



# VOICE

Nr 2 (14)

Grudzień 2006

ISSN 1895-5924

## Holotranskobalamina – aktywna witamina B12

## Zastosowanie cytometrii przepływowowej w klinicznej diagnostyce laboratoryjnej

## Wskaźniki czerwonokrwinkowe



*W Nowym  
2007 roku  
życzymy Państwu  
dużo radości,  
wielu osiągnięć w pracy zawodowej  
i w życiu prywatnym.*

*Pracownicy firmy  
Abbott Laboratories Poland*

**Komitet Naukowy**

**Dagna Bobilewicz** – Warszawa  
**Jan Kulpa** – Kraków  
**Wiesław Piechota** – Warszawa

**Redakcja**

**Mirosława Nowacka**  
– Abbott Laboratories Poland



**Abbott Laboratories Poland Sp. z o.o.**  
ul. Postępu 18 A, 02-676 Warszawa  
tel. (0-22) 606 10 50, fax (0-22) 606 10 80

# HOLOTRANSKOBALAMINA – AKTYWNA WITAMINA B12

## Holotranscobalamin – active B12

Maria Bożentowicz, Dagna Bobilewicz  
Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej Wydziału Nauki o Zdrowiu Akademii Medycznej w Warszawie  
ul. Banacha 1 A, 02–097 Warszawa,  
e-mail: dagna@amwaw.edu.pl

### ■ Streszczenie

Głównymi konsekwencjami niedoboru witaminy B12 są niedokrwistości makrocytowe i zaburzenia neurologiczne. Niedobory te spowodowane są czynnikami egzogennymi (niedobory w diecie) i endogennymi (choroby przewodu pokarmowego, genetyczne defekty w białkach transportujących). Dotychczas podstawowym testem diagnostycznym do wykrywania niedoborów było stężenie całkowitej B12 w surowicy. Objawy kliniczne niedoboru nie korelują ze stężeniem B12 w surowicy. Nowym dostępnym parametrem laboratoryjnym jest holotranskobalamina – „aktywna witamina B12”. Test ten oznacza kompleks białko-wit.B12, rozpoznawany przez receptory tkankowe i będący jedynym źródłem witaminy możliwym do wykorzystania przez komórki. Wstępne prace wykazały przydatność tego testu szczególnie w przypadkach stężeń witaminy B12 w zakresie tzw „szarej strefy” 200 – 338 pg/ml (150 – 250 pmol/l).

### ■ Summary

Macrocytic anemia and neurological disorders are known to be results of B12 deficiency which is caused either by exo (malnutrition) or endogenic factors (diseases of GI). Until now serum B12 has been the most common laboratory test nevertheless clinical symptoms do not correlate with serum B12. New test holotranscobalamin – „active B12” measures transcobalamin-B12 complex recognized by cell membrane receptors – only available source of B12 for tissues. Preliminary data show the utility of that test for early detection of B12 deficiency especially when serum B12 is in „grey zone” range 200 – 338 pg/ml (150 – 250 pmol/l).

**Słowa kluczowe:** holotranskobalamina, metoda oznaczania, aktywna witamina B12

**Key words:** holotranscobalamin, method of assessment, active B12.

Niedobór witaminy B12, dotyczący w krajach północnoeuropejskich 1 – 2% populacji<sup>(1)</sup> i będący obok niedoboru żelaza i kwasu foliowego jedną z przyczyn niedokrwistości manifestuje się również zaburzeniami w innych układach, w tym w układzie nerwowym. U podstaw patogenezy zmian leży upośledzona synteza kwasów nukleinowych, prowadząca do makrocytozy i megaloblastozy, a także do demielinizacji włókien nerwowych.

Struktura witaminy B12 została opisana w 1955 r. przez D. Hodgkin, natomiast po raz pierwszy związek ten został wyodrębniony przez K. Folkersa jako cyjanokobalamina (CNCbl). W latach wcześniejszych trwały badania nad czynnikiem przeciwko anemii złośliwej, którym jak się okazało była witamina B12, wykryta w wątrobie wołowej. Witamina B12 należy do witamin rozpuszczalnych w wodzie, jest niezbędna komórkom organizmu do metabolizowania związków jednowęglowych oraz bierze udział w syntezie DNA. Jest ośmiobocznym kompleksowym związkiem kobaltu, składającym się z protoporfirynopodobnego makropierścienia z jonem kobaltu w centrum, z nukleotydu i drugiej związanej z kobaltem grupy CN oraz H<sub>2</sub>O, CH<sub>3</sub> itd., stąd nazywana jest także cyjankobalamina (kobalamina – Cbl).

Kobalamina wytwarzana jest przez drobnoustroje. Syntetyzowana przez bakterie w jelicie grubym człowieka, poniżej miejsca swego wchłaniania, nie ulega absorpcji i dlatego praktycznie jedynym źródłem witaminy B12 dla człowieka jest mięso, w mniejszym stopniu produkty mleczne a szczególnie dużo znajduje się jej w wątrobie. Ponad to kobalamina jest obecna w drożdżach. Zapotrze-

bowanie dzienne osoby dorosłej na witaminę B12 wynosi około 5µg. Kobalamina magazynowana jest w wątrobie w ilości 2 do 3 mg tj. pokrywającej zapotrzebowanie na około 3 – 4 lata. Prawidłowe stężenie witaminy B12 w surowicy to 200 – 900 pg/ml (150 – 666 pmol/l)<sup>(1,4)</sup>.

