5. Obraz elektroforezy i immunofiksacji surowicy 21 letniej pacjentki z zespołem Sjögrena. W elektroforezie widoczna hipergamaglobulinemia poliklonalna. W immunofiksacji można zauważyć wąską przypominającą białko monoklonalne strefę immunoglobuliny klasy IgM. W badaniach dodatkowych stwierdzono niskie stężenie białka C4 układu dopełniacza.

Krioglobuliny

Białkowe precipitaty powstające po oziębieniu surowicy, które ulegały powtórnemu rozpuszczeniu po ogrzaniu próbki, zostały po raz pierwszy opisane przez Wintroba i Buella w latach 30. Klasyczne objawy kliniczne, manifestujące się zaburzeniami krążenia w naczyniach kapilarnych, związane były z gammapatią monoklonalną [10]. W roku 1947 Lerner i wsp. wprowadził termin krioglobuliny a próba klasyfikacji krioglobulinemii została podjęta przez Broueta i wsp. w latach 70. [11].

Zaproponowany przez Broueta i stosowany do dzisiaj podział wyróżnia trzy typy krioglobulin:

Typ I – to precipitujące w obniżonej temperaturze białko monoklonalne wytwarzane przez nowotworowo roz-

rośnięty klon plazmocytów w przebiegu różnych chorób limfoproliferacyjnych - najczęściej szpiczaka mnogiego. Szacuje się, że krioglobulinemia występuje u ok 1% pacjentów z gammapatią monoklonalną. Szczególnie silną tendencją do krioprecypitacji odznaczają się immunoglobuliny klasy IgM. Krioglobulinemia występuje u ok 10% pacjentów z makroglobulinemią Waldenstroma. Opisano także pojedyncze przypadki krioglobulinemii związanej z obecnością wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin [12, 13].

Typ II towarzyszy wielu chorobom zakaźnym, wirusowemu zapaleniu wątroby typu C a także chorobom autoimmunologicznym, w których obserwuje się czasem równocześnie zimne aglutyniny. W typie drugim

obserwujemy wysokie stężenie poliklonalnych immunoglobulin klasy IgG wiążących się z antygenami patogenów lub (oraz) z autoantygenami. Równocześnie, metodami elektroforetycznymi, w surowicy można wykryć intensywną strefę immunoglobuliny IgM przypominającą strefę białka monoklonalnego obserwowaną u pacjentów z gammapatią monoklonalną [14]. W skład immunoglobuliny IgM towarzyszącej kriglobulinemii typu II wchodzi niemal zawsze łańcuch kappa typu III a repertuar genów kodujących fragmenty zmienne łańcucha lekkiego i ciężkiego jest bardzo ograniczony [15]. Mechanizm wytwarzania „pseudomonoklonalnych” cząsteczek IgM u pacjentów zakażonych żółtaczką typu C jest przedmiotem badań [16]. „Pseudomonoklonalna” immunoglobulina IgM ma wysokie powinowactwo do immunoglobulin IgG, ma więc charakter czynnika reumatoidalnego.

Typ III kriglobulinemii także towarzyszy całemu spektrum przewlekłych infekcji wirusowych i bakteryjnych oraz chorobom autoimmunologicznym. Podobnie jak w kriglobulinemii typu II, stężenia poliklonalnych immunoglobulin klasy IgG są wysokie, natomiast w odróżnieniu od kriglobulinemii typu II wykazujące cechy czynnika reumatoidalnego, immunoglobuliny klasy IgM są poliklonalne.

Kriglobulinemia typu I oraz II jest przez niektórych badaczy łączona w jedną wspólną grupę kriglobulinemii mieszanych.

tów oddzielenie kriglobuliny od surowicy jest praktycznie niemożliwe. U innych pacjentów z kriglobulinemią typu I, po oziębieniu próbki surowicy wytrąca się wyraźny kłaczkowaty osad, który łatwo można odseparować od reszty surowicy (Ryc. 2).

Co ciekawe, obserwowane w laboratorium zjawiska kriglobulinemii towarzyszące obecności białka monoklonalnego nie zawsze dają objawy kliniczne, wywołane zwykle zwiększoną lepkością osocza.

Inna grupa kriglobulin, z którą spotykają się laboratoria diagnostyczne, to materiał pochodzący od pacjentów, u których zauważono objawy kliniczne mogące świadczyć o istnieniu kriglobulinemii. Do charakterystycznych objawów klinicznych należą – zespół Raynauda (sinienie skóry wystawionej na obniżoną temperaturę), zmiany w obrębie siatkówki oka, zapalenie i owrzodzenia skóry, zapalenie kłębuszków nerkowych i wiele innych [18]. Testy na obecność kriglobulin wykonuje się także u pacjentów z rozpoznanymi jednostkami chorobowymi, którym kriglobulinemia często towarzyszy – żółtaczka typu C i inne przewlekłe zakażenia wirusowe – (EBV, CMV, HIV), niektóre zakażenia bakteryjne oraz szerokie spektrum chorób o podłożu autoimmunologicznym (zespół Sjögrena, toczeń, reumatoidalne zapalenie stawów). W tej drugiej grupie pacjentów spotykamy najczęściej kriglobulinemie mieszane (typ I albo II) a wykrycie kriglobulinemii wymaga przeprowadzenia określonych procedur laboratoryjnych.

Klasyfikacja kriglobulinemii

Typ kriglobulinemii	Powiązania kliniczne	Skład krioprecypitatu
Typ I	Kriglobulinemie monoklonalne (szpiczak mnogi)	Immunoglobulina monoklonalna w dyskrzajach plazmocytarnych
Typ II	Kriglobulinemie mieszane (HCV, choroby autoimmunologiczne)	Monoklonalna IgM wiążąca poliklonalne IgG
Typ III		Poliklonalne IgM wiążące poliklonalne IgG

Rozpoznawanie kriglobulinemii

Kriglobulinemia może zostać przypadkowo wykryta w laboratorium diagnostycznym w trakcie przygotowywania materiału do badań i jego dalszego przechowywania [17]. U niektórych pacjentów z kriglobulinemią typu I, po oziębieniu próbki krwi białko monoklonalne bardzo szybko tworzy żel, uniemożliwiające separację składników komórkowych oraz osocza w procesie wirowania. Struktura żelu bywa czasem tak gęsta, że niemożliwe jest prawidłowe pobieranie materiału przy pomocy pipety czy igły analizatora biochemicznego. U niektórych pacjen-

Procedury laboratoryjne służące do wykrywania kriglobulinemii

Wykrywanie i ilościowa analiza kriglobulin jest związana z wieloma problemami, do których należy zaliczyć brak standaryzacji pobierania i procedur wstępnego przygotowania próbki (transportu materiału do laboratorium). Subiektywna interpretacja wyników, brak wystandaryzowanych procedur ilościowych, brak materiałów kontrolnych [19, 20, 21].

Istnieje powszechna zgoda, że krew powinna być pobierana do wstępnie ogrzanych strzykawek (próbówek), transportowana i wykrzepiana w temp. nie niższej niż 37°C.

Otrzymaną w temp 37°C próbkę surowicy należy umieścić w temp. 4°C i codziennie obserwować aż do 7 dni. Niektóre źródła zalecają dodanie niewielkiej ilości roztworu azydku sodowego w celu powstrzymania zakażenia próbki (jest to istotne szczególnie wtedy, gdy oceniana jest próba kontrolna inkubowana w 37°C). Ocena obecności krioprecypitatu wymaga doświadczenia, a niektóre formy krieglobulinemii typu I, w których osad ma strukturę półpłynnego żelu, są trudne w interpretacji. Potwierdzenie obecności krieglobulinemii typu II i III także może sprawiać trudności, ponieważ ilość powstałego krioprecypitatu, szczególnie typu III, jest niewielka (kilkadziesiąt mg/l). Opisano także próby wykrywania precypitatu za pomocą technik pomiaru rozproszenia światła. Nie zostały one jednak jak dotąd wystandaryzowane [22].

Istnieją opisy ilościowego oznaczania krieglobulin poprzez oznaczenie białka w oczyszczonym przez precypitację i przemywanie w soli fizjologicznej preparacie krioprecypitatu. Zaleca się wielokrotne przemywanie osadu krieglobulinowego za pomocą dziesięciokrotnego nadmiaru (lub wg innych źródeł niewielkiej ilości) wyziębionego roztworu buforowanej soli fizjologicznej, a w niektórych procedurach także wody, w celu usunięcia niespecyficznie zaadsorbowanych białek surowicy [23]. Zebrane po ostatnim wirowaniu na dnie próbki białko oznacza się jedną z licznych metod oznaczania białka całkowitego (biuretową, Lowryego, Bradforda lub spektrofotometryczną). Ilość białka można także próbować ocenić klasycznymi metodami elektroforetycznymi lub za pomocą elektroforezy kapilarnej. Nie rozstrzygnięto jednak problemu, czy przy ilościowym oznaczaniu krieglobulin metodami elektroforetycznymi należy brać pod uwagę tylko białka frakcji gamma (immunoglobuliny) czy także białka frakcji beta (białko dopełniacza).

Laboratoria stosują różne wartości referencyjne, powyżej których ilościowy wynik badania na obecność krieglobulin uznaje się za dodatni. Wartości referencyjne zmieniają się w szerokim zakresie od 10 do 100 mg/l. Wartości poniżej 500 mg/l trzeba jednak traktować z dużą ostrożnością.

Można także ilościowo oznaczać wartość tzw. kriocyty, tj. odsetka objętości surowicy zajętej przez osad białkowy (Ryc. 3).

Dalsza charakterystyka krieglobulin

Po stwierdzeniu obecności krieglobulinemii powinno się przeprowadzić jej dalszą charakterystykę. Ponownie - procedury dalszego postępowania są w laboratoriach

bardzo zróżnicowane. W niektórych oczyszczony preparat krieglobuliny poddaje się elektroforezie i immunofiksacji, w innych analizuje się próbkę surowicy wyjściowej. W ustaleniu klonalności obecnych w elektroforezie i immunofiksacji frakcji immunoglobulinowych pożyteczne mogą być także ilościowe oznaczenia immunoglobulin klasy IgG, IgA, IgM, wolnych łańcuchów lekkich, a także elektroforeza białek moczu. Trzeba jednak podkreślić, że interpretacja obrazów elektroforetycznych w przypadku krieglobulinemii mieszanych jest trudna i wymaga dużego doświadczenia pracowników laboratorium. Nierzadko stwierdza się obecność prążków oligoklonalnych, więc ścisły podział krieglobulin mieszanych na typ II i III jest problematyczny [24] (Ryc. 4).

Krieglobulinemii nierzadko towarzyszy podwyższona lepkość krwi (powyżej 4 centypuasów) choć pomiary lepkości krwi rzadko są przeprowadzane w rutynowych laboratoriach [25].

Bardzo cennym badaniem diagnostycznym mogącym potwierdzić występowanie krieglobulinemii jest oznaczanie białek C3 i C4 układu dopełniacza. Czasem przeprowadza się także ocenę całkowitej aktywności hemolitycznej dopełniacza. W krieglobulinemiach mieszanych przy prawidłowych stężeniach białka C3 obserwujemy bardzo niskie stężenia białka C4 i C1q układu dopełniacza. Wiąże się to z aktywacją kaskady dopełniacza na kompleksach immunologicznych, szczególnie tych, które w swojej strukturze zawierają immunoglobulinę klasy IgM. Przydatnym badaniem jest także oznaczenie czynnika reumatoidalnego. Wysokie miana RF towarzyszą tworzeniu kompleksów immunologicznych w krieglobulinemiach mieszanych.

Z naszych doświadczeń wynika, że gęstość żelu krieglobulinowego oraz jego zachowanie w trakcie ogrzewania i oziębiania jest różne u różnych pacjentów. W jednym z badanych przez nas przypadków frakcja immunoglobulin o własnościach krieglobulinowych po oczyszczeniu utraciła zdolność do krioprecypitacji.

Opisano także przypadki problemów z ponownym rozpuszczeniem raz wytrąconego osadu krieglobulinowego. Powstały osad nie rozpuszczał się po ogrzaniu do temp. 37°C. Ulegał natomiast rozpuszczeniu po ogrzaniu do temp. 56°C [26, 27]. W innym przypadku krieglobulinemii monoklonalnej cząsteczki immunoglobuliny precypitowały zarówno po oziębieniu próbki, jak i ogrzaniu powyżej temp. 56°C, wykazywały więc cechy piroglobuliny [28]. Opisano także przypadek krieglobulinemii typu I spowodowanej przez tworzenie kompleksu antygen prze-

ciwiału (IgG-albumina) w stosunku ilościowym 1:2 [29]. Biofizyczny mechanizm procesu krioprecypitacji jest prawdopodobnie dość zróżnicowany i nie do końca poznany a temperatura nie jest jedynym czynnikiem krioprecypitacji. Rozpuszczalność osadu białkowego zależy od struktury immunoglobuliny, siły jonowej oraz pH roztworu.

Wykrywanie i oznaczanie krioglobulin - zjawiska towarzyszącego niemal zawsze infekcjom wirusowym żółtaczki typu C, a także wielu innym zróżnicowanym jednostkom chorobowym (szpiczak mnogi, choroby o podłożu autoimmunologicznym) oraz mającego często poważne znaczenie kliniczne, jest jedną z niewielu procedur diagnostycznych ocierających się o czarną magię. Doktrynalnie potraktowana pochodząca z lat 70. klasyfikacja i reguły postępowania nie doczekały się jak do tej pory rzetelnych opracowań metodologicznych.

Krioglobulinemia to cały szereg zjawisk związanych z precypitacją immunoglobulin monoklonalnych (typ I) oraz kompleksów immunologicznych (typ II i III). Sensowność podziału krioglobulinemii mieszanej na typ II i III musi budzić wątpliwości. Niektórzy badacze uważają, że krioglobulinemia typu III (poliklonalne IgM) powoli ewoluuje do krioglobulinemii typu II. Z doświadczeń autorów wynika, że w niektórych stanach zapalnych wątroby na tle poliklonalnej strefy immunoglobulin IgG widać kilka prążków immunoglobulin klasy IgM. Niektóre z tych prążków wykazują aktywność enzymatyczną (makroenzymy). Użyteczność dodatkowego podziału krioglobulinemii mieszanych jest więc dyskusyjna. Autorom nie są znane prace optymalizujące czas inkubacji materiału w celu wykrycia krioglobulin. Z naszych doświadczeń wynika, że krioglobuliny typu I wytrącają się bardzo szybko po oziębieniu próbki (nie dłużej niż 1 godz.). W przypadku krioglobulinemii mieszanych rekomenduje się siedmiodniowy czas inkubacji. W piśmiennictwie brak jest uzasadnienia tak długiego czasu inkubacji a także analizy procesów zachodzących w trakcie długotrwałego wytrącania kompleksów immunologicznych. Zastosowanie jednakowych procedur do ilościowego oznaczania krioglobulin typu I i mieszanych jest zupełnie pozbawione sensu. Krioglobuliny monoklonalne typu I mają bardzo zróżnicowaną postać i własności fizykochemiczne. W przypadku, gdy przyjmują postać półpłynnego żelu, jego odseparowanie od surowicy jest często niemożliwe. Nawet gdy monoklonalna immunoglobulina krioprecypituje w postaci kłaczkowatego osadu, to czasem po jego oczyszczeniu przestaje się on wytrącać z roztworu soli fizjologicznej. Wątpliwości

budzić musi doktrynalne stwierdzenie, że osad krioglobulinowy musi się rozpuścić po powtórnym ogrzaniu, ponieważ opisano przypadki, kiedy osady krioglobulinowe nie ulegały ponownemu rozpuszczeniu w temp. 37°C. Nie przeprowadzono szerokich badań dotyczących buforów używanych do przemywania osadu.

W przypadku gammapatii monoklonalnych, po stwierdzeniu zjawiska krioprecypitacji (które zawsze trzeba umieścić na wyniku badania) powinno się dokonać pomiarów ilościowych białka krioglobulinowego. Istnieją tanie i powszechnie dostępne elektroforetyczne metody ilościowej oceny białka monoklonalnego, choć nałożenie ogrzanej próbki na żel może sprawiać trudności (Ryc. 5).

Z naszych doświadczeń oraz obserwacji innych autorów wynika także, że elektroforeza i immunofiksacja surowicy nierzadko dają charakterystyczne obrazy krioglobulinowe (rozmażane rozdziały, precypitacja białka w miejscu nałożenia, hypergammaglobulinemia poliklonalna, na tle której obserwowane są pojedyncze lub mnogie prążki klasy IgM i/albo IgG) [30]. Gdy testowi krioprecypitacyjnemu poddano próbki surowicy spełniające wybrane kryteria elektroforetyczne, niespodziewanie obecność krioglobulin wykryto u 14 z 52 pacjentów [17]. Obraz elektroforetyczny tego typu oraz obniżone stężenie składowych dopełniacza (C4) mocno wspierają prawdopodobieństwo występowania precypitujących kompleksów immunologicznych. Zdaniem autorów, obrazy elektroforetyczne są cennym narzędziem diagnostycznym w zestawieniu z okupioną 7 dniowym oczekiwaniem precypitacją śladowych ilości osadu.

Podsumowując krioglobulinemia jest zjawiskiem, u podłoża którego leży wiele przyczyn. Różne są własności fizykochemiczne osadów krioglobulinowych. Objawy i konsekwencje kliniczne krioprecypitacji też mogą być bardzo zróżnicowane i nie korelują z ilością wykrywanych metodami laboratoryjnymi krioglobulin. Zdaniem autorów, stosowanie wspólnych metod diagnostycznych dla wykrywania i ilościowej oceny krioglobulinemii mieszanej i typu I jest bezzasadne. Ze względu na heterogenność zjawiska opracowanie wystandaryzowanych procedur nie będzie łatwe. Natomiast dzięki ściślejszej współpracy laboratorium diagnostycznego i klinicystów, można skorelować objawy kliniczne krioglobulinemii z wynikami badań elektroforetycznych i wybranych badań immunochemicznych. Wymaga to jednak wypracowania dobrych reguł współpracy i odpowiednich kwalifikacji personelu laboratorium.

Piśmiennictwo (Endnotes):

1. Hartl FU, Bracher A, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*. 2011;475(7356):324-32.
2. He R, Dao LN. Blood. Extracellular and intracellular crystal deposition in plasma cell myeloma. 2014 Feb 6;123(6):807.
3. Matoso A1, Rizack T, Treaba DO. Intracellular and extracellular rhomboid shaped crystalline inclusions in a case of IgG lambda restricted plasma cell myeloma: a case report and review of the literature. *Diagn Pathol*. 2010; 21;5:6.
4. Rodriguez-Paez AC1, Seetharaman M, Brent LH. Cryoglobulin crystal arthropathy in a patient with multiple myeloma. *J Clin Rheumatol*. 2009;15(5):238-40.
5. Aarset H, Dekker J, Brorson SH, et al. Crystal-induced arthritis mimicking rheumatoid arthritis in a patient with monoclonal gammopathy. *Arthritis Rheum*. 2002;46:2816.
6. Gammon B, Longmire M, DeClerck B. Intravascular crystal deposition: an early clue to the diagnosis of type 1 cryoglobulinemic vasculitis. *Am J Dermatopathol*. 2014;36(9):751-3.
7. Sokol RJ, Booker DJ, Stamps R, Walewska R. Cold haemagglutinin disease: clinical significance of serum haemolysins. *Clin Lab Haematol*. 2000;22(6):337-44.
8. Joshi SR, Iyer YS, Bhatia HM. Serological and immunoglobulin studies in autoimmune haemolytic anaemia with emphasis on the nature of biphasic antibodies. *Acta Haematol*. 1980;64(1):31-7.
9. Bartolmäs T, Mayer B, Yürek S, Genth R, Salama A. Paradoxical findings in direct antiglobulin test and classification of agglutinating autoantibodies using eluates and monospecific anti-human globulin sera. *Vox Sang*. 2014 Aug 7.
10. Wintrobe MM, Buell MV. Hyperproteinemia associated with multiple myeloma. *Bull John Hopkins Hosp* 1933;52: 156–65.
11. Brouet JC, Clauvel JP, Dannnon F, Klein M, Seligmann M. Biological and clinical significance of cryoglobulins: a report of 86 cases. *Am J Med* 1974;57:775–88.
12. Dasanu CA, Mewawalla P, Geller AB, Silver JS. Hyperviscosity syndrome in a patient with kappa light chain myeloma with cryoglobulin properties and alpha thalassemia. *Leuk Res*. 2010;34(12):e315-6.
13. Jaleel A, Owen BA, Manske MK, Katzmann JA, Kyle RA, Abraham RS. Bence Jones cryoglobulinuria: characterization of a urinary kappa light chain cryoglobulin. *Clin Chem*. 2006;52(7):1435-6.
14. Essential Type II Cryoglobulinemia in a 22-Year-Old African-American Female. *Labmedicine* 2008; 39:597-600.
15. Gorevic PD, Frangione B. Mixed cryoglobulinemia (MC) cross-reactive idiotypes: implications for the relationship of MC to rheumatic and lymphoproliferative diseases. *Semin Hematol*. 1991;28:79-94.
16. Sinico RA1, Fornasieri A, Indaco A, Radice A, Bernasconi P, Gibelli A, D'Amico G. Cross-reactive idiotypes on cryoprecipitating monoclonal IgMk rheumatoid factors. *Clin Exp Rheumatol*. 1995;13 Suppl 13:S105-7.
17. Warren JS. Clinically unsuspected cryoglobulinemia: cases that present as laboratory artifact. *Am J Clin Pathol*. 2013;139(3):352-9.
18. Carla M. Nester, Eric J. Benner, Mathieu Latour, Volker Nickleit, Harvey Hamrick, William Primack. Cryoglobulinemia and Glomerular Rhomboid Inclusions in a Child With Acute Kidney Injury *American Journal of Kidney Diseases*, Volume 53, Issue 5, May 2009, Pages 866–870.
19. Damoiseaux J. The diagnosis and classification of the cryoglobulinemic syndrome. *Autoimmun Rev*. 2014;13(4-5):359-62
20. Sargur R1, White P, Egner W. Cryoglobulin evaluation: best practice? *Ann Clin Biochem*. 2010;47:8-16.
21. Motyckova G1, Murali M. Laboratory testing for cryoglobulins. *Am J Hematol*. 2011;86(6):500-2.
22. Kalovidouris, A. E. and R. L. Johnson. Rapid cryoglobulin screening: an aid to the clinician. *Ann Rheum Dis* 1978;37:444–448.
23. Kallemuchikkal U, Gorevic PD. Evaluation of cryoglobulins. *Arch Pathol Lab Med*. 1999;123(2):119-25.
24. Musset L, Diemert MC, Taibi F, Thi Huong Du L, Cacoub P, Leger JM, Boissy G, Gaillard O, Galli J. Characterization of cryoglobulins by immunoblotting. *Clin Chem*. 1992;38(6):798-802.
25. Treon SP. How I treat Waldenström macroglobulinemia. *Blood* 2009; 114: 2375–85.
26. Ishimura E, Nishizawa Y, Shoji S, Okumura M, Nishitani H, Kim CW, Watanabe Y, Wakasa K, Morii H, Kashgarian M. Heat-insoluble cryoglobulin in a patient with essential type I cryoglobulinemia and massive cryoglobulin-occlusive glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis*. 1995;26(4):654-7.
27. Meng QH, Chibbar R, Pearson D, Kappel J, Krahn J. Heat-insoluble cryoglobulin in a patient with essential type II cryoglobulinemia and cryoglobulin-occlusive membranoproliferative glomerulonephritis: case report and literature review. *Clin Chim Acta*. 2009;406(1-2):170-3.
28. Modarressi A1, Kuriyan M, Harvey G, Strair R J. Heat insoluble cryoglobulin associated with gangrene in multiple myeloma. *Clin Apher*. 2003;18(4):190-3.
29. Jentoft JE, Dearborn DG, Bernier GM. Characterization of a human cryoglobulin complex: a crystalline adduct of a monoclonal immunoglobulin G and albumin. *Biochemistry*. 1982;21(2):289-94.
30. Musset L, Duarte F, Gaillard O, Du LT, Bilala J, Galli J, Preud'homme JL. Immunochemical characterization of monoclonal IgG containing mixed cryoglobulins. *Clin Immunol Immunopathol*. 1994;70(2):166-70.

Rola oznaczeń retikulocytów w diagnostyce i monitorowaniu niedokrwistości

RETICULOCYTES IN DIAGNOSIS AND MONITORING OF ANEMIA

Danuta Haertle

Streszczenie

Niedokrwistość jest chorobą, w przebiegu której na skutek zmniejszonej liczby krwinek czerwonych oraz obniżenia poziomu hemoglobiny dochodzi do niedostatecznej podaży tlenu do tkanek. Diagnostyka różnicowa niedokrwistości wykorzystuje szereg badań biochemicznych, w rzadkich przypadkach biopsję szpiku kostnego, jednak podstawowym badaniem jest ocena morfologii krwi obwodowej. Właściwe rozpoznanie przyczyny niedokrwistości jest podstawą skuteczności leczenia. Wśród parametrów możliwych do oceny, obok określenia poziomu hemoglobiny, istotne są informacje o wielkości krwinek czerwonych oraz stopniu ich wysycenia hemoglobiną. Dzięki nowym technologiom pomiarowym, jakich dostarczają współczesne analizatory hematologiczne, można dodatkowo uzyskać dane, dotyczące parametrów retikulocytarnych, co może być istotne w ocenie przyczyn oraz monitorowania leczenia niedokrwistości.

Danuta Haertle
Horiba ABX Sp. z o.o.
ul. Wał Miedzeszyński 598
03-994 Warszawa
danuta.haertle@horiba.com

Słowa kluczowe:

retikulocyty, erytrocyty, niedokrwistości

Summary

Anemia is a pathological condition in which availability of oxygen to tissues is limited due to restricted synthesis of hemoglobin. Several laboratory tests are used for differentiation of types of anemia among them CBC what includes hemoglobin level as well as erythrocyte indices describing their volume and hemoglobin content. New technologies used in hematological analysers can provide additional information regarding reticulocytes count and their detailed characterization what may be of a great importance for diagnosis of anemia and monitoring its treatment.

Key words: reticulocytes, erythrocytes, anemias

Ogólnie przyjęta definicja niedokrwistości dotyczy stanów, przebiegających z obniżeniem stężenia hemoglobiny. Bez względu na etiologię stanowią one problem populacyjny na całym świecie a podstawą ich rozpoznania i wstępnej klasyfikacji jest ocena morfologii krwi obwodowej. Wyniki uzyskiwane z analizatorów hematologicznych nie tylko dostarczają informacji o stężeniu hemoglobiny i liczbie poszczególnych elementów morfotycznych, w tym również retikulocytów, ale również podają inne parametry, umożliwiające różnicowanie niedokrwistości w zależności od przyczyn ich powstania. Istotnym parametrem jest objętość krwinki czerwonej (MCV) oraz stężenie hemoglobiny w krwince (MCHC). W oparciu o MCV można podzielić niedokrwistości na makrocytowe (MCV>100fl) mikrocytowe (MCV<80fl) oraz normocyto-

we (MCV 80-100fl). Obniżenie MCHC wiąże się głównie z niedokrwistością z niedoboru żelaza, przy jego głębokim niedoborze objętość krwinek zmniejsza się i stają się one hipochromiczne. Makrocytoza z małą liczbą retikulocytów wskazuje na niedokrwistość megaloblastyczną, natomiast niedokrwistość normocytowa z niską liczbą retikulocytów może wynikać z zaburzonego metabolizmu żelaza, niewydolności nerek z obniżeniem wytwarzania erytropoetyny. Wspomniane wyżej retikulocyty w coraz większym stopniu stają się jednym z parametrów pomocnych w diagnostyce i różnicowaniu niedokrwistości. Retikulocyt, proerytocyty jest niedojrzałą postacią krwinki czerwonej bezpośrednio poprzedzającą dojrzały erytrocyt. Jego powstawanie jest związane głównie z uzupełnianiem fizjologicznie niszczonej krwinek czerwonych oraz wy-

równywaniem skutków zdarzeń lub chorób, w których dochodzi do utraty lub zniszczenia erytrocytów. Wzrost liczby retikulocytołów jest wykładnikiem intensywności erytropoezy.

Po raz pierwszy retikulocyty opisał Wilhelm Erb w 1865 roku i nazwał je „formami przejściowymi”. W 1890 roku Paul Ehrlich wykonał pierwsze barwienie przyżyciowe retikulocytołów z wykorzystaniem błękitu metylenowego.

W przebiegu prawidłowej erytropoezy retikulocyty są pierwszymi komórkami linii erytroidalnej, uwalnianymi ze szpiku do krwiobiegu przez szczeliny ściany zatok szpikowych. Proces dojrzewania w warunkach fizjologicznych trwa od 2 do 4 dni (Ryc. 1).