Istnieje wiele nieaktywnych związków, podobnych do kobalaminy, mogących interferować w oznaczenia stężenia tego związku, jednak fizjologiczną rolę w organizmie człowieka spełniają dwie z poznanych form witaminy B12, metylokobalamina, przeważająca w surowicy i 5-dezoksyadenozylkobalamina (deoksykobalamina, adenzynokobalamina), występująca głównie w hepatocytach, komórkach miększu nerek i erytrocytach. Kobalamina pełni rolę koenzymu. Dla ssaków charakterystycznymi procesami, w których uczestniczy jest synteza metioniny i konwersja kwasu metylomalonowego do bursztynowego. Syntaza metioninowa bierze udział w tworzeniu metioniny z homocysteiny co wymaga metylokobalaminy jako kofaktora. W tej reakcji grupa metylowa, związana z kobalaminą, zostaje przeniesiona na homocysteinę, w wyniku czego powstaje metionina. Następnie kobalamina przenosi grupę metylową z N-metylotetrafolianu, przez co powstaje tetrahydrofolian. Dzięki tej reakcji tworzone są zapasy metioniny oraz udostępniany jest tetrahydrofolian do syntezy puryn oraz kwasów nukleinowych. Inny enzym, mutaza L-metylomalonilo-CoA wymaga adenozylokobalaminy katalizującej reakcję tworzenia sukcylo-CoA z metylomalonylo-CoA w szlaku konwersji propionianu do metabolitu cyklu kwasu cytrynowego. Reakcja ta ma znaczenie dla procesu glukoneogenezy, a jej upośledzenie prowadzi do nagromadzenia nieprawidłowych związków lipidowych. Prawdopodobnie ich odkładanie w neuronach może być przyczyną zaburzeń w ośrodkowym układzie nerwowym.<sup>(1,3,9)</sup>

Z powodu silnie polarnej struktury kobalaminy uniemożliwiającej swobodne przenikanie przez błony komórkowe jej wchłanianie, magazynowanie oraz przemiany możliwe są dzięki występowaniu specyficznych hydrofobowych białek pozakomórkowych i wewnątrzkomórkowych. Do białek tych zalicza się czynnik wewnętrzny Castle'a (IF – Intrinsic Factor) wytwarzany przez komórki okładzinowe żołądka, występujący w przewodzie pokarmowym oraz haptokorynę (transkobalaminę I) i transkobalaminę II występujące również we krwi. Na komórkach nabłonka jelitowego znajdują się receptory dla kompleksu kobalamina czynnik wewnętrzny, a dla kompleksu kobalamina-transkobalamina w tkankach. W pierwszym etapie, w świetle jelita cienkiego kobalamina, związana z białkami treści pokarmowej, podlega działaniu kwasu żołądkowego i enzymów trawiennych, a następnie wiąże się z czyn-

nikiem wewnętrznym i w takiej formie jest transportowana przez błonę enterocyty, na której jest obecny receptor dla kompleksu IF-kobalamina (IFCR), zwany też kubiliną. Wchłanianie kompleksu witamina B12-IF wymaga obojętnego pH i obecności jonów Ca<sup>2+</sup>. We wnętrzu enterocyta czynnik wewnętrzny jest degradowany. Następuje formowanie kompleksu kobalamina – transkobalamina II, który jest następnie wydzielany do krwi żyły wrotnej. Transkobalamina II (TCII) jest białkiem surowicy krwi o krótkim okresie półtrwania (T1/2 = 1 h), migrującym w elektroforezie we frakcji beta-globulin. Około 25% witaminy związana jest z TC II i określana jako holotranskobalamina (holoTC). Jest to frakcja dostępna dla komórek efektorowych czyli aktywna biologicznie. Haptokoryna (transkobalamina I), będąca alfa-globuliną o długim okresie półtrwania (T1/2 = kilka dni) wiąże większość krążącej witaminy B12, tj. około 75%, nie dostarcza jej jednak do tkanek efektorowych, lecz bierze udział w wychwytywaniu toksycznych analogów witaminy B12 i przenoszeniu ich do wątroby, szpiku kostnego i innych tkanek, odznaczających się szybką proliferacją. Powstały kompleks kobalamina-transkobalamina II (holoTC) łączy się z receptorami tkankowymi i ulega absorpcji drogą pinocytozy do komórki. Aby kobalamina została dostarczona do komórek efektorowych, musi zostać wchłonięta w jelicie i związana z białkiem transportującym ją we krwi, czyli transkobalamina II, tworząc kompleks holoTC. Nieprawidłowości na którymś z etapów tego szlaku będą zaburzały proces wchłaniania kobalaminy do komórek, a co za tym idzie, uniemożliwiały włączanie się witaminy B12 w procesy metaboliczne. Zaburzenia transportu kobalaminy dziedziczone są jako cechy autosomalne recesywne.<sup>(11,12)</sup> Ważną funkcję w transporcie kobalaminy spełniają też IF i TC. Są to pojedyncze peptydy, posiadające jedno miejsce wiązania witaminy B12 i pomimo, że rozpoznawane są przez dwa różne receptory wykazują wysokie powinowactwo do wiązania Cbl, jak również podobieństwa na poziomie genomu.<sup>(11)</sup>

Receptory dla TC II są obecne we wszystkich tkankach, lecz szczególnie liczne w nerce. Wewnątrz komórki następuje hydrolityczny rozpad holotranskobalaminy, a kobalamina jest przekształcana w metylokobalaminę oraz hydroksykobalaminę w cytozolu lub w 5'-adenozylotranskobalaminę w mitochondriach. W komórkach wątroby witamina B12 jest magazynowana pod postacią metylokobalaminy, adenzynokobalaminy i hydroksykobalaminy.<sup>(2,4,10,11,12,13,14)</sup>

Przyczyną niedoboru witaminy B12 i związanych z tym konsekwencji klinicznych jest jej zmniejszona podaż do tkanek efektorowych, spowodowana różnymi czynnikami egzo i endogennymi. Do czynników egzogennych można zaliczyć niedobór witaminy B12 w diecie, spotykany

najczęściej u wegetarian, anorektyków i osób starszych. Często występuje łącznie z niedoborem żelaza. Do przyczyn endogennych należy upośledzenie wchłaniania na skutek zapalenia błony śluzowej żołądka lub jej atrofii w tym na tle immunologicznym oraz innych chorób przewodu pokarmowego. U osób w podeszłym wieku częstą przyczyną jest również bezsoczność spowodowana przewlekłymi zmianami w błonie śluzowej żołądka, często nasilonymi przez długotrwałe przyjmowanie leków.<sup>(1)</sup>

Niedobór kobalaminy pojawia się także jako wynik defektu w białkach zapewniających odpowiedni transport (IF, TCII, IFCR), zaburzeń w przechodzeniu kobalaminy przez błonę enterocyту lub innych, nabytych schorzeń, spowodowanych starzeniem się organizmu, jak i rozległymi zabiegami chirurgicznymi, dotyczącymi żołądka i jelita cienkiego. W tym przypadku mimo prawidłowej podaży, mamy do czynienia z objawami niedoboru i koniecznością suplementacji. Dziedziczne i nabyte przyczyny zmniejszonego wchłaniania kobalaminy ilustruje tabela 1.