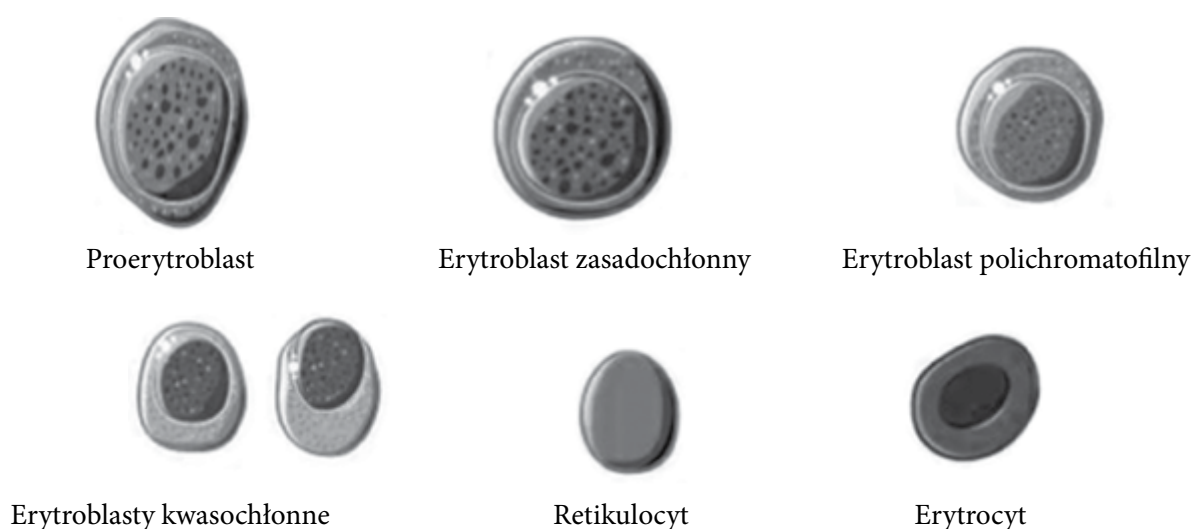
klasa I – substancja siateczkowo-nitkowata umieszczona w centralnej części komórki

klasa II – luźna siateczka nitek na powierzchni całego retikulocyta

klasa III – delikatna siateczka nitek, umieszczona na obwodzie komórki

klasa IV – pojedyncze ziarnistości lub krótkie nitki

Liczbę retikulocytołów można uzyskać w oparciu o klasyczną metodę mikroskopową lub metodami automatycznymi. Ta pierwsza oparta jest o barwienie przyżyciowe przy użyciu barwników zasadowych, takich jak: błękit krezylu, błękit siarczanu Nilu czy błękit metylenowy (Ryc. 2).



Ryc. 1. Przekształcenia komórek w procesie erytropoezy

Są one pierwszą formą układu czerwonokrwinkowego nieposiadającą jądra komórkowego. Brak jądra i obecność kwasu rybonukleinowego jest cechą pozwalającą odróżnić je od innych komórek krwi lub szpiku kostnego. Retikulocyty w swej strukturze wewnętrznej posiadają siateczkowe skupiska, które są pozostałością RNA, rybosomów, mitochondriów i określane wspólną nazwą substancji siateczkowo-włóknistej.

Proces dojrzewania retikulocytołów polega na stopniowym pozbywaniu się RNA i przebudowie błony komórkowej.

Retikulocyty dzielą się na pulę szpikową (60%) i obwodową (40%). Pula szpikowa obejmuje komórki o dużej zawartości RNA, czyli te najmłodsze, wykazujące ekspresję antygenu CD71.

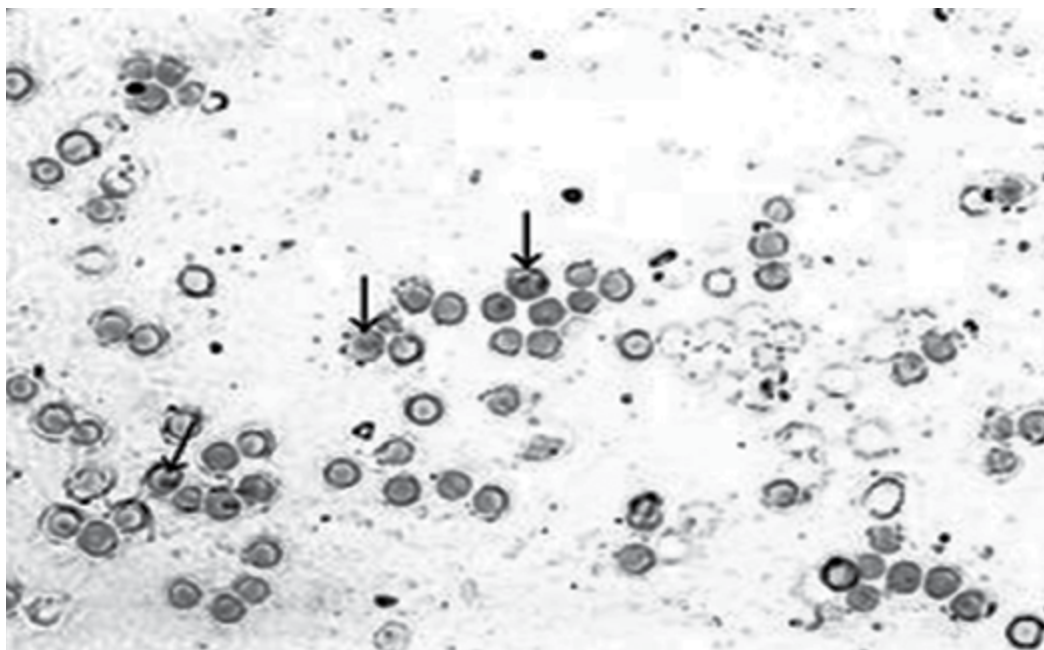
Wg klasyfikacji Heilmeyera można wyodrębnić następujące klasy retikulocytołów:

klasa 0 – jądrzasty (erythroblast kwasochłonny) z substancją siateczkowo-nitkowatą

Metoda ta jest obarczona dużym błędem ze względu zarówno na obecność wtrętów wewnątrzkomórkowych, takich jak: ciała Heintza, ciała Howella-Jolly'ego, nakrapiania zasadochłonne lub obecność patologicznych hemoglobin, a także błąd uzależniony od doświadczenia osoby oceniającej preparat.

Pomiar automatyczny na analizatorach hematologicznych nie wymaga wstępnej preparatyki i polega na wykorzystaniu cytometrii przepływowej w oparciu o fluorescencję wykorzystującą fluorochrom (oranż tiazolowy, oksazyna, auramina, polimetyna) lub pomiaru absorbancji światła z wykorzystaniem błękitu metylenowego. Wykorzystanie błękitu metylenowego wydłuża czas uzyskania wyniku z uwagi na konieczność inkubacji z barwnikiem.

Metody automatyczne także obarczone są błędem pomiaru, którego przyczyną mogą być fragmenty leukocytów, erythroblasty lub agregaty płytkowe.



Ryc. 2. Retikulocyty wybarwione siarczanem Nilu – powiększenie mikroskopowe 600x

Wzrost liczby retikulocytów powyżej 100 000/ μ l (retikulocytoza) fizjologicznie jest typowy dla noworodków, a także dla osób mieszkających w wysokich górach. Retikulocytoza jest odzwierciedleniem odpowiedzi na leczenie niedoborów (po podawaniu preparatów żelaza, wit. B12, kwasu foliowego a także erytropoetyny). Może pojawić się również po utracie krwi, w wyniku hemolizy, po splenektomii, w nadkrwistości. Istotne jest potwierdzenie lub wykluczenie hemolizy w oparciu o szereg testów diagnostycznych, w tym m.in. odczynu Coombsa czy badań w kierunku przeciwciał przeciwnokrwinkowych.

Retikulocytopenia, czyli spadek liczby retikulocytów poniżej 20 000/ μ l jest wynikiem hipoproliferacji układu czerwono-krwinkowego lub nieefektywnej hiperplastycznej erythropoezy, w której nieprawidłowe krwinki czerwone są niszczone jeszcze przed opuszczeniem szpiku kostnego, czego przykładem są zespoły mielodysplastyczne.

Retikulocytopenia jest typowa dla:

- pierwotnej aplazji szpiku,
- uszkodzenia szpiku przez substancje chemiczne, w tym chemioterapia,
- niedoboru erytropoetyny spowodowanego niewydolnością nerek,
- niedoboru witaminy B12, kwasu foliowego, żelaza,
- MDS,
- ostrych białaczek.

Analizatory hematologiczne wykorzystujące najnowszej generacji techniki pomiarowe z wykorzystaniem fluorescencyjnej cytometrii przepływowej pozwalają na ocenę stopnia dojrzałości retikulocytów, ocenianą na podstawie

zawartości RNA. Referencyjna metoda barwienia RNA wykorzystuje oranż tiazolowy i dzieli retikulocyty na 3 grupy:

- wysoka zawartość RNA (HFR-high fluorescent ratio),
- średnia (MFR-medium fluorescent ratio),
- niska zawartość RNA (LFR- low fluorescent ratio).

RET H wysoka zawartość RNA, wartości prawidłowe: 0-10%

RET M średnia zawartość RNA, wartości prawidłowe: 5-20%

RET L niska zawartość RNA, wartości prawidłowe: 80-100%

Parametry te mogą być wykorzystywane w celu monitorowania efektywności terapii EPO (oczekiwana reakcja po 10 tygodniach) oraz efektywności leczenia niedokrwistości niedoborowych – wzrost RET H.

Kolejnym parametrem określającym stopień dojrzałości retikulocytów jest MFI%, czyli wartość średniego kanału fluorescencji całej populacji retikulocytów w próbce. MFI jest najwcześniejszym wskaźnikiem przywrócenia funkcji krwiotwórczych szpiku. Parametr ten jest przydatny przede wszystkim w celu monitorowania efektywności odnowy po przeszczepieniach szpiku.

Interpretacja kliniczna MFI:

- wysokie Ret i wysokie MFI jest wyrazem odpowiedzi fizjologicznej wyrażającej się przyspieszeniem funkcji krwiotwórczych i uwolnieniem młodszych form retikulocytów w przypadkach hemolizy i nasilonego krwawienia,
- niskie Ret i wysokie MFI jest typowe dla pierwszej fazy odpowiedzi układu krwiotwórczego i ma miejsce, np. po przeszczepie szpiku, a także jako wynik odtworzenia funkcji szpiku po uprzednim, np. toksycznym uszkodzeniu komórek macierzystych,

— prawidłowe Ret i wysokie MFI pojawia się jako odpowiedź organizmu na utratę krwi oraz w początkowej fazie terapii żelazem.

Istotnym parametrem jest także frakcja retikulocytów nie-dojrzałych – IRF a która musi być rozpatrywana w powiązaniu z bezwzględną liczbą retikulocytów. Niskie Ret oraz niskie IRF świadczy o braku odnowy erytropoezy.

Kolejny parametr to średnia objętość retikulocyta (MRV) dostarczający informacji o morfologii przyszłej populacji RBC i będący prekursorem w diagnostyce i monitorowaniu leczenia niedokrwistości z niedoboru żelaza (IDA) oraz witaminy B12 i kwasu foliowego:

- wartość MRV wysoka, przyszła populacja RBC będzie makrocytarna,
- wartość MRV normalna, przyszła populacja RBC będzie normocytarna,
- wartość MRV niska, przyszła populacja RBC będzie mikrocytarna.

Ważnym parametrem oznaczanym przez analizatory hematologiczne jest zawartość hemoglobiny w retikulocytach RHCc (Reticulocyte Hemoglobin Content calculated). Ze względu na fakt, że retikulocyty uwalniane ze szpiku pozostają w krwiobiegu 2-3 dni zanim przejdą w formę dojrzałych erytrocytów, zawartość hemoglobiny w retikulocytach odzwierciedla ilość żelaza dostępnego do syntezy hemoglobiny w szpiku w czasie rzeczywistym. Parametr ten jest najsilniejszym predyktorem niedokrwistości z niedoboru żelaza u dzieci, u chorych z nowotworami i przewlekłymi stanami zapalnymi oraz w monitorowaniu leczenia EPO u osób dializowanych. Służy on głównie do wykrywania

funkcjonalnego niedoboru żelaza w trudnych diagnostycznie przypadkach, kiedy ogólnie przyjęte parametry laboratoryjne z powodu współistnienia innych chorób nie dają jednoznacznej odpowiedzi. Do takich typowych stanów można zaliczyć choroby nowotworowe, przewlekłe choroby zapalne i przewlekłe choroby nerek. Typowe markery laboratoryjne niedoboru żelaza podlegają zmianom również pod wpływem innych, nieswoistych czynników, a przede wszystkim są modyfikowane przez obecność stanów zapalnych a także niedożywienia. I tak na przykład stężenie ferrytyny ulega podwyższeniu a transferryny obniżeniu w stanach ostrej fazy o różnym nasileniu, zaś dodatkowo transferryna jest traktowana jako marker niedożywienia i bez względu na stan zasobów ustrojowych żelaza w takich przypadkach jej stężenia są bardzo niskie (tabela 1). Zawartość hemoglobiny w retikulocytach dostarcza informacji niezależnych i może pojawić się wcześniej niż zmiany innych parametrów, w tym hematologicznych.

Badania pierwszego rzutu w diagnostyce i monitorowaniu leczenia niedokrwistości opierają się głównie na ocenie podstawowych parametrów morfologicznych krwinek czerwonych oraz retikulocytozy. Możliwości analizatorów hematologicznych m.in. poprzez oznaczanie parametrów retikulocytarnych pozwalają na ograniczanie wykonywania innych badań, w tym biochemicznych, a także obciążającej chorego biopsji szpiku kostnego. Zarówno rozmaz mikroskopowy krwi obwodowej, jak i badanie szpiku kostnego nadal są badaniami odniesienia, szczególnie w sytuacjach, gdy niedokrwistości towarzyszą zaburzenia w pozostałych układach krwinkowych.

Tabela 1. Możliwe zmiany podstawowych markerów stosowanych w różnicowaniu niedokrwistości z niedoboru żelaza i niedokrwistości chorób przewlekłych

	Niedokrwistość chorób przewlekłych	Niedokrwistość z niedoboru żelaza	Niedokrwistość mieszana
Stężenie żelaza	Obniżone	Obniżone	Obniżone
Stężenie transferyny	Obniżone lub prawidłowe	Podwyższone	Obniżone
Wysycenie transferyny	Obniżone	Obniżone	Obniżone
Stężenie ferrytyny	Prawidłowe lub podwyższone	Obniżone	Obniżone lub prawidłowe
Stężenie rozpuszczalnego receptora transferyny w surowicy	Prawidłowe	Podwyższone	Prawidłowe lub podwyższone

Cystatyna C – wczesny wskaźnik niewydolności nerek

CYSTATIN C - EARLY INDICATOR OF KIDNEY FAILURE

Marzena Iwanowska

Streszczenie

Cystatyna C, inhibitor peptydaz cysteinowych, białko o niskiej masie cząsteczkowej oznaczane w surowicy, znajduje dziś zastosowanie jako wczesny wskaźnik spadku filtracji kłębuszkowej. Oznaczane w moczu daje informację na temat sprawności kanalików nerkowych. Mimo pewnych ograniczeń (choroby tarczycy, przyjmowanie sterydów, zespół metaboliczny, otyłość) w sytuacjach klinicznych, w których spodziewane jest wystąpienie niewydolności nerek (nadciśnienie tętnicze, cukrzyca), wydaje się być lepszym parametrem niż kreatynina. Najnowsze rekomendacje KDIGO zawierają w schemacie rozpoznawania PChN poza oznaczaniem kreatyniny, również oznaczanie cystatyny C, jak też wyliczanie GFR w oparciu o jej stężenie. Wzorami rekomendowanymi są wzory CKD-EPI.