Niedobór witaminy B12 jest przyczyną upośledzenia reakcji katalizowanej przez syntazę metioninową, która została opisana powyżej. Jednym z głównych skutków niedoboru tego związku jest niedokrwistość, będąca następstwem upośledzonej syntezy DNA, co odbija się w strukturze jąder erytroblastów. Występuje megalopoeza, charakteryzująca się asynchronicznym dojrzewaniem cytoplazmy i jąder. Jądra są młodsze, ubogie w chromatynę z luźną strukturą, a cytoplazma obfita i bardziej dojrzała, ponieważ synteza RNA przebiega prawidłowo. Jednym z charakterystycznych wskaźników niedoboru witaminy B12 jest średnia objętość krwinki czerwonej (MCV), która u osób zdrowych waha się w granicach 82 – 92 ft, a w omawianym typie niedokrwistości wzrasta do >100 ft, wartości wybitnie wysokie to >110 ft, jednak ustalenie rzeczywistej wartości odcięcia dla MCV jest bardzo trudne. Nawet wartości >94 ft mogą nasuwać podejrzenia niedoboru witaminy B12 i powinny być weryfikowane i monitorowane. Inną konsekwencją niedoboru kobalaminy jest podwyższony poziom homocysteiny, będący prawdopodobnym czynnikiem ryzyka miażdżycy, zakrzepicy żyłnej, czy choroby Alzheimera. Może wystąpić homocysteinuria i acyduria metylomalonowa. Następstwem względnego niedoboru metioniny są również komplikacje neurologiczne, niebezpieczne ze względu na ich nieodwracalne konsekwencje. Do dysfunkcji układu nerwowego należą uszkodzenia nerwów oraz zwyrodnienia rdzenia kręgowego. Nawet nieznaczne niedobory witaminy B12 powodują uszkodzenie otoczki mielinowej komórek nerwowych, prowadząc nawet do neuropatii nerwów obwodowych. Zdaniem niektórych autorów, objawy neurologiczne ujawniają się wcześniej niż niedokrwistość u 3 na 4 pacjentów z niedoborem kobalaminy. Jednakże z powodu

rożnej manifestacji klinicznej aż do chwili wystąpienia objawów hematologicznych niejasne objawy neurologiczne nie są kojarzone z niedoborem kobalaminy.<sup>(1,3,4)</sup>

Całkowite stężenie witaminy B12 jest obecnie podstawowym testem diagnostycznym w wykrywaniu jej niedoborów. Jest to oznaczenie w pełni zautomatyzowane, wykonywane technikami immunometrycznymi. Wartości referencyjne całkowitego stężenia witaminy B12 mieszczą się w przedziale 200 – 900 pg/ml (150 – 666 pmol/l) Stężenie <200 pg/ml (<150 pmol/l) jest generalnie uważane za obniżone.

W diagnostyce laboratoryjnej stosowane są także oznaczenia kwasu metylomalonowego i homocysteiny. Jako markery metaboliczne ulegają podwyższeniu w przypadku niedoboru witaminy B12 i są to generalnie parametry uważane za bardziej czułe w ocenie zasobów ustrojowych tej witaminy niż całkowite stężenie kobalaminy w surowicy. Stężenie kwasu metylomalonowego w surowicy jest parametrem czułym w oznaczaniu niedoboru witaminy B12, jednakże cechuje się wysokim kosztem i ulega podwyższeniu w niewydolności nerek. Podwyższone stężenie homocysteiny również poprzedza kliniczne objawy niedoboru witaminy B12. Nie jest to jednak parametr swoisty dla tego typu niedoborów gdyż jego podwyższony poziom występuje też w niedoborze kwasu foliowego, witaminy B6 oraz w niewydolności nerek. Ostatnio dostępne są dodatkowe możliwości, związane raczej z wykryciem przyczyn niedoboru, a mianowicie wykrywanie obecności przeciwciał przeciwko komórkom okładzinowym i czynnikowi wewnętrznemu. Nadal stwierdzenie obecności tasiemca, zużywającego witaminę B12 na własne potrzeby jest pomocne w etiopatogenezie niedoboru. Coraz rzadziej ze względu na swoją uciążliwość jest stosowany test Schilinga, oceniający zdolności wchłaniania witaminy B12.

Najszerzej stosowanym i najbardziej dostępnym badaniem jest oznaczanie stężenia witaminy B12. Istnieje jednak szereg zastrzeżeń, a w tym:

- Oznacza się stężenie całkowitej, a nie czynnej biologicznie witaminy B12 (około 80% witaminy B12 jest związane z hapotokoryną i kompleks nie jest wychwytywany przez receptory tkankowe, czyli jest biologicznie nieczynny)
- Stężenie nie wykazuje jednoznacznej korelacji ze stanem klinicznym
- Istnieje szeroka „szara strefa” pomiędzy wartościami prawidłowymi i obniżonymi
- Oznaczenie wprawdzie jest zautomatyzowane, ale dwuetapowe, wymaga procesu przygotowawczego i tym samym wpływa na szybkość pracy analizatora.