Słowa kluczowe:

cystatyna C, niewydolność nerek

Adres kontaktowy:

Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej

Wydział Nauk o Zdrowiu

Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

ul. Banacha 1a

02-097 Warszawa

marzena.iwanowska@wum.edu.pl

Summary

Cystatin C, cysteine peptidase inhibitor, low molecular weight protein, when assay in serum indicates early decrease in glomerular filtration. When assay in urine gives information about renal tubules damage. Despite many limitations (thyroid diseases, steroid therapy, metabolic syndrome, obesity), in clinical situations such as hypertension, diabetes, when loss of kidney filtration is expected, cystatin C seems to be better than creatinine. The latest KDIGO recommendations for CKD staging include cystatin C measurement and calculation of GFR based on cystatin concentration. CKD-EPI formula is recommended.

Keywords:

cystatin C, renal insufficiency

Cystatyna C jest białkiem wykrytym ponad 50 lat temu. W 1961 roku Clausen, Macpherson i Co-sgrove w niezależnych badaniach wykryli jego obecność w płynie mózgowo-rdzeniowym zdrowych osób [1, 2]. Nie znaleźli go jednak w ich krwi. Kilka lat później wykryto białko, które lokalizowało się w elektroforezie za prążkiem γ w innych płynach ciała, takich jak ślina, nasienie, siara. Nazwano je białkiem γ [3].

W 1979 Grubb i Lofberg z uniwersytetu w Malmö opracowali metodę immunodyszfuzji radialnej do oznaczania białka γ w surowicy i potwierdzili jego obecność w różnych materiałach w różnych stężeniach. Stwierdzili oni również wyższe jego stężenia we krwi pacjentów dializowanych w porównaniu do zdrowych [4].

Nazwa „cystatyna” i połączenie jej z filtracją nerkową sięga lat 80., kiedy to w roku 1985 zastosowanie cystatyny w diagnostyce funkcji nerek zaproponował Grubb wraz ze współpracownikami [5]. Metody automatyczne oznaczania cystatyny zostały wprowadzone w 1994 roku, aczkolwiek

wymagały posiadania określonego sprzętu. Obecnie mamy możliwości oznaczania cystatyny C metodami w pełni zautomatyzowanymi, na rutynowo pracujących analizatorach, dającymi możliwość uzyskania wyniku w krótkim czasie, bez potrzeby zbierania próbek.

Ludzka cystatyna C jest zasadowym białkiem o niskiej masie cząsteczkowej (13,3 kDa) produkowanym ze stałą prędkością przez wszystkie komórki jądrzaste organizmu pod postacią pojedynczego łańcucha polipeptydowego. Poprzez odłączenie reszty 26-aminokwasowego peptydu sygnałowego powstaje cząstka 120-aminokwasowego białka. Ten inhibitor peptydaz cysteinowych ma również działanie przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe i przeciwgrzybicze. Ze względu na niski ładunek i małą masę cząsteczkową ulega swobodnej filtracji w kłębuszkach nerkowych, a następnie wchłonięciu w obrębie kanalików nerkowych, gdzie poprzez układ lizosomalny dochodzi do rozłożenia białka do aminokwasów, które wracają do krwi i wątroby do resyntezy białek. Niezmetabolizowana reszta (około 5%) zo-

stanie wydalona z moczem ostatecznym. Wzrost jej stężenia w moczu będzie świadczył zatem o tubulopatii [6, 7].

Ocena pracy nerek jest istotna w wielu sytuacjach klinicznych. Rutynowo stosowanym parametrem jest stężenie kreatyniny w surowicy, jednak parametr ten ma wiele ograniczeń, jak np. fakt, iż stężenie kreatyniny wzrasta we krwi dopiero przy spadku filtracji kłębuszkowej o połowę lub więcej. Stężenie kreatyniny zależy od masy mięśniowej, co za tym idzie od płci, od rodzaju diety. Szacunkowe wyliczenie filtracji kłębuszkowej oparte na stężeniu kreatyniny uwzględnia wiek i płeć pacjenta, jednak wartości liczbowe, które mogą być raportowane, są poniżej 60ml/min/1,73m² [8].

Wg najnowszych wytycznych KDIGO opublikowanych w styczniu 2013 roku, wydolność nerek została podzielona na 6 stopni w oparciu, między innymi, o wartość filtracji kłębuszkowej (tabela 1).

0.	prawidłowa funkcja nerek, GFR >90ml/min/1,73m ² , bez proteinurii
1.	CKD1, GFR >90ml/min/1,73m ² , z innymi cechami niewydolności nerek
2.	CKD2 (łagodna niewydolność), GFR 60-89ml/min/1,73m ² , z innymi cechami niewydolności nerek
3.	CKD3a (łagodna do umiarkowanej niewydolności), GFR 45-59ml/min/1,73m ²
	CKD3b (umiarkowana do ciężkiej niewydolności), GFR 30-44ml/min/1,73m ²
4.	CKD4 (ciężka niewydolność), GFR 15-29ml/min/1,73m ²
5.	CKD5 (skrajna niewydolność), GFR <15ml/min/1,73m ²

Tabela 1. Stopnie wydolności nerek

Wg tych wytycznych przewlekła choroba nerek (PChN) definiowana jest jako zmiany strukturalne i/lub funkcjonalne nerek trwające >3 miesiące. Wskazują na to nieprawidłowe wyniki biochemicznych i obrazowych markerów uszkodzenia nerek a wartości eGFR są poniżej 60ml/min/1,73m². Podział PChN jest oparty na etiologii, wielkości GFR i albuminurii, kryteria rozpoznania PChN uwzględniają GFR wyliczony ze wzoru CKD-EPI (2009 r.), wykorzystującego stężenie kreatyniny, cystatyny lub obu parametrów [9] (tabela 2).

KDIGO rekomenduje również, aby w celu potwierdzenia PChN oznaczyć stężenie cystatyny u dorosłych bez objawów uszkodzenia nerek w sytuacji, kiedy eGFR wyliczony na podstawie kreatyniny znajduje się w przedziale

Stężenie cystatyny w surowicy	Wzór CKD-EPI
(cyst≤0,8 mg/l)	GFR = 133 x (cyst/0,8) ^{-0,499} x 0,996 ^{wiek} x 0,932 dla kobiet
(cyst>0,8 mg/l)	GFR = 133 x (cyst/0,8) ^{-1,328} x 0,996 ^{wiek} x 0,932 dla kobiet

Tabela 2. Wzory CKD EPI do wyliczenia GFR ze stężenia cystatyny C

45-59ml/min/1,73m². W celu oceny funkcji nerek lepiej też wykorzystywać GFR wyliczony ze stężenia cystatyny, niż samo stężenie cystatyny C. Warto zwrócić uwagę na wprowadzenie cystatyny C do kanonu rozpoznawania przewlekłej niewydolności nerek.

Wiele badań dotyczących cystatyny koncentruje się ostatnio na roli tego białka jako czynnika prognostycznego w chorobach sercowo-naczyniowych. Korelacja stężenia cystatyny C z wydalaniem albuminy z moczem, wskazującym na wystąpienie angiopatii, występowaniem nadciśnienia, dyslipidemii, udokumentowanej choroby niedokrwiennej serca, zdaje się potwierdzać również takie wykorzystanie tego białka [10].

Wysokość ceny oznaczenia cystatyny C każe nam spojrzeć na wady i zalety tego testu laboratoryjnego. Z przeprowadzonych do tej pory badań wynika, że stężenie cystatyny C ma większą wartość diagnostyczną niż stężenie kreatyniny w niektórych grupach pacjentów. Stężenie kreatyniny w surowicy krwi wzrasta dopiero przy znacznym spadku filtracji kłębuszkowej (ok. 60ml/min/1,73m²), podczas gdy stężenie cystatyny wzrasta przy nieznacznym spadku filtracji (ok. 90ml/min/1,73m²). Według większości badaczy, stężenie cystatyny nie zależy od pory dnia ani stosowanej diety, nie zależy też od płci i wieku, choć wg niektórych autorów występują wyższe wartości u osób po 60 roku życia, i wtedy mogą pojawić się też różnice w wynikach u kobiet i mężczyzn [11, 12]. Badano również wpływ zespołu metabolicznego i otyłości na stężenie cystatyny C i uzyskano u tych osób wyższe stężenia niż w grupie kontrolnej [13]. Niektórzy autorzy sprawdzali wpływ stanu ostrej fazy na wartości cystatyny we krwi [14]. Badania wykonane przez Grubba i wsp. wykazują, że u pacjentów po zabiegach operacyjnych nie uzyskano podwyższonych stężeń cystatyny [15] i nie ma zależności między CRP a cystatyną C. W publikacjach zwraca się jednak uwagę na dużą zmienność biologiczną cystatyny C w porównaniu do kreatyniny [16].

Wiadomo jest, iż na stężenie cystatyny, tak jak wszystkich białek, ma wpływ stan odżywienia pacjenta. Ograniczone jest więc jej wykorzystanie u pacjentów skrajnie niedożywionych. Nadczynność tarczycy, czy przyjmowanie kortykosterydów w sposób istotny statystycznie zwiększa stężenie tego białka we krwi. Te grupy pacjentów nie powinny być brane pod uwagę przy rozważaniu wykorzystania cystatyny [11, 17].

W materiale biologicznym cystatyna C cechuje się dobrymi parametrami analitycznymi. Materiał może być przechowywany w temperaturze pokojowej nawet do 7 dni. Na stężenie cystatyny nie ma wpływu czynnik reumatoidalny, hiperbilirubinemia, hemoliza czy lipemia [18], czynniki często interferujące w wielu testach laboratoryjnych, również przy oznaczeniach kreatyniny.

Wprowadzając cystatynę C na listę badań, warto zwrócić

uwagę na rekomendacje KDIGO co do warunków raportowania wyników. Zaleca się, aby do oznaczania cystatyny wykorzystywać metody oparte o międzynarodowy materiał referencyjny, wynik powinien być podawany z dokładnością do 3-go miejsca po przecinku (mg/l), oprócz wartości stężenia cystatyny należy podać wyliczony GFR (zalecanym wzorem jest CKD-EPI) a wyniki poniżej 60ml/min/1,73m² raportowane jako obniżone.

W świetle dotychczasowych wyników badań wydaje się słuszne rozpatrywanie cystatyny C jako dodatkowego parametru różnicującego, który może sygnalizować spadek filtracji nerkowej, zanim inne dostępne rutynowo badania dadzą jednoznaczne wyniki. Ma to znaczenie u pacjentów obciążonych ryzykiem wystąpienia powikłań nerkowych, w tym chorych z nadciśnieniem tętniczym czy cukrzycą [19].

Piśmiennictwo:

1. Clausen J. Proteins in normal cerebrospinal fluid not found in serum. *Proc Soc Exp Biol Med* 1961;107:170–2.
2. Macpherson CF, Cosgrove JB. Immunochemical evidence for a gamma globulin peculiar to cerebrospinal fluid. *Can J Biochem Physiol* 1961;39:1567–74.
3. Hochwald GM, Thorbecke GJ. Trace proteins in cerebrospinal fluid and other biological fluids. I. Effect of various fractionation procedures on beta-trace and gamma-trace proteins and methods for isolation of both proteins. *Arch Biochem Biophys* 1963;101:325–34.
4. Lofberg H, Grubb AO. Quantitation of gamma-trace in human biological fluids: indications for production in the central nervous system. *Scand J Clin Lab Invest* 1979;39:619–26.
5. Grubb A, Simonsen O, Sturfelt G, Truedsson L, Thysell H. Serum concentration of cystatin C, factor D and beta 2-microglobulin as a measure of glomerular filtration rate. *Acta Med Scand* 1985;218:499–503.
6. Abrahamson M, Olafsson I, Palsdottir A, Ulvsback M, Lundwall A, Jensson O, et al. Structure and expression of the human cystatin C gene. *Biochem J* 1990;268:287–94.
7. Jacobsson B, Lignelid H, Bergerheim US. Transthyretin and cystatin C are catabolized in proximal tubular epithelial cells and the proteins are not useful as markers for renal cell carcinomas. *Histopathology* 1995;26:559–64.
8. Myers G., Miller W. et al. Recommendations for improving serum creatinine measurement: a report from the laboratory working group of the national kidney disease educational program. *Clin. Chem.* 2006;52:1,5–18.
9. KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes) 2012 (volume 3 | issue 1 | JANUARY 2013 <http://www.kidney-international.org>.
10. Taglieri N, Koenig W, Kaski JC. Cystatin C and cardiovascular risk. *Clin Chem.* 2009;55:1932–43.
11. Stevens L, Schmid C, et al. Factors other than glomerular filtration rate affect serum cystatin C levels. *Kidney Int.* 2009;75:652–660.
12. Niemczyk S, Piotrowska M, Szamotulska K. Przydatność oznaczeń kreatyniny i cystatyny C w ocenie funkcji nerek w przewlekłej chorobie nerek i schorzeniach współistniejących. *Pol Merk Lek.* 2012; XXXII, 191, 312–17.
13. Servais A, Giral P et al. Is serum cystatin C a reliable marker for metabolic syndrome? *Am J Med.* 2008 May;121:426–32.
14. Knight E, Verhave J, et al. Factors influencing serum cystatin C levels other than renal function and the impact on renal function measurement. *Kidney Int.* 2004;65:1416–1421.
15. Grubb A, Björk J et al. Cystatin C, as a marker for successful aging and glomerular filtration rate, is not influenced by inflammation. *Scand J of Clin and Lab Invest.* 2011;71:145–149.
16. Dalton RN. Serum creatinine and glomerular filtration rate: perception and reality. *Clin Chem* 2010;56:687–9.
17. Galteau MM, Guyon M, Gueguen R, Siest G. Determination of serum cystatin C: biological variation and reference values. *Clin Chem Lab Med* 2001;39:850–7.
18. Fried L F. Creatinine and cystatin C: what are the values? *Kidney Int.* 2009;75:578–80.
19. Chew JS, Saleem M, Florkowski CM, George PM. Cystatin C—a paradigm of evidence based laboratory medicine. *Clin Biochem Rev* 2008 May;29:47–62.