Istotny klinicznie niedobór witaminy B12 może wystąpić przy prawidłowym stężeniu całkowitej B12 w surowicy, co może wynikać z niedostatecznej ilości TCII – jej trans-



portera, stanowiącego o ilości czynnego kompleksu kobalamina-TCII. Jest to argument przemawiający za koniecznością wprowadzenia swobodnego parametru przydatnego do wykrywania niedoborów tylko aktywnej frakcji witaminy B12 tj. związanej z transkobalamina<sup>(1,3,4,6,8)</sup>

Wprowadzenie w ostatnim czasie przez firmę Abbott oznaczeń stężenia holotranskobalaminy zmienia w istotny sposób podejście do diagnostyki niedoboru B12. Test oparty jest na pomiarze stężenia kobalaminy związanej z TC II (holoTC), która reprezentuje funkcjonalnie istotną frakcję witaminy B12 w surowicy. Jest to jedyna dostępna pula witaminy do wykorzystania przez komórki. Istnieją przypuszczenia, że najwcześniejsze zmiany, które pojawiają się, gdy u pacjenta rozpoczyna się ujemny bilans witaminy B12, to obniżone stężenie holoTC w surowicy. W oparciu o doświadczenia wielośrodkowe uważa się, że jest to parametr mający najwyższą czułość i swoistość w odniesieniu do wykrycia wczesnych niedoborów.<sup>(1,3,8,9)</sup> Wyniki uzyskane przy zastosowaniu zestawu AxSYM Active-B12 (holotranskobalamina) wykazują bardzo dobrą korelację z oznaczeniami metodą RIA, a sama metoda jest w pełni zautomatyzowana bez fazy wstępnej.

Hermann i wsp. sugerują, że oznaczenia holoTC oraz kwasu metylomalonowego są lepszym wykładnikiem stanu witaminy B12 niż jej całkowite stężenie w surowicy i pozwalają na różnicowanie pomiędzy obniżeniem zapasów ustrojowych i dostępnością „aktywnej” witaminy B12.<sup>(3,4)</sup> Miller i wsp. wnioskuje z przeprowadzonych badań, że holoTC i całkowite stężenie witaminy B12 mają równorzędną swoistość diagnostyczną w badaniach przesiewowych niedoborów witaminy B12. Z tym, że pomiar obydwu tych parametrów dostarcza lepszego obrazu niedoboru witaminy B12 niż każdy z parametrów mierzony osobno.<sup>(8)</sup> Hvas i Nexo uznali, że holoTC jest obiecującym parametrem jako test pierwszego wyboru w diagnozowaniu wczesnych niedoborów kobalaminy.<sup>(5,6)</sup> Podobne dane podają Lindgren i wsp. którzy stwierdzili,

że wartości holotranskobalaminy w surowicy wykazują lepszą korelację ze złym wchłanianiem kobalaminy niż wartości uzyskane dla samej kobalaminy.<sup>(7)</sup> Ze względu na fakt, że oznaczenia holoTC w trybie rutynowym są dostępne od bardzo niedawna nie ma wystarczających danych dla potwierdzenia pełnej wartości diagnostycznej tego parametru. Można jednak stwierdzić, że:

- Stężenie holoTC jest obniżone u osób z biochemicznymi objawami niedoboru witaminy B12
- Niskie wartości stwierdzono u wegetarian, wegan, i w populacji z niskim spożyciem witaminy B12
- Niskie stężenie holoTC (a nie witaminy B12) obserwuje się u osób z chorobą Alzheimera

Według Herberta niedobór witaminy B12 można podzielić na cztery stadia. W pierwszym i drugim stadium osoczowe i komórkowe zapasy kobalaminy zaczynają się wyczerpywać i już wówczas można obserwować obniżone stężenie holoTC. W drugim stadium dodatkowo obserwuje się wzrost stężenia homocysteiny oraz kwasu metylomalonowego. Obniżenie stężenia witaminy B12 obserwuje się dopiero w trzecim stadium. Czwarte stadium niedoboru charakteryzuje się poza w/w cechami laboratoryjnymi jawnymi objawami w tym klinicznymi jak makrocytoza, podwyższone MCV oraz obniżone stężenie hemoglobiny, a także nasilone zmiany w układzie nerwowym.

W oparciu o dotychczasowe badania szczególne wskazania do oznaczania stężenia holoTC istnieją w zakresie tzw. „szarej strefy” stężeń witaminy B12 tj. między 202 – 338 pg/ml (151 – 250 pmol/l). Stężenia poniżej 150 z dużym prawdopodobieństwem można uznać za typowe dla niedoboru natomiast powyżej 250 pmol/l również z dużym prawdopodobieństwem ten niedobór wykluczają. Zakresy wartości prawidłowych dla holoTC nie zostały jeszcze jednoznacznie wyznaczone, (najwięcej danych dotyczy krwiodawców) i orientacyjnie wahają się w granicach 42 – 174 pmol/l.

Tab. 1 Dziedziczne i nabyte przyczyny złego wchłaniania witaminy B12<sup>(11)</sup>

Zaburzenia	Patofizjologia
<b>1. Genetyczne</b>	
Brak IF	Cbl nie jest rozpoznawana przez IFCR
Brak IFCR na powierzchni enterocytu	Brak endocytozy Cbl
Brak wewnątrzkomórkowej TCII	Cbl nie może opuścić enterocytu
Cbl F (wadliwy transporter lizosomalny?)	Cbl zatrzymywana w lizosomach
<b>2. Nabyte</b>	
Zabiegi chirurgiczne na żołądka lub zapalenie błony śluzowej żołądka	Zaburzone uwalnianie Cbl z białek pokarmowych z powodu bezsoczności
Zespół Zollingera-Ellisona	Uszkodzone przechodzenie Cbl z Hc do IF z powodu niskiego pH
Rozrost bakterii	Współzawodnictwo w pobieraniu Cbl
Niedoczynność trzustki	Brak proteaz trzustkowych
Resekcja jelita cienkiego	Brak IFCR

IF – czynnik wewnętrzny; Hc – haptokoryny; IFCR – receptor IF – kobalamina;  
TC II – transkobalamina II, Cbl – kobalamina

## Piśmiennictwo

---

1. Bobilewicz D. Nowe spojrzenie na witaminę B12. *Abbott Voice* 2003,3, 2-3.
2. Carmel R. i in. High serum cobalamin levels in the clinical setting - clinical associations and holo-transcobalamin changes. *Clin Lab Haem.* 2001,23, 365-371.
3. Herrmann W. i in. The usefulness of holotranscobalamin in predicting vitamin B12 status in different clinical settings. *Curr Drug Metab.* 2005, 6,1,47-53.
4. Herrmann W. i in. Functional vitamin B12 deficiency and determination of holotranscobalamin in populations at risk. *Clin Chem Lab Med.* 2003, 41,11,1478-88.
5. Hvas A.M., Nexo E. Holotranscobalamin-a first choice assay for diagnosing early vitamin B deficiency? *J Intern Med.* 2005;257, 289-98.
6. Hvas A.M., Nexo E. Holotranscobalamin as a predictor of vitamin B12 status. *Clin Chem Lab Med.* 2003, 41,1489-92.
7. Lindgren A. i in. Holotranscobalamin- a sensitive marker of cobalamin malabsorption. *Eur J Clin Invest* 1999, 29, 321-329.
8. Miller J.W. i in. Measurement of total vitamin B12 and holotranscobalamin, singly and in combination, in screening for metabolic vitamin B12 deficiency. *Clin Chem.* 2006 ,52, 278-85.
9. Nilsson K, Isaksson A, Clinical utility of serum holotranscobalamin as a marker of cobalamin status in elderly patients with neuropsychiatric symptoms. *Clin Chem Lab Med.* 2004;42,637-43.
10. Refsum H, i in, Nexo E. Holotranscobalamin and total transcobalamin in human plasma: determination, determinants, and reference values in healthy adults. *Clin Chem* 2006, 52: 129-137.
11. Seetharam B. Receptor mediated endocytosis of cobalamin (Witamin B12). *Ann Rev Nutr.* 1999(19):173-95.
12. Seetharam B., Bose S., Li N. Cellular import of cobalamin (vitamin B12). *J Nutr* 1999; 129,1761-64.
13. Seetharam B., Yammani R. Cobalamin transport proteins and their cell-surface receptors. *Exp Rev Mol Med* 2003, 5, 1-18.
14. Ulleland M. i in. Direct assay for cobalamin bound to transcobalamin (holo-transcobalamin) in serum. *Clin Chem.* 2002,48, 526-532.

# ZASTOSOWANIE CYTOMETRII PRZEPEŁYWOWEJ W KLINICZNEJ DIAGNOSTYCE LABORATORYJNEJ

## Application of flow cytometry in clinical diagnostic

Dariusz Łżycki  
Zakład Immunologii Nowotworów Akademii Medycznej w Poznaniu  
ul. Garbary 15, 61-806 Poznań  
dmizy@immuno.pl

### ■ Streszczenie

Cytometria przepływowa (CP) jest praktyczną i precyzyjną techniką diagnostyczną, umożliwiającą szybki pomiar liniowo ułożonych cząsteczek lub komórek, podczas ich przepływu przez komorę pomiarową. Najważniejszą cechą CP jest możliwość analizowania charakterystycznych cech (wielkość, ziarnistość, fenotyp) pojedynczej komórki lub cząsteczki bez konieczności ich wcześniejszej separacji. Zastosowanie nowych rozwiązań technicznych w cytometrach przepływowych umożliwiło nie tylko równoczesną, dokładną oceną wybranych parametrów komórek, ale również możliwość selekcji dowolnych subpopulacji komórkowych. Spowodowało to gwałtowny wzrost zainteresowania wykorzystaniem technik cytometrii przepływowej w badaniach naukowych oraz w klinicznej diagnostyce laboratoryjnej. Odkrycie i zastosowanie mysich humanizowanych przeciwciał monoklonalnych znacząco poszerzyło zakres klinicznych badań diagnostycznych z użyciem cytometrii przepływowej. Antygenowo swoiste przeciwciała monoklonalne, sprzężone z fluorochromami, umożliwiły nie tylko dokładną, fenotypową analizę badanych subpopulacji komórek, ale pozwoliły szerzej spojrzeć na mechanizmy związane z patogenezą chorób o podłożu zapalnym, jak i chorób rozrostowych układu krwiotwórczego. W przedstawionym artykule autor opisuje najnowsze osiągnięcia cytometrii przepływowej oraz dyskutuje ich potencjalne zastosowania w klinicznej diagnostyce laboratoryjnej.

### ■ Summary

Flow cytometry is the technique for making rapid measurements on particles or cells as they flow in a fluid stream one by one through a sensing point. The important feature of flow cytometric analysis is that measurements are made separately on each particle within cell suspension in turn, and not just as average values for whole population. The ability of laser-based flow cytometers to determine multiple cellular parameters, based on light scatter and fluorescence, and to purify physically subpopulations of cells has led to the increasingly widespread use of this instrumentation in biology and clinical laboratory medicine. A wide range of fluorescent probes is available for directly estimating cellular parameters such as nucleic acid contents, enzyme activity calcium flux, membrane potential and pH. Conjugation of fluorescent dyes to monoclonal antibodies has allowed for evaluation of the density and distribution of cell-surface and cytoplasmic determinants and receptors as well as for functional identification of different cell subpopulations. In this article author reviewed current achievements in flow cytometry and discussed their potential application in the routine clinical diagnosis of immunological and hematological diseases

**Słowa kluczowe:** cytometria przepływowa, przeciwciała monoklonalne, fenotyp, białaczka, cykl komórkowy, apoptoza, cytokiny.