Resweratrol - jego pleiotropowe działanie a homeostaza wapniowa organizmu

RESVERATROL ITS PLEIOTROPIC ACTION AND CALCIUM HOMEOSTASIS

Łukasz Szternel

Streszczenie

Resweratrol, określany jako „magiczna substancja” wyizolowany został w latach 60. ubiegłego stulecia z rośliny o nazwie *Polygonum cuspidatum*. Późniejsze badania pozwoliły zidentyfikować bardziej dostępne i powszechne źródło resweratrolu, jakim są winogrona i produkowane z nich wina. Już od wieków wino traktowano jak „cudowny eliksir” a odkrycie w nim resweratrolu zdawało się jedynie potwierdzać jego prozdrowotne właściwości. Antyoksydacyjne działanie resweratrolu od lat stanowi przedmiot zainteresowania biochemików, gdyż jest on jednym z najsilniejszych naturalnych przeciwutleniaczy. Neutralizowanie wolnych rodników tlenowych przeciwdziała uszkodzeniom komórek, wpływając przeciwnowotworowo oraz spowalniając na procesy starzenia się. Badania ostatnich lat odkryły cały szereg korzystnych właściwości resweratrolu, co pozwoliło wykorzystać jego leczniczy charakter. Pleiotropowy wpływ resweratrolu obejmuje działania neuroprotektoryjne, przeciwnowotworowe oraz kardioprotektoryjne. Pewne mechanizmy działania resweratrolu mają bezpośredni związek z wewnątrzkomórkową sygnalizacją poprzez jony wapnia, czyniąc go odpowiedzialnym za prawidłowe funkcjonowanie homeostazy wapniowej komórek.

Adres kontaktowy:

Katedra i Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej
CM w Bydgoszczy, UMK
ul. M. Curie Skłodowskiej 9
85-094 Bydgoszcz
kizdiagn@cm.umk.pl

Słowa kluczowe:

resweratrol, wino, jony wapnia, choroby neurodegeneracyjne, działanie przeciwnowotworowe, kanały wapniowe

Summary

Resveratrol referred to as the „magic substance” has been isolated in the 60's from the plant called *Polygonum cuspidatum*. Subsequent studies have identified grapes and wine as a more accessible and widespread source of resveratrol. For centuries wine was treated as a „miracle potion”, and the discovery of resveratrol in wine only seemed to confirm its health properties.

Antioxidant nature of resveratrol, considered as one of the strongest natural antioxidant for years was of interest of many biochemists. The other characteristic features of resveratrol are neutralization of free radicals that cause damage of cells, anticancer effects limitation of the aging processes. Recent studies have found a variety of beneficial properties of resveratrol, which allowed its use as therapeutic agent. Pleiotropic effect of resveratrol include neuroprotective actions, anticancer and cardioprotective properties.

Many of the mechanisms of action of resveratrol are directly related to intracellular calcium signaling, making it responsible for the proper functioning of the cell calcium homeostasis.

Keywords:

resveratrol, wine, calcium ions, neurodegenerative diseases, anticancer actions, calcium channels

Dobroczynny wpływ wina na bazie winogron znany był już od dawna. Wino traktowane było jak esencja życia, nazywane napojem bogów. Intensywne badania składu chemicznego wina na przestrzeni wieków pozwoliły zidentyfikować wiele związków, lecz na szczególną uwagę zasługuje grupa związków chemicznych zwana polifenolami. Jedną z substancji, będącą polifenolową pochodną stilbenu zwana resweratrolem, zwróciła szczególną uwagę swoimi pleiotropowymi oddziaływaniami.

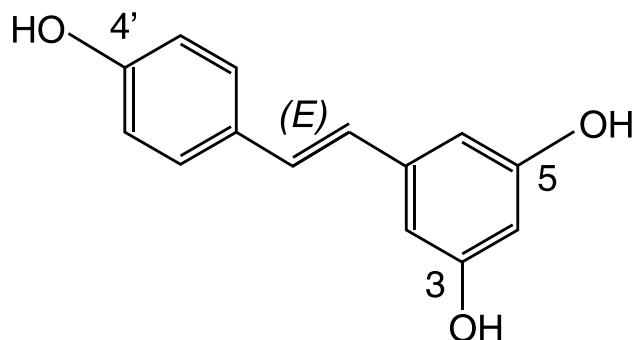
Resweratrol występuje w dwu izoformach, cis oraz trans a największymi naturalnymi jego źródłami są: winorośl właściwa (*Vitis vinifera*), korzeń rdestowca ostrokolczy-stego (*Polygonum cuspidatum*) oraz w mniejszym stopniu orzeszki ziemne, owoce morwy i ananasy [1].

Zjawisko dotyczące korzystnego wpływu wina i zawartego w nim resweratrolu określone zostało mianem „Paradoksu francuskiego” a związane było z niezwykle niskim odsetkiem występowania chorób o podłożu sercowo-naczyniowym w regionie basenu Morza Śródziemnego, pomimo spożywania dużych ilości tłuszczów oraz niewielkiej aktywności fizycznej odnotowywanej na tym obszarze. Ob-szerne badania nad resweratrolem wykazały cały szereg korzystnych właściwości tego związku, począwszy od dzia-łania antyoksydacyjnego, poprzez działanie przeciwzapalne oraz antyagregacyjne [2, 3].

Odkryto korzystny wpływ resweratrolu na gospodarkę wę-głodanową poprzez optymalizację insulinowrażliwości oraz jego ochronny wpływ na komórki beta wysp trzustkowych.

Resweratrol a choroby sercowo-naczyniowe

Resweratrol wywiera korzystny wpływ na układ sercowo-naczyniowy i choroby z nim związane poprzez dwa mechanizmy. Po pierwsze, działa rozkurczająco na śródbłonek naczyń krwionośnych, wykorzystując między innymi właściwości aktywujące syntezę tlenku azotu (NOS) oraz antyagregacyjne, co zapobiega rozwojowi miażdżycy.



Ryc. Wzór strukturalny resweratrolu

Szacuje się, że w Polsce choroby sercowo-naczyniowe stanowią około 60% wszystkich schorzeń. Z tego powodu niezwykle istotne są działania profilaktyczne, zapobiegające rozwojowi tych często śmiertelnie kończących się chorób. Resweratrol wywiera bezpośredni wpływ na płytki krwi, przeciwdziałając ich adhezji do kolagenu oraz fibrynogenu, hamując tym samym rozwój blaszek miażdżycowych. Dodatkowo, resweratrol zmniejsza uwalnianie ziarnistości płytkowych oraz hamuje agregację płytek krwi. Zmniejszenie ryzyka rozwoju chorób sercowo-naczyniowych wiąże się również z zahamowaniem peroksydacji lipidów przez resweratrol, co zapobiega wnikananiu zmodyfikowanych małych gęstych LDL (sdLDL) do ściany naczyń krwionośnych [1, 3, 4].

Resweratrol a choroby neurodegeneracyjne i nowotworowe

Sugeruje się również możliwość wykorzystania resweratrolu jako związku prewencyjnego w chorobach neurodegeneracyjnych oraz jako leku przeciwnowotworowego o działaniu hamującym rozwój komórek nowotworowych [3].

Resweratrol wywiera korzystne działanie na układ nerwowy. Właściwości antyoksydacyjne oraz przeciwzapalne i wynikające z nich działania neuroprotektoryjne, przyczyniają się do możliwości wykorzystania resweratrolu w prewencji i terapii wielu schorzeń neurodegeneracyjnych. W przeprowadzonych badaniach dotyczących choroby Alzheimera wykazano, iż resweratrol ogranicza odkładanie złogów β -amyloidu wzdłuż naczyń mózgowych oraz stymuluje rozpad β -amyloidu, przyczyniając się do spowolnienia rozwoju tego schorzenia [4].

Warto szerzej wspomnieć o właściwościach przeciwnowotworowych resweratrolu. Już w 1997 zauważono, że jego stosowanie może hamować rozwój nowotworów, jak również przyczyniać się do wzmocnienia stosowanej chemioterapii.

Właściwości przeciwnowotworowe resweratrolu objawiają się przede wszystkim poprzez usuwanie wolnych rodników tlenowych, co daje efekt przeciwmutagenny. W wyniku działania resweratrolu zmniejszeniu ulega aktywność cytochromów P-450. Badania *in vitro*, w niektórych nowotworowych liniach komórkowych wykazały, że resweratrol posiada właściwości wyciszające, między innymi poprzez inhibicję polimerazy DNA oraz reduktazy rybonukleotydowej. Resweratrol działa hamująco na cykl komórkowy, w szczególności w fazie G1/S, doprowadzając do zatrzymania proliferacji komórek nowotworowych oraz aktywowania ich apoptozy [4, 5].

Resweratrol i jego właściwości antyoksydacyjne

Szczególna cecha charakterystyczna resweratrolu i wzbudzająca duże zainteresowanie biochemików, związana jest z właściwościami antyoksydacyjnymi. Stres oksydacyjny będący czynnikiem sprzyjającym, między innymi rozwojowi miażdżycy, choroby Alzheimera czy Parkinsona jest niepożądanym i niezwykle niebezpiecznym zjawiskiem. Resweratrol wykazuje działania ochronne poprzez aktywację systemów antyoksydacyjnych, doprowadzając do zmniejszenia ilości wolnych rodników tlenowych – ROS (*Reactive oxygen species*), stanowiących przyczynę stresu oksydacyjnego. Mechanizm działania resweratrolu opiera się prawdopodobnie na indukcji czynników SIRT-1 (*protein deacetylase sirtuin 1*) oraz Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor*), które odgrywają szczególną rolę w aktywacji enzymów antyoksydacyjnych [3]. Udowodniono również, że stosowanie resweratrolu przyczyniać się może do obniżenia stężenia markerów stanu zapalnego. Zaobserwowano spadek stężenia fibrynogenu, zmniejszenie stężenia IL-1 (interleukiny -1), IL-6, IL-8 oraz TNF- α (*tumor necrosis factor- α* , czynnik martwicy nowotworu-alfa), jak również obniżenie stężenie białka ostrej fazy - CRP we krwi.

Resweratrol i jego wpływ na metabolizm węglowodanów i tkanki tłuszczowej

Funkcja ochronna przed cytokinami prozapalnymi oraz stymulowanie enzymów antyoksydacyjnych przyczynia się do protekcyjnego wpływu na komórki beta trzustki, co poprawia funkcjonowanie gospodarki węglowodanowej. Resweratrol zmniejsza stężenie glukozy poprzez wpływ na transporter glukozy - GLUT 4 (*glucose transporter type 4*), jednocześnie optymalizując insulinowrażliwość komórek [1, 3, 4, 5]. Powiązано również właściwości resweratrolu z możliwością zmniejszenia masy tkanki tłuszczowej w organizmie. Mechanizmy odpowiedzialne za to zjawisko związane są ze zwiększeniem fosforylacji oksydacyjnej oraz zwiększeniem aktywności kinazy białkowej. Dodatkowo aktywowana jest SIRT-1, czego konsekwencją jest wzrost syntezy insuliny oraz nasilenie lipolizy [6].

Mnogość badań nad wielokierunkowym działaniem resweratrolu pozwoliła zauważyć korzystne jego właściwości w terapii przeciwwirusowej. Istnieją badania sugerujące hamujący wpływ resweratrolu na replikację niektórych wirusów, takich jak: wirus opryszczki, wirus Epstein-Barr, cytomegalii oraz wirus HIV.

Sugeruje się również korzystny wpływ resweratrolu w leczeniu niealkoholowego stłuszczenia wątroby oraz w zapobieganiu osteoporozie poprzez stymulację osteogenezy [6].

Mechanizm działania resweratrolu a homeostaza wapnia

Mechanizmy oddziaływania resweratrolu w wielu jednostkach chorobowych powiązane są z wewnątrzkomórkową sygnalizacją za pośrednictwem wapnia. Ludzki organizm zawiera około 1 kg wapnia, z czego aż 99% znajduje się w tkance kostnej pod postacią hydroksyapatytu kostnego, a jedynie 1% stanowi, wymienną z płynem pozakomórkowym, pulę wapnia. Wynika z tego, że jony wapnia są rozmieszczone w organizmie ludzkim bardzo nierównomiernie a zmiany w jego wewnątrzkomórkowym stężeniu wiążą się z istotną odpowiedzią metaboliczną [7].

Resweratrol odgrywa ważną rolę w regulacji homeostazy wapniowej w komórce. Oddziałuje on, poprzez struktury białkowe zlokalizowane w błonach komórkowych retikulum endoplazmatycznego, mitochondrium, jak również poprzez białka zlokalizowane w ścianach komórkowych. Struktury białkowe tworzą systemy pomp/kanałów wapniowych, regulujących stężenie jonów wapnia w poszczególnych kompartmentach komórki. Homeostaza wapniowa komórek regulowana jest przez wewnątrzkomórkowe kanały wapniowe (ICC - Intracellular Calcium Channels), kanały wapniowe aktywowane uwalnianiem wapnia (CRACs - Calcium-Release Activated Channels) oraz kanały wapniowe sterowane potencjałem (VGCCs - Voltage-Gated Calcium Channels). Wiele leków stosowanych w chorobach sercowo-naczyniowych oddziałuje, poprzez wpływ na kanały wapniowe i uaktywnienie się wtórnego przekaźnika sygnału komórkowego, jakimi są jony Ca^{2+} . Biorą one udział w regulacji wielu podstawowych funkcji, między innymi: w skurczu mięśni, przekaźnictwie synaptycznym oraz hemostazie. Jony wapnia aktywują kinazę białkową C (PKC) i wpływają na fosforylację wielu białek (w tym enzymów), jak również uczestniczą w cyklu komórkowym, ekspresji genów oraz apoptozie komórek. Regulacja gospodarki wapniowej odbywa się przy współudziale trzech mechanizmów, w których uczestniczą: parathormon (PTH), kalcytonina (CT) oraz aktywna forma witaminy D $-1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ [2, 7].

Wewnątrzkomórkowe kanały wapniowe zaangażowane są w procesy proliferacyjne, apoptotyczne, w ekspresję genów oraz komunikację wewnątrzkomórkową. Poprzez wpływ resweratrolu na kanały ICC upatruje się korzyści związanych z leczeniem schorzeń o podłożu neurodegeneracyjnym.

Kanały zależne od potencjału błonowego, w szczególności typu L, oddziałują z resweratrole głównie poprzez tłumienie napływu jonów wapnia do komórki a pośrednio, obniżając wypływ jonów potasowych z komórki (przez kanały potasowe aktywowane wapniem K_{Ca}), przyczyniając się tym do rozkurczu naczyń.

Stężenie wapnia w komórce regulowane jest również poprzez pompę wapniową, usuwającą nadmiar jonów Ca^{2+} z cytozolu lub ich przemieszczanie do retikulum endoplazmatycznego, dzięki mechanizmowi SERCA (Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium ATP-ase). Nie ma oczywistych dowodów na bezpośredni wpływ resweratrolu na pompę wapniową SERCA, jednakże zauważono, że może on oddziaływać pośrednio poprzez aktywację białka SIRT-1 (*sirtuin-1*). Sirtuina odpowiada za wiele ważnych procesów dotyczących funkcjonowania organizmu. Zaburzenia w jej syntezie związane są z rozwojem chorób neurodegeneracyjnych, sercowo-naczyniowych oraz nowotworów. Resweratrol doprowadza do 13-krotnego zwiększenia aktywności sirtuiny, chroniąc komórki przed apoptozą, co może być wykorzystane w przyszłości do spowalniania procesów starzenia się [2, 8].

Udział resweratrolu w procesie apoptozy komórek nowotworowych odbywa się za pośrednictwem zależnej od kalpajny ATP-azy wapniowej oraz mitochondrium. Kalpaina należy do cytozolowych proteaz serynowych, których aktywność enzymatyczna zależna jest od jonów wapniowych. Uważa się, że resweratrol ułatwia apoptozę komórek nowotworowych w mechanizmie regulowanym przez ATP-azę wapniową, natomiast działając na mitochondrium, zwiększa on przepuszczalność błony mitochondrialnej, co przyczynia się do wzmocnienia terapii przeciwnowotworowej i ułatwienia niszczenia komórek nowotworowych.

W sytuacji zaburzenia homeostazy komórkowej w zakresie jonów wapnia, resweratrol przyczynia się do przywrócenia stanu równowagi i właściwej sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. Wpływa on na aktywność enzymatyczną oraz mitochondrialną, jak również na potencjał błonowy i apoptozę komórkową. Istnieje cały szereg możliwości oddziaływania resweratrolu na tzw. komórki pobudliwe (komórki mięśniowe, kardiomiocyty, komórki nerwowe) za pośrednictwem mechanizmów kontrolujących stężenie jonów wapnia, ich napływ do cytozolu lub aktywne wypompowywanie jego nadmiaru do cytoplazmy, jak również poprzez uzupełnianie wewnątrzkomórkowych repozytoriów wapniowych (retikulum endoplazmatyczne, mitochondria) [2].

Pleiotropowy wpływ resweratrolu na komórki pobudliwe, nowotworowe, komórki układu odpornościowego czy też komórki nabłonka barwnikowego siatkówki jest silnie uzależniony od komórkowych mechanizmów sygnalizacyjnych związanych z jonami wapnia.

Konsekwencją zaburzeń homeostazy wapniowej w miocytach są, między innymi, przedwczesne skurcze przedsionków czy arytmia serca. Resweratrol przywracając równowagę wapniową, łagodzi schorzenia wynikające z zaburzeń w funkcjonowaniu komórek mięśniowych. W mięśniach gładkich przyczynia się do wazodylatacji, doprowadzając do poszerzenia światła naczyń krwionośnych. Mechanizm rozkurczowy związany z mobilizacją jonów wapnia w komórkach śródbłonna, pośrednio stymuluje syntezę tlenu azotu, będącego silnym czynnikiem rozluźniającym mięśniówkę gładką naczyń krwionośnych. Wazodylatacyjny efekt działania resweratrolu stanowić może kolejne narzędzie do walki z nadciśnieniem tętniczym, miażdżycą czy restenozą po angioplastyce [2, 9, 10]. Choroby o podłożu neurodegeneracyjnym stanowią ogromny problem, w szczególności w obliczu starzejącego się społeczeństwa. W związku z silnym wpływem resweratrolu na przewodnictwo nerwowe oraz protekcyjnym jego oddziaływaniem na komórki neuronalne, wiąże się z nim duże nadzieje w walce z chorobą Alzheimera, Parkinsona czy też zaburzeniami związanymi z dostarczeniem tlenu lub glukozy do neuronów. Leczenie zaburzeń przewodnictwa nerwowego wiąże się z opóźnieniem oraz przedłużeniem napływu jonów wapnia do komórki. Ochrona przed udarem niedokrwinnym związana jest z pośrednim wpływem resweratrolu poprzez zależne od wapnia kanały potasowe (K_{Ca}). Jednym z potencjalnych mechanizmów walki z komórkami nowotworowymi jest modulujący wpływ resweratrolu na kanały wapniowe, co przyczynia się do napływu jonów wapnia do komórek nowotworowych, prowadzą do ich śmierci na skutek zaburzeń w funkcjonowaniu mitochondrium komórkowego. Dodatkowo sugeruje się użyteczność resweratrolu w leczeniu, w szczególności początkowych stadiów nowotworów złośliwych [2, 11].

Piśmiennictwo:

- Olas B Resweratrol jako dobroczynca w profilaktyce chorób układu krążenia. Kosmos. Problemy Nauk Biologicznych. 2006,55:277-285.
- McCalley AE, Kaja S, Payne AJ, Koulen P Resveratrol and Calcium Signaling: Molecular Mechanisms and Clinical Relevance. Molecules 2014,19:7327-7340.
- Stępień M, Bogdański P, Suliburska J, Jabłecka A, Pupek-Musialik D. Wpływ resweratrolu na cukrzycę i choroby sercowo-naczyniowe. Forum Zaburzeń Metabolicznych. 2012, 4:140-145.
- Kopeć A, Piątkowska E, Leszczyńska T, Bieżanowska-Kopeć R. Prozdrowotne właściwości resweratrolu. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość. 2011,5:5-15.
- Rossi T, Gallo C, Bassani B, Canali S, Albini A, Bruno A. Drink your prevention: beverages with cancer preventive phytochemicals. Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej 2014.
- Przysławski J, Dziecioł M. Resweratrol-aktualny stan wiedzy. Brom. Chem. Toksykol. 2012,4:1166-1174.
- Murray RK, Garner DK, Mayes PA, Rodwell V.W. Biochemia Harpera Wydawnictwo Lekarskie PZWL Warszawa wydanie III 1994.
- Siedlecka K, Bogusławski W Sirtuiny – enzymy długowieczności. Gerontologia Polska 2005, 13:147-145.
- Chen WP; Su MJ; Hung LM. In vitro electrophysiological mechanisms for antiarrhythmic efficacy of resveratrol, a red wine antioxidant. Eur. J. Pharmacol. 2007, 554, 196–204.
- Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: The in vivo evidence. Nat. Rev. Drug Discovery 2006, 5, 493–506.
- Raval AP, Dave KR, Perez-Pinzon MA. Resveratrol mimics ischemic preconditioning in the brain. J. Cereb. Blood Flow Metab. 2006, 26, 1141–1147.

Warto wiedzieć

Szczepionka przeciw grypie (wg CDC)

Centre of Disease Control (Centrum Zwalczenia i Zapobiegania Chorobom Atlanta) podaje, że tylko mniej niż w połowie Amerykanów, którzy zachorowali na grypę jesienią 2014 stwierdzono obecność wirusów, przeciwko którym jest skierowana obecnie stosowana szczepionka. Jest to dowodem dużego tempa mutacji wirusa H_3N_2 , co przyczynia się do obniżenia efektywności szczepień i było obserwowane już uprzednio, np. w latach 2007/2008. Tym niemniej CDC z dużym naciskiem zaleca szczepienia, które mogą złagodzić objawy infekcji. Należy również brać pod uwagę fakt, że w trakcie sezonu zachorowań na grypę mogą rozpowszechnić się inne typy wirusów, w stosunku do których obecna szczepionka jest bardziej efektywna.

Medexpress, 4 grudzień 2014

Ebola – gorący temat 2014

Choroba spowodowana zakażeniem wirusem Ebola w wioskach w Afryce Centralnej została opisana w roku 1976 i nosiła nazwę gorączki krwotocznej. Wirus na człowieka jest przenoszony przez dzikie zwierzęta, a następnie rozszerza się w populacji ludzkiej poprzez kontakt z krwią, wydzielinami i wydalninami. Ostatnia seria zachorowań, która rozpoczęła się w marcu 2014 r. objęła głównie takie kraje Zachodniej Afryki, jak Guinea, Sierra Leone i Liberia. Miała miejsce zarówno na terenach wiejskich, jak i w miastach, i odznaczała się bardzo wysoką śmiertelnością. Ze względu na objawy podobne do innych chorób zakaźnych (malaria, zapalenie opon mózgowych) występujących w Afryce, ostateczne rozpoznanie bez swoistych badań laboratoryjnych jest niemożliwe. Nadal nie jest dostępna szczepionka a leczenie pomimo pewnych prób wprowadzenia odpowiednich preparatów jest głównie objawowe i polega na nawodnieniu i zapewnieniu równowagi elektrolitowej.

Z danych WHO na dzień 20 stycznia 2015 r. wynika, że w czasie bieżącej epidemii zachorowało ponad 21 000 osób, z czego ponad 8 600 zmarło. Pojedyncze przypadki stwierdzono również w Hiszpanii, USA, UK. Liczba zachorowań wykazuje tendencje spadkowe i pomimo znacznej poprawy sytuacji i sposobu postępowania z chorymi, prof. Peter Piot – jeden z odkrywców wirusa, po wizycie w Sierra Leone stwierdził, że na walkę z chorobą trzeba być przygotowanym przez cały kolejny 2015 rok.

**WHO report
WHO**

Białka frakcji HDL

Stężenie cholesterolu frakcji HDL jest jednym z rutynowych parametrów, wchodzących w skład profilu lipidowego. Cholesterol jednak jest tylko jednym ze składników tej frakcji lipoprotein i stanowi około 20% jej składu, podczas gdy 50% to białka, których oznaczanie ze względów metodycznych nie jest powszechnie stosowane. Naukowcy z Uniwersytetu Medycznego w Wiedniu określili stężenia dwóch białek, związanych z HDL, a mianowicie SAA (serum amyloid A) oraz SP-B (surfactant protein B), wykazując ich korelację z liczbą incydentów sercowych oraz ogólną umieralnością. Autorzy sugerują, że wprowadzenie tych oznaczeń może w istotny sposób zmienić dotychczasową interpretację wartości diagnostycznej cholesterolu HDL. Dotyczy to głównie osób z przewlekłymi chorobami, jak cukrzyca czy schyłkowa niewydolność nerek, u których znaczenie cholesterolu HDL jako czynnika prognostycznego chorób układu sercowo-naczyniowego jest kwestionowane.

LabMedica, 10 grudzień 2014

Aktualizacja kryteriów rozpoznania szpiczaka plazmocytowego

Międzynarodowa Grupa Robocza ds. Szpiczaka Mnogiego (International Myeloma Working Group) w listopadzie 2014 r. zaktualizowała kryteria rozpoznania najczęstszej gammapatii monoklonalnej, jaką jest szpiczak plazmocytowy. W dużej mierze było to spowodowane nowymi możliwościami terapeutycznymi, których wprowadzenie we wczesnym okresie choroby zwiększa szanse na ograniczenie postępu zmian narządowych. Zmienione zalecenia kładą nacisk na wykrywanie wczesnych markerów i określają:

- 60% lub więcej komórek plazmatycznych w aspiracie szpiku kostnego
- Stosunek wolnych lekkich łańcuchów (FLC free light chain) kappa/lambda równy 100 lub większy
- Więcej niż jednoogniskowa zmiana w rezonansie magnetycznym

Aczkolwiek oznaczenia FLC są dostępne na szeregu analizatorach biochemicznych, to jednak ich wprowadzenie i interpretacja wyników będzie stanowić wyzwanie dla laboratorium.

www.thelancet.com/oncology November 2014

KOMENTARZE i UWAGI

Wprowadzając tę rubrykę, liczymy na głosy i uwagi użytkowników

Ocena efektywności pracy medycznego laboratorium diagnostycznego

Zbigniew Łagodziński, Dagna Bobilewicz

Medyczne Laboratorium Diagnostyczne (MLD) jest jednostką usługową, której produktem jest zaakceptowany przez osobę uprawnioną wynik badania. W MLD o częściowej automatyzacji, produkcję wyniku diagnostycznego możemy podzielić na kilka podstawowych ETAPÓW.

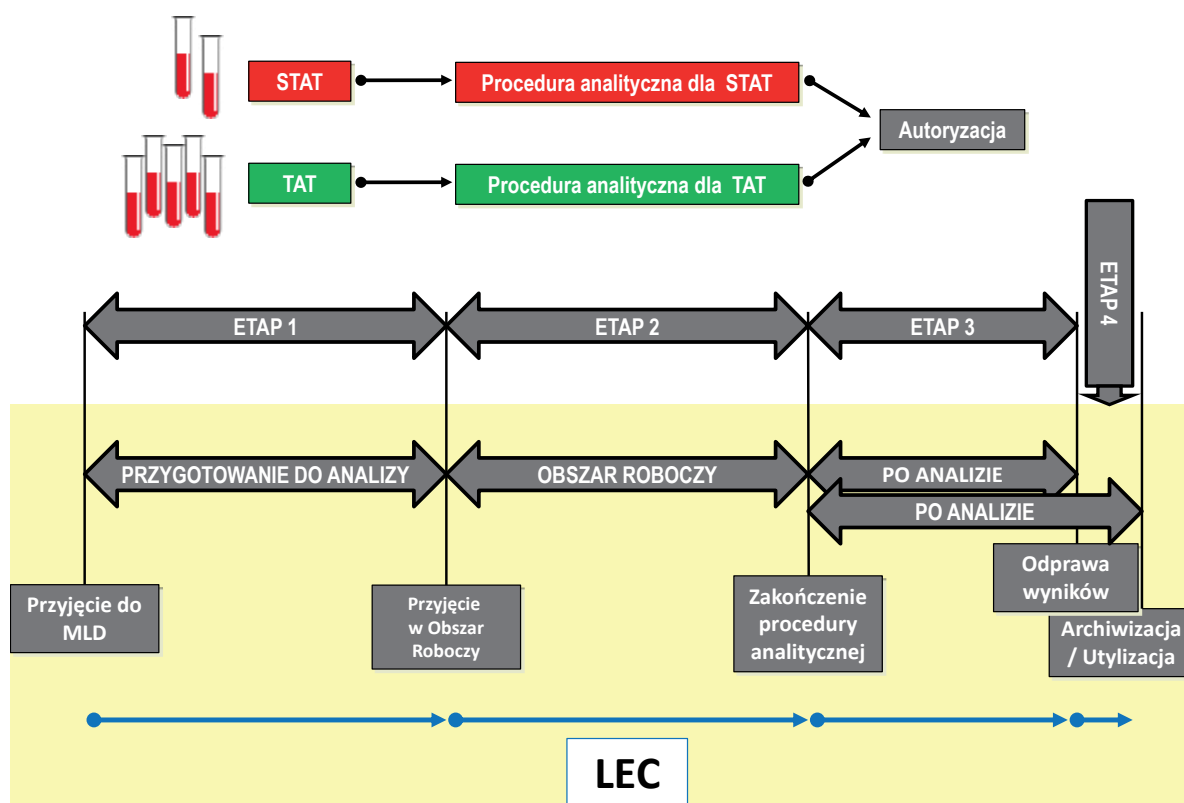
- A. ETAP 1.: Przygotowanie do Analizy. Od momentu przyjęcia materiału do MLD do chwili przekazania go do Obszaru Roboczego.
- B. ETAP 2.: Obszar Roboczy. Od momentu dostarczenia materiału do miejsca pracy analizatora do chwili akceptacji wyniku.