**Key words:** flow cytometry, monoclonal antibodies, phenotype, leukemia, cell cycle, apoptosis, cytokine.

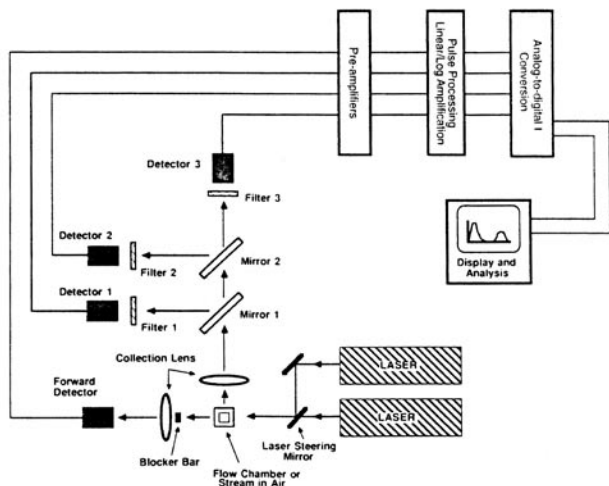


## Wstęp

Cytometria przepływowa jest precyzyjnym, nieinwazyjnym (nie naruszającym integralności komórkowej) narzędziem badawczym, które pozwala na szybką wieloparametrową ocenę struktury i funkcji komórek. CP powstała z dwóch metodologii pokrewnych: spektrofluorymetrii i analizy hematologicznej, i służyła pierwotnie do zautomatyzowanej oceny wielkości i liczby komórek oraz pomiaru zawartości DNA w badaniach onkohematologicznych.<sup>(1)</sup> Chociaż pierwotnie CP stworzono właściwie głównie na użytek hematologów (i w dalszym ciągu jest to dominująca specjalność nauk medycznych wykorzystująca technikę cytometrii w rutynowej diagnostyce laboratoryjnej), to obecnie chętnie korzystają z tej metody także badacze innych specjalności nauk medycznych i biologicznych, takich jak np. farmakologia, toksykologia, mikrobiologia, wirusologia, czy biotechnologia. Zdecydowanie najwięcej zastosowań cytometria przepływowa znajduje w diagnostyce medycznej (w szczególności w immunologii czy onkologii).

Zasada działania cytometru przepływowego, opiera się na pomiarze ugięcia i rozproszenia zogniskowanej wiązki światła laserowego na przepływających obiektach (komórkach) oraz pomiarze fluorescencji pochodzącej z fluochromów sprzężonych z monoklonalnymi przeciwciałami, rozpoznającymi swoiste determinanty antygenowe na powierzchni badanej komórki. Zarówno proces detekcji oraz zbierania danych, które zachodzą z dużą szybkością (do kilku tysięcy obiektów na sekundę), wymagają precyzyjnej współpracy trzech głównych modułów funkcjonalnych, które wchodzi w skład każdego cytometru przepływowego:

- układu powietrzno-cieczowego służącego do liniowego transportu komórek do komory lasera,
- układu optycznego, składającego się z lasera/laserów o określonej długości fali oraz filtrów optycznych

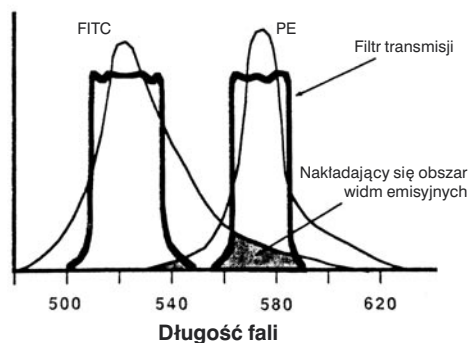


Rycina 1. Uproszczony schemat cytometru przepływowego.

umożliwiających selektywne przepuszczanie pożądaných długości fal oraz ich skierowanie do odpowiednich detektorów, oraz

- układu elektroniki składającego się z detektorów (fotopowielaczy), które – w dużym uproszczeniu – konwertują sygnały świetlne na impulsy elektryczne prezentowane następnie w postaci graficznej na ekranie monitora (rycina 1).

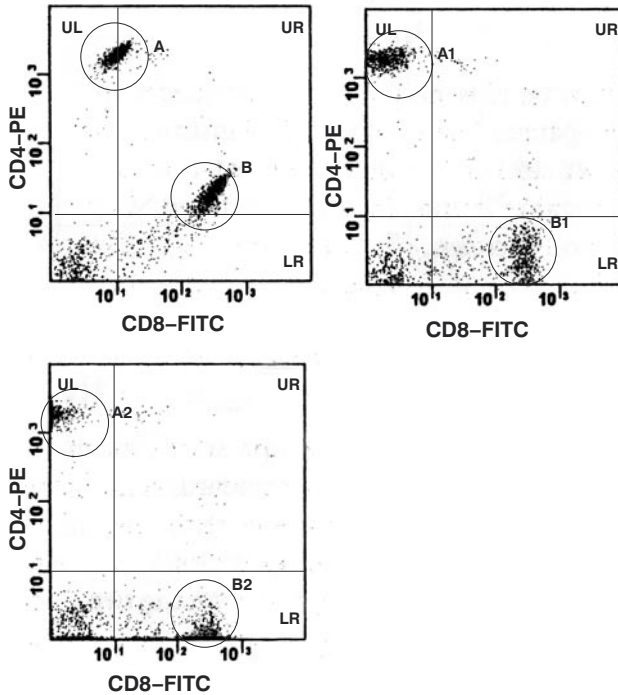
Promień laserowy padający na badaną komórkę w komorze lasera ulega rozproszeniu na wprost (FS) raz pod kątem  $90^\circ$  (SS). Wielkość rozproszenia mierzona jest na detektorach. W przypadku wzbudzenia fluorescencji (np. za pomocą sprzężonych z fluochromem przeciwciał monoklonalnych) w pierwszym etapie widmo fluorescencji pada na filtry absorbcyjne lub interferencyjne oraz zwierciadła dichroiczne, które selektywnie przepuszczają tylko pożądanę długość fal. W następnej fazie określone fluorescencje analizowane są w multifotopowielaczach, które przekazują impuls do przedwzmacniacza a ten do przetwornika analogowo-cyfrowego. W torach niosących sygnał fluorescencji impuls dodatkowo po opuszczeniu przedwzmacniacza przechodzi przez układ kompensacji kolorów, która zapobiega nakładaniu się części widm emisyjnych w przypadku kolorów o niewielkiej różnicy długości fal. (np. izotiocyjanian fluoresceiny – FITC z fikoerytryna – PE)(rycina 2 i rycina 3).



Rycina 2. Nakładanie widm emisyjnych FITC i PE. Zaznaczone pola odpowiadają obszarom nakładania się widm mogącym powodować fałszywie dodatni wynik znakowania.