C. ETAP 3.: Poanalizyczny. Od momentu autoryzacji wyniku do chwili przesłania go do zleceniodawcy i dalej do utylizacji, bądź archiwizacji materiału.

Dokładny pomiar i analiza poszczególnych ETAPÓW pozwala na oszacowanie efektywności pracy MLD, a w szczególności:

- ✓ określenie liczby niezbędnego personelu
- ✓ ocenę organizacji pracy oraz zalecenia, dotyczące ewentualnych zmian
- ✓ zredukowanie liczby błędów
- ✓ poprawa wyniku ekonomicznego (obniżenie kosztów)

Ryc. 1 POMIARY Z WYKORZYSTANIEM LEC



Dokonanie audytu MLD w zakresie efektywności produkcji wyniku umożliwia program o nazwie LEC (Laboratory Efficiency Calculator – Kalkulator Efektywności Laboratorium), dzięki któremu dokonywane są pomiary dotyczące poszczególnych ETAPÓW (Ryc. 1). LEC zbiera i przetwarza dane w sposób automatyczny. Wyniki uzyskiwane są w oparciu o metody statystyczne.

Praca LEC opiera się na pomiarach dotyczących materiału analitycznego: liczbie próbek i szybkości ich przepływu (Ryc. 2).

Pomiary mogą być dokonywane przez całą dobę, aczkolwiek dla właściwej organizacji pracy i zapewnienia odpowiedniej wydajności produkcji, wystarczy zebranie danych w godzinach największego nasilenia napływu materiału (Ryc. 3). Właśnie w tym okresie, ze względu na duże natężenie pracy, może występować brak płynności, czego konsekwencją są opóźnienia i wzrost prawdopodobieństwa popełnienia błędów.

ETAP 1. Dokonywany jest pomiar dotyczący liczby próbek materiału. Na podstawie tych danych wyliczana jest płynność obiegu próbek, co pozwala na analizę efektywności pracy (skuteczność wykonania poszczególnych czynności).

Opracowanie ma na celu:

- ✓ optymalizację organizacji pracy
- ✓ dopasowanie struktury zatrudnienia do stanowisk
- ✓ celowość wprowadzenia automatyzacji (sorter)

ETAP 2. Przepływ materiału przez Obszary Robocze

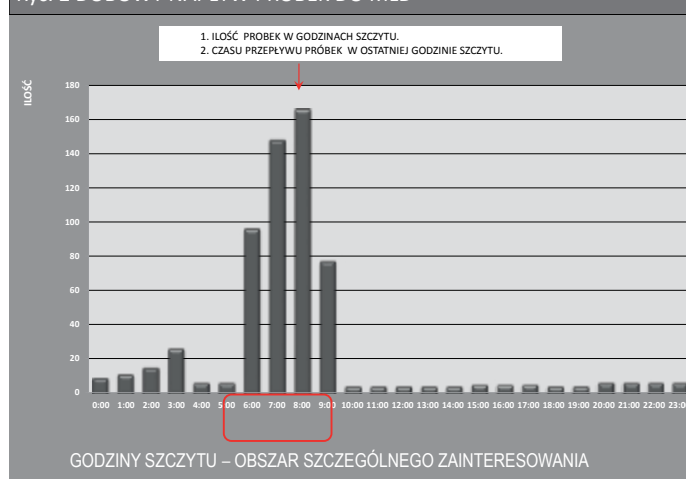
- ✓ czynności przygotowawcze
- ✓ analizę właściwą (praca analizatora)

Praktyczna wydajność analizatora to średnia liczba oznaczeń wykonana w ciągu godziny. Określony czas pobytu próbki w Obszarze Roboczym jest ustalany indywidualnie. Wyliczenia określają najniższą wydajność niezbędną do wykonania analiz w wyznaczonym czasie. Częstokroć wydajność analizatorów jest zbyt duża w porównaniu do realnych potrzeb, co podnosi koszty ogólne (Ryc. 3). Rzadziej spotyka się analizatory o zbyt małej wydajności i w tym przypadku obliczany jest czas opóźnienia oraz liczba prób, które będą analizowane po zaplanowanym czasie.

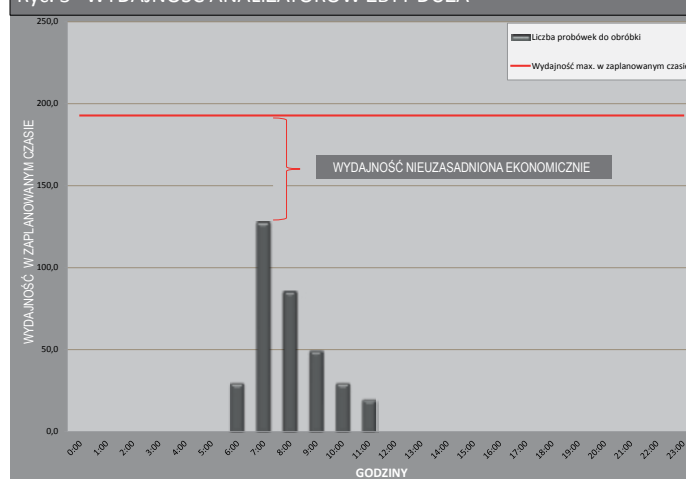
ETAP 3. Obliczenia dotyczące tego etapu dokonywane są analogicznie jak w Etapie 1.

Wynik ekonomiczny MLD uzależniony jest od właściwej organizacji procesu produkcji wyniku. Składa się na to organizacja pracy poszczególnych stanowisk roboczych, właściwa liczba wyszkolonego personelu oraz dopasowanie wydajności analizatorów do liczby wykonywanych badań. Płynny obieg materiału, a także informacje dotyczące wyniku, pozwalają na wyeliminowanie tzw. „wąskich gardeł”, co przekłada się na zminimalizowanie liczby błędów. Na dokonanie kompleksowej analizy z wykorzystaniem LEC potrzeba zaledwie kilku dni. Ocena poszczególnych ETAPÓW i ich wzajemnych powiązań umożliwia wprowadzenie zmian, które wpłyną na poprawę jakości pracy MLD.

Ryc. 2 DOBOWY NAPŁYW PRÓBEK DO MLD



Ryc. 3 WYDAJNOŚĆ ANALIZATORÓW ZBYT DUŻA



DLA KLIENTÓW FIRMY HORIBA KONSULTACJE DOTYCZĄCE PROGRAMU LEC SĄ BEZPŁATNE

adres do korespondencji:
zbnigniew.lagodziniski@horiba.com

Porównanie elektroforezy na żelu agarozowym w systemie Sebia HYDRASYS z elektroforezą kapilarną prowadzoną w nowym systemie Sebia CAPILLARYS 2 do analizy białka surowicy

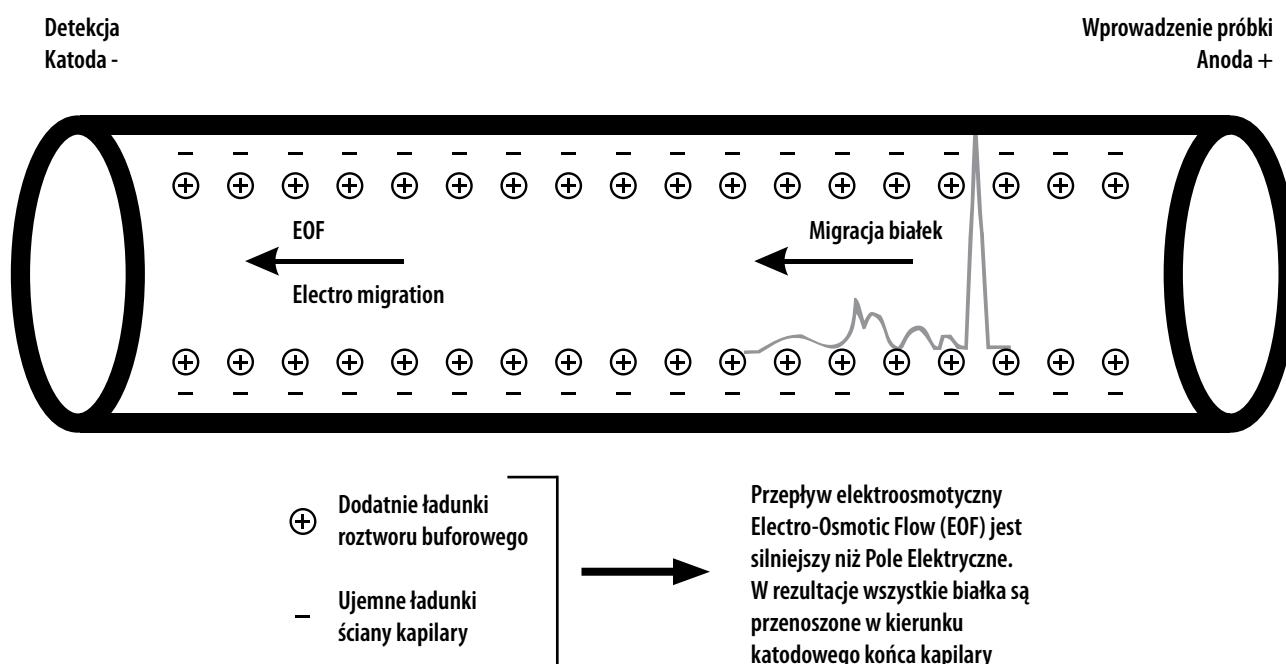
Genevieve Hennache

Analiza białek surowicy wykorzystująca konwencjonalną elektroforezę na octanie celulozy lub żelach agarozowych stanowiła istotne zadanie laboratoriów chemii klinicznej przez wiele lat. Elektroforeza kapilarna w ostatniej dekadzie stosowana była w dziedzinach badawczych, gdzie wykorzystywano ją do separacji różnych substancji. Obecnie elektroforeza kapilarna została przyjęta jako rutynowa technika oznaczeń analitycznych w diagnostyce klinicznej. Zaletami tego systemu są: pełna automatyzacja, szybka analiza oraz brak konieczności barwienia. Dostępne na rynku żele agarozowe HYDRAGEL® zostały przygotowane do wykorzystania w półautomatycznym systemie do elektroforezy Sebia HYDRASYS. Zestaw CAPILLARYS PROTEIN 6 jest zaprojektowany do rozdzielania białek ludzkiej surowicy w alkalicznym roztworze buforowym (pH 10) za pomocą systemu elektroforezy kapilarnej Sebia, CAPILLARYS. Analizator ten wykonuje wszystkie sekwencje automatycznie w celu otrzymania profilu białkowego dla analizy jakościowej lub ilościowej. Wykorzystując dwie techniki, elektroforezie poddano dwie surowice: normalną i patologiczną.

Zostały przeprowadzone badania odtwarzalności i czułości. Zostały określone wartości prawidłowe dla zestawu CAPILLARYS PROTEIN 6 oraz zostały przeprowadzone badania dotyczące korelacji przy użyciu żelu HYDRAGEL. Obie techniki dają podobne wyniki. Dolna granica wykrywania dla testu CAPILLARYS PROTEIN 6 została określona poprzez oznaczenie monoklonalnego składnika seryjnie rozcieńczonego w prawidłowej surowicy. Najniższe wykryte stężenie wynosiło 20 mg/dl.

Tysiąc próbek zawierających przynajmniej jeden składnik monoklonalny zostało równolegle poddanych analizie przy wykorzystaniu zestawu HYDRAGEL 15/30 β 1- β 2 i CAPILLARYS PROTEIN 6. Analizie zostały poddane próbki z: bisalbuminią, podwójną alfa-1 antytrypsyną, próbki zhemolizowane, z interferencją bilirubiny, próbki hiperlipemiczne, immunoglobuliny polimerowe, krioglobulinemia, hiper oraz hipogammaglobulinemia, białka oligoklonalne oraz biklonalne, jak również składniki monoklonalne w obszarach gamma i beta.

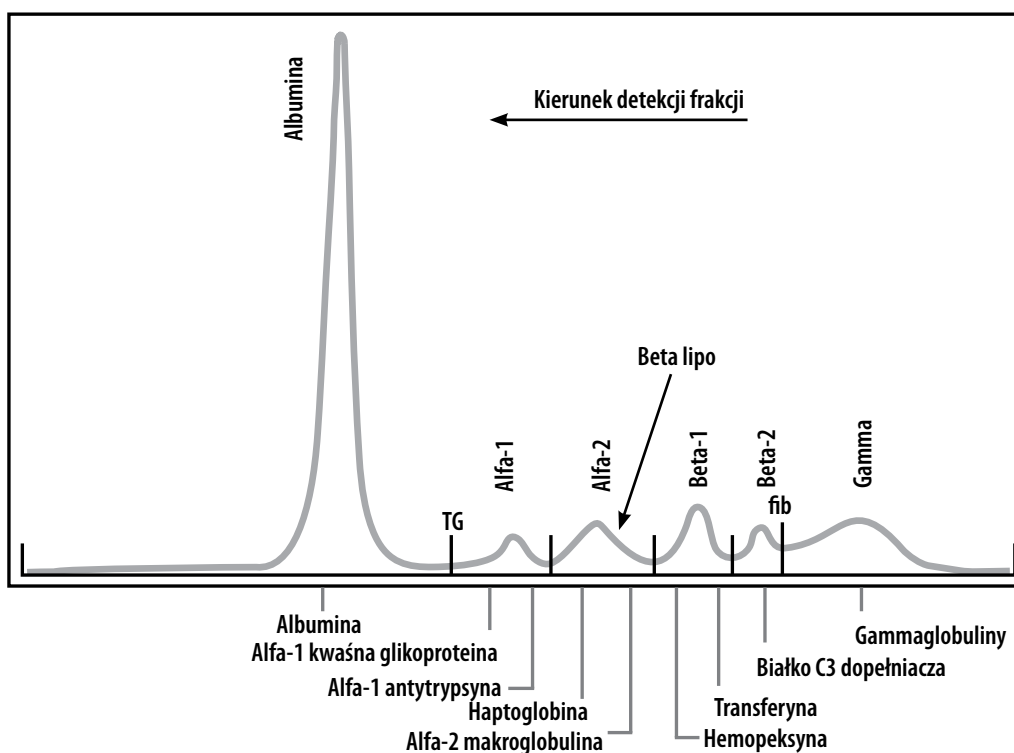
ZASADA ROZDZIAŁU



WARTOŚCI PRAWIDŁOWE

Nazwy frakcji	Wartości (Capillarys)
Albumina	55,9 – 65,8%
Alfa-1	3,6 – 6,0%
Alfa-2	5,8 – 9,9%
Beta-1	5,6 – 8,1%
Beta-2	3,0 – 6,4%
Gamma	10,9 – 18,8%

Identyfikacja frakcji



Frakcje	Współczynnik korelacji	W obrębie serii CV (%)	Pomiędzy seriami CV (%)
Albumina	0,970	1,2	1,1
Alfa-1	0,948	4,2	5,8
Alfa-2	0,928	1,1	3,0
Beta-1	0,736	3,8	3,6
Beta-2	0,977	3,0	3,6
Gamma	0,972	2,0	2,2

DOKŁADNOŚĆ – BADANIA PORÓWNAWCZE

Do głównych zalet nowej metody CAPILLARYS PROTEIN 6 należy zaliczyć: całkowitą automatyzację analizy od pobrania materiału biologicznego z próbki pierwotnej aż do otrzymania końcowego wyniku, wysoka wydajność (90 próbek na godzinę), doskonała odtwarzalność i korelacja w stosunku do agarozy oraz wysoka czułość.