Praktyczne zastosowanie kompensacji w cytometrycznej analizie subpopulacji limfocytów T CD4+ oraz CD8+ przedstawia rycina 3. Brak kompensacji powoduje, iż subpopulacja limfocytów T CD4+/PE, wyznakowana monoklonalnym przeciwciałem sprzężonym z PE obserwowana jest w obszarze UR (Upper Right - górny prawy), w którym odczytywana jest fluorescencja FITC (A). Z kolei subpopulacja limfocytów CD8+/FITC wyznakowana monoklonalnym przeciwciałem sprzężonym z FITC obserwowana jest w obszarze UR (górny prawy), w którym odczytywana jest również fikoerytryna (B). W przypadku właściwej

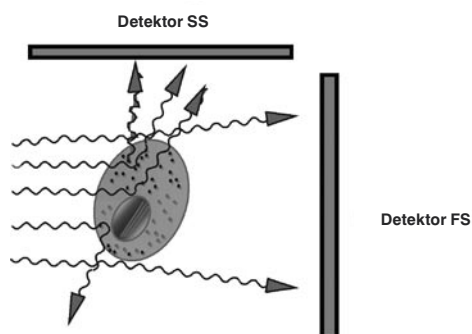
kompensacji zarówno subpopulacja CD4/PE jak i CD8/FITC odczytywane są w prawidłowych obszarach UL ( górny lewy, A1) oraz LR (dolny prawy, B1). Przekroczenie pewnych wartości kompensacji powoduje iż część graficznej reprezentacji subpopulacji CD4/PE oraz CD8/FITC znika z obszaru bramki analitycznej (A2 i B2).



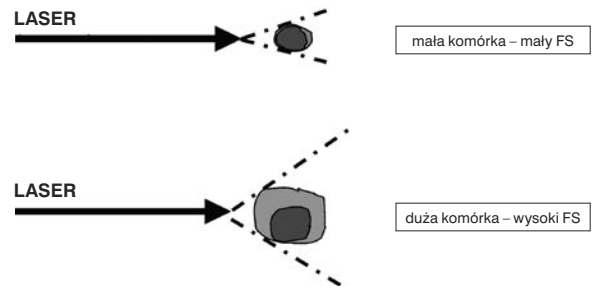
Rycina 3. Cytometryczna analiza subpopulacji limfocytów T CD4+ oraz CD8+ przy braku kompensacji (I), optymalnej kompensacji (II) oraz zbyt wysokiej kompensacji (III).

### ■ Parametry mierzone w CP

Podstawowym pomiarem jest rejestrowanie światła rozproszonego na komórce oraz światła emitowanego przez wzbudzony fluorochrom. Dzięki zastosowaniu dwóch detektorów istnieje możliwość oceny nie tylko wielkości czy pola powierzchni komórki badanej (FS), ale również ewentualność oceny wewnątrzkomórkowych struktur komórki takich jak kształt komórki, wielkość ziarnistości oraz ich złożoność (SS) (rycina 4, rycina 5).

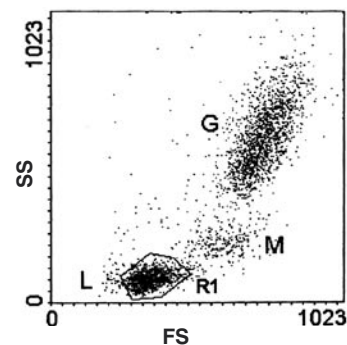


Rycina 4. Pomiar wielkości, kształtu i ziarnistości komórki za pomocą detekcji parametrów FS i SS.

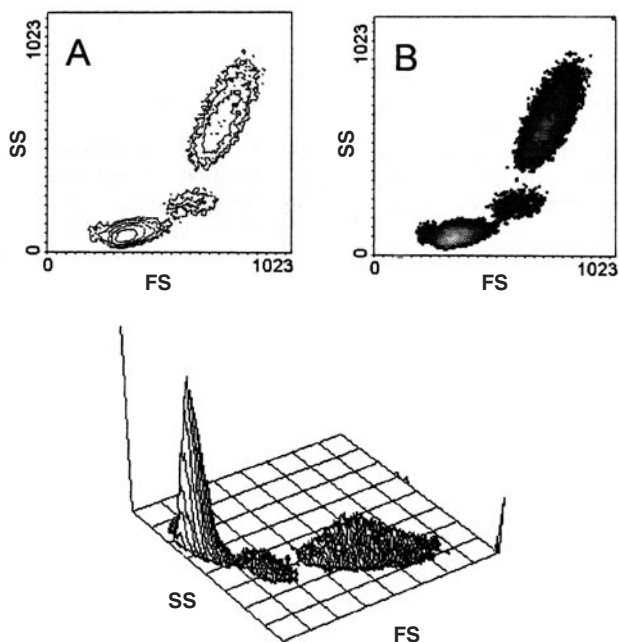


Rycina 5. Analiza wielkości komórki mierzonej za pomocą rozproszenia na wprost. Wielkość rozproszenia światła zależy od wielkości komórki w komorze lasera.

Pomiar obu parametrów ma kluczowe znaczenie dla dalszej oceny cytometrycznej np. w przypadku badania limfocytów krwi obwodowej za pomocą przeciwciał monoklonalnych, sprzężonych z fluorochromami. Wynika to z faktu, iż na komputerowym obrazie rozkładu populacji możemy dokonać selekcji dowolnej populacji komórkowej w celu jej dalszej analizy fenotypowej (rycina 6). Wyniki badań cytometrycznych można również przedstawić w formie wykresów gęstości, rysunków konturowych lub w formie przestrzennej (rycina 7). Oprócz parametrów opisujących rozproszenie światła ważnym parametrem jest ocena intensywności fluorescencji, którą mierzymy za pomocą wspomnianych wcześniej detektorów. Nowoczesne aparaty są w stanie równocześnie ocenić 10 – 12 parametrów łącznie z wartościami FS i SS, czyli w tym samym czasie możemy np. uzyskać informacje o wielkości, kształcie oraz ziarnistości komórki oraz o ekspresji 8 – 10 antygenów obecnych na powierzchni komórki. W rutynowych badaniach laboratoryjnych subpopulacji komórek izolowanych z krwi obwodowej, szpiku kostnego i węzłów chłonnych, oprócz parametrów FS i SS wykorzystuje zazwyczaj pomiar wartości fluorescencji 2 – 3 fluorochromów w zależności od liczby badanych subpopulacji komórek oraz możliwości technicznych aparatu (tabela 1).