Doświadczenia własne pracy na wysokowydajnych analizatorach hematologicznych w dużym laboratorium szpitala klinicznego

Emilia Czyżewska, Agnieszka Wiśniewska

Współczesne laboratoria diagnostyczne nie mogą funkcjonować bez nowoczesnego zaplecza technicznego, co dotyczy również oznaczeń hematologicznych. Bogata oferta producentów pozwala wybrać analizator w zależności od potrzeb i możliwości. Dla dużych laboratoriów w odniesieniu do badań z zakresu podstawowej hematologii najbardziej komfortowa jest możliwość pracy na co najmniej dwóch różnych analizatorach tak dobranych, aby uzyskiwane wyniki były porównywalne a jednocześnie różnice techniczne, metodyczne i inne mogły być odpowiednio wykorzystane, co przyczyniłoby się do zwiększenia efektywności pracy i jakości uzyskiwanych wyników.

W pracowni hematologii Laboratorium Centralnego SPCSK w Warszawie badania morfologii (ponad 100 tys. rocznie) wykonywane są na dwóch różnych analizatorach wiodących i cenionych na rynku producentów. Zarówno Pentra DX120 Nexus (Horiba ABX), jak i Sysmex 2000XN (Sysmex) są najnowocześniejszymi wersjami analizatorów, które już wcześniej sprawdziły się w ww. pracowni. Wybór obecnych analizatorów w dużej mierze opierał się na pozytywnych doświadcze-

niach w pracy z ich poprzednikami: Pentrą DX120 oraz Sysmex XT 2000i.

Wyniki wykazują dużą zgodność tak w zakresie wartości prawidłowych, jak i patologicznych. Tym niemniej należy pamiętać, że w przypadkach trudnych diagnostycznie różnice pomiędzy analizatorami mogą być i nierzadko są wątpliwości, który i czy w ogóle którykolwiek z wyników jest prawdziwy. Ostateczna decyzja powinna uwzględniać stan kliniczny, wyniki poprzednich badań, a także, co jest bardzo istotne, wyniki uzyskane w oparciu o ocenę rozmazu mikroskopowego.

Dodatkową korzyścią jest możliwość wykorzystania wyników do procedur kontrolnych. Codzienne porównywanie wyników, uzyskiwanych w losowo wybranych kilku próbkach pacjentów, stanowi bardzo przydatną formę kontroli jakości, prowadzoną na oryginalnym materiale biologicznym. Jest to cenne uzupełnienie standardowych procedur, wykonywanych w oparciu o dostarczane przez producentów próbki kontrolne. Właśnie różnice wyników otrzymanych jednocześnie z obu analizatorów w próbkach pacjentów są często pierwszym sygnałem, sugerującym konieczność wszczęcia procedur naprawczych.

Parametr	Jednostki	Sysmex NX	Pentra DF 120
WBC	$10^3/\text{mm}^3$	1,09	1,0
RBC	$10^6/\text{mm}^3$	3,42	3,49
HGB	g/dl	11,1	11,1
HCT	%	32,4	33,7
MCV	μm^3	94,7	97,0
MCH	pg	32,5	31,8
MCHC	g/dl	34,3	32,8
RDW	%	15,6	15,8
PLT	$10^3/\text{mm}^3$	42	45

Tabela 1. Przykład wyników przy bardzo niskich wartościach krwinek białych i niskich wartościach płytek krwi

Parametr	Jednostki	Sysmex NX	Pentra DF 120
WBC	$10^3/\text{mm}^3$	3,63	3,5
RBC	$10^6/\text{mm}^3$	4,80	4,84
HGB	g/dl	16,0	15,8
HCT	%	44,6	46,9
MCV	μm^3	92,9	97,0
MCH	pg	33,3	32,6
MCHC	g/dl	35,9	33,7
RDW	%	12,5	13,1
PLT	$10^3/\text{mm}^3$	59	59

Tabela 2. Przykład wyników przy niskich wartościach krwinek białych i niskich wartościach płytek krwi

Parametr	Jednostki	Sysmex NX	Pentra DF 120
WBC	$10^3/\text{mm}^3$	35,51	32,5
RBC	$10^6/\text{mm}^3$	3,28	3,37
HGB	g/dl	9,8	10,0
HCT	%	28,5	30,3
MCV	μm^3	86,9	90,0
MCH	pg	29,9	29,8
MCHC	g/dl	34,4	33,1
RDW	%	14,4	14,1
PLT	$10^3/\text{mm}^3$	373	404

Tabela 3. Przykład wyników przy wysokich wartościach krwinek białych i wysokich wartościach płytek krwi

Funkcjonalność analizatora hematologicznego Pentra 80XLR w średniej wielkości laboratorium diagnostycznym

Bożena Gałuszka, Tadeusz Kujawski

Aparat Pentra 80 XLR firmy Horiba Medical to kompaktowy analizator hematologiczny, umożliwiający równoczesne oznaczanie 35 parametrów. Oprócz 12 wchodzących w skład podstawowej morfologii CBC oraz 14 różnicujących krwinki białe, analizator oznacza również bezwzględną i względną (RET#, RET%) oraz skorygowaną liczbę retikulocytów (CRC) a także inne wskaźniki retikulocytarne stanowiące istotny postęp w diagnostyce i różnicowaniu niedokrwistości. Wśród nich podaje średnią objętość retikulocytów (MRV), średnią zawartość hemoglobiny w retikulocycie (RHCc), stosunek liczby niedojrzałych retikulocytów do całości populacji retikulocytów (IRF) oraz ocenia stopień ich dojrzałości w oparciu o zawartość kwasów RNA, wyróżniając retikulocyty o niskiej zawartości RNA – RETL% (najstarsze), retikulocyty o średniej zawartości RNA – RETM% i retikulocyty o wysokiej zawartości RNA – RETH% (najmłodsze). Wymienione wyżej parametry, aczkolwiek nie są badaniami pierwszego rzutu, odgrywają coraz większą rolę w diagnostyce i różnicowaniu niedokrwistości oraz monitorowaniu leczenia a wprowadzenie analizatora Pentra 80XLR umożliwi ich rozpowszechnienie szczególnie w laboratoriach średniej wielkości.

Aparat Pentra 80 XLR, który pojawił się na rynku medycznym w Polsce w IV kwartale 2013 roku, z założenia przeznaczony jest do średnich laboratoriów lub jako back-up. Jedną z pierwszych placówek, w jakiej został zainstalowany, jest laboratorium Samodzielnego Publicznego Specjalistycznego Zakładu Opieki Zdrowotnej w Łęborku.

Oznaczanie 80 morfologii w czasie 1 godziny, podajnik automatyczny o pojemności 100 próbek, tryb ręczny (CITO) z podajnikiem manualnym, umożliwiającym przerwanie w każdej chwili pracy w trybie automatycznym oraz intuicyjne menu z bezpośrednim dostępem do poszczególnych funkcji aparatu poprzez wyraźne i czytelne ikony, to zdaniem personelu, najbardziej rozpoznawalne cechy aparatu. Bardzo istotną zaletą są jedne z najmniejszych na rynku objętości krwi niezbędne do wykonania badania – tylko 30 µl w trybie CBC, 53 µl w trybie CBC+DIFF oraz 35 µl w trybie RET.

Personel laboratorium zwraca również uwagę na moduł, umożliwiający tryb wyboru rozcieńczenia CDR - możliwość automatycznego zwiększenia liniowości pomiaru w przypadku wyników wykraczających poza zakres referencyjny. Próbkki są automatycznie flagowane, rozcieńczane i powtórnie badane, co umożliwia uzyskanie wyniku przy zwiększonej liniowości. Oprócz tego to, co czyni ten aparat unikatowym na rynku, jest konfigurowalna automatyczna walidacja, która umożliwia zatwierdzenie wyników, ich edytowanie i zmiany raportu końcowego poprzez wykorzystanie powtórzonej analizy morfologii krwi. Dodatkowa możliwość zapisu reguł decyzyjnych opartych na flagach i parametrach granicznych sprawia, że korzystając z informacji, które przekazuje aparat, operator może szybciej decydować o wykonaniu testów dodatkowych.

Nie bez znaczenia jest przejrzysty raport pacjenta, przedstawiający wynik badania, dane demograficzne, wykresy poszczególnych parametrów, histogramy. Kolorowa matryca oraz flagi na jednym ekranie sprawiają że, w przeciwieństwie do innych analizatorów, nie trzeba przełączać ekranów. Zwłaszcza w średnich laboratoriach niedysponujących innymi analizatorami, przydatna jest funkcja trybu ręcznego – podajnik manualny daje pewność, że niezależnie od wykonywanych analiz, w każdej chwili można zatrzymać pracę aparatu i wykonać morfologię wraz z retikulocytami. Operator ma niezależnie możliwość dostępu do rejestrów zawierających informacje dotyczące stanu aparatu (kalibracja, kontrola jakości, konserwacja) oraz ustawienia aparatu.

Cenna jest również funkcja auto-rerun, dzięki której wyniki patologiczne mogą być natychmiast weryfikowane przy pomocy dodatkowej analizy.

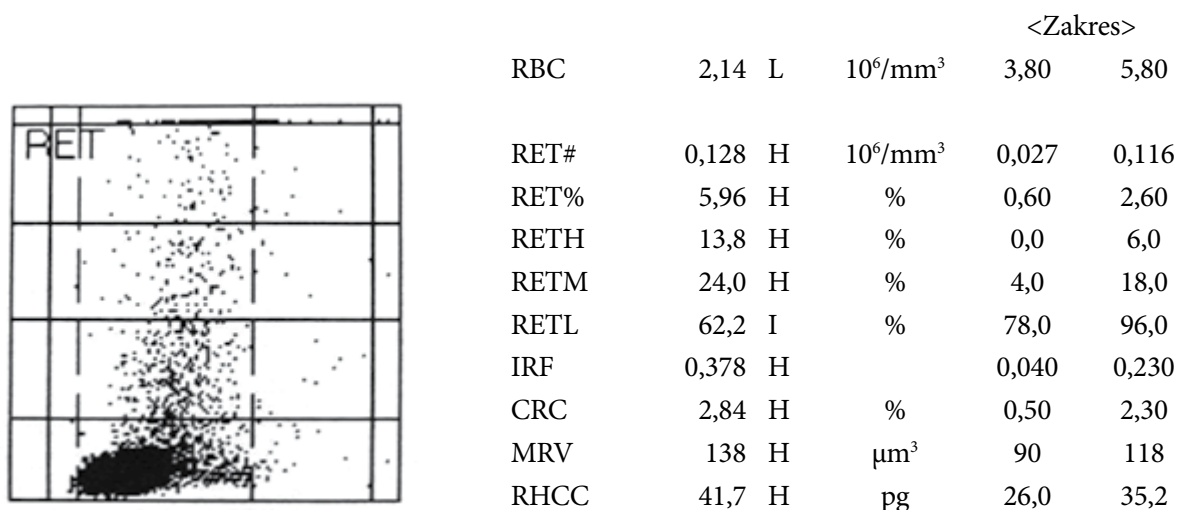
Pomimo włączenia na analizator oznaczeń retikulocytów, można obserwować wzrost wydajności pracy w średnich laboratoriach, oznaczanie retikulocytów nie wymaga bowiem dodatkowego barwienia roztworem błękitu brylantowo-krezolowego.

W aparacie Pentra 80 XLR zastosowano nowoczesne rozwiązania technologiczne, takie jak pomiar impedancji,

cytometria przepływowa, cytochemia, fluorymetria oraz wspomagające je MDSS (Multi Distribution Sampling System) i DHSS (Double Hydrodynamic Sequential System). Ponadto należy zwrócić uwagę na parametry techniczne. Aparat jest wyposażony w pamięć 10 000 wyników pacjentów możliwych do archiwizacji na dysku zewnętrznym USB, 36 plików QC oraz 100 pomiarów dotyczących krzywej Bulla (XB). Dzięki tak dużej pamięci, laboratorium

może wrócić po długim okresie do wyniku pacjenta i go wydrukować.

Z każdym rokiem przybywa laboratoriów diagnostycznych, posiadających w swojej ofercie możliwość w pełni zautomatyzowanego oznaczania parametrów retikulocytarnych. Jesteśmy przekonani, że w trakcie decyzji o wyborze aparatu oznaczającego retikulocyty wezmą Państwo pod uwagę analizator Pentra 80 XLR firmy Horiba Medical (Ryc. 1).



Ryc. 1. Przykładowy wynik dotyczący retikulocytów uzyskany z aparatu

Pentra XLR

Wydajność i wiarygodność w Hematologii

Kompaktowy i niezawodny analizator hematologiczny z możliwością oznaczania retikulocytów metodą fluorescencyjną

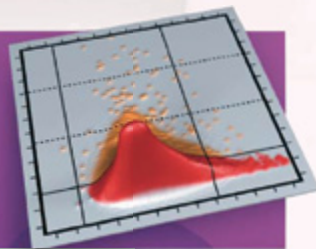
- 35 parametrów analizowanych z wydajnością 80 próbek na godzinę
- Referencyjne metody oznaczania parametrów krwi
- Kompatybilność ze stacją zarządzająco-walidującą ABX Pentra ML



Pełny panel parametrów retikulocytów z 35µL krwi

RET#: Wartość bezwzględna retikulocytów
RET%: Wartość procentowa retikulocytów
RETH%, RETM%, RETL%

RHCc: Zawartość komórkowej hemoglobiny w retikulocytach
MRV: Średnia objętość retikulocytów (fl, μm^3)
CRC%: Skorygowany odsetek retikulocytów (%)



Erytroblasty

Retikulocyty

Krwinki czerwone



Zintegrowana hematologiczna platforma diagnostyczna

- **Nexus** – 50 parametrowy analizator hematologiczny o wydajności 120 morfologii na godzinę
- Rozdział WBC na podwójnej matrycy LMNE
- Pomiar retikulocytów i erytroblastów z wykorzystaniem fluorescencyjnej cytometrii przepływowej
- Zintegrowany moduł **SPS** do automatycznego wykonywania i barwienia rozmazów krwi obwodowej
- Stacja zarządzająca walidacją **Pentar ML**
- **Easy Cell**
 - zautomatyzowana diagnostyka preparatów hematologicznych