Rycina 6. Cytometryczny obraz kropkowy krwi obwodowej człowieka, uzyskany z pomiaru wartości rozproszenia FS i SS. G – granulocyty, M – monocyty, L – limfocyty, R1 – amorficzna bramka analityczna umożliwia selekcję subpopulacji limfocytów w celu dalszej analizy fenotypowej. Jedna kropka odpowiada jednej komórce.



Rycina 7. Inne formy graficznej prezentacji wyników uzyskanych w analizie FS i SS krwi obwodowej człowieka. Dwuwymiarowy wykres gęstości (A), wykres konturowy (B) oraz wykres perspektywiczny (C).

Tabela.1. Najczęściej używane fluorochromy w fenotypowej analizie cytometrycznej

Fluorochrom	Wzbudzenie (nm)	Emisja (nm)	Laser (nm)
Fluorescein	495	520	488A
Alexa Fluor Green	491	515	488A
R-Phycoerythrin	495	576	488
Phycoerythrin-cyanine 5 conj.	495	670	488A
Phycoerythrin-cyanine 7 conj.	495	755	488A
Allophycocyanine	650	660	630H
Allophycocyanine-cyanine 7 conj	650	755	630H

A – laser argonowy; H – laser helowo-neonowy

## Cytometryczna ocena fenotypu

Dzięki możliwości szybkiej i wieloparametrycznej analizie fenotypowej komórek układu hematopoetycznego CP okazała się bardzo przydatnym narzędziem diagnostycznym wykorzystywanym rutynowo w badaniach hematologicznych. Umożliwia ona ilościową i jakościową analizę ekspresji swoistych antygenów powierzchniowych, cytoplazmatycznych i jądrowych. Jednym z niewielu ograniczeń tej metody jest to, że materiałem do badań nie mogą być fragmenty tkankowe (wyłącznie zawiesina komórek) oraz fakt, iż komórki muszą być żywe co z kolei uniemożliwia analizę preparatów archiwalnych. Materiałem do badań może być pełna krew, zawiesina izolowanych komórek szpiku

kostnego lub węzłów chłonnych oraz zawiesina komórek nowotworowych. Po jałowym pobraniu 2 – 3 ml krwi lub 0,5 – 1 ml szpiku kostnego do próbki zawierającej antykoagulant (EDTA lub Heparyna), i wymieszaniu, próbka musi być jak najszybciej przekazana personelowi pracowni cytometrycznej i poddana badaniu. Węzeł chłonny powinien być dostarczony do pracowni w płynie hodowlanym. Hemoliza krwi, wytrącenie skrzepów, zamrożenie materiału do badań lub zbyt późne dostarczenie (powyżej 48 godzin) do pracowni uniemożliwia wykonanie analizy. Optymalne wyniki z punktu widzenia oceny technicznej uzyskuje się w przypadku gdy badanie cytometryczne przeprowadzone jest w ciągu sześciu godzin od pobrania próbki.

Klasyfikację antygenów powierzchniowych i rozpoznających je przeciwciał monoklonalnych określono i zunifikowano na czterech kolejnych warsztatach naukowych, które odbyły się kolejno w Paryżu (1982), Bostonie (1984), Oxfordzie (1986) i Wiedniu (1989). Zgodnie z umową wszystkie scharakteryzowane antygeny (powierdzona swoistość wiązania przeciwciał i określona masa cząsteczkowa) uzyskały oznaczenia CD (z ang. Cluster of Differentiation) + kolejny numer (obecnie ponad 200) W ten sposób opisywane w literaturze antygeny i reagujące z nimi przeciwciała monoklonalne zebrano w grupy podobieństwa pod względem ich reaktywności i struktury chemicznej (tabela 2).

Tabela 2. Podstawowe antygeny wg klasyfikacji CD oraz przykłady ich występowanie na komórkach prawidłowych.

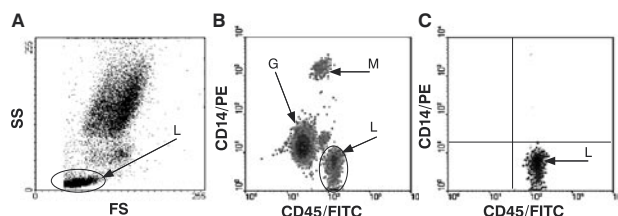
Antygen CD	Ekspresja na powierzchni komórki
CD2	Limfocyty T od wczesnych prekursorów do form dojrzałych
CD3	Limfocyty T dojrzałe
CD4	Limfocyty T pomocnicze
CD8	Limfocyty T cytotoksyczne
CD13	Granulocyty i monocyty od wczesnych prekursorów do form dojrzałych
CD14	Monocyty od form prekursorowych do dojrzałych
CD15	Dojrzałe granulocyty
CD16	Komórki NK
CD19	Limfocyty B od wczesnych prekursorów do form dojrzałych
CD22	Limfocyty dojrzałe w krwi obwodowej i węzłach chłonnych
CD33	Prekursory granulocytów i monocytów
CD34	Komórki macierzyste szpiku, wczesne formy prekursorów linii mieloidalnej
CD41	Płytki krwi i megakariocyty
CD61	Płytki krwi
CD64	Monocyty, aktywowane granulocyty
CD71	Erytrocyty i erytoblasty



Zestawy przeciwciał służące do podstawowego badania fenotypu zostały opracowane w taki sposób aby przy niewielkiej liczbie przeciwciał uzyskać maźliwie precyzyjną charakterystykę fenotypu. W rutynowej ocenie fenotypowej podstawowych subpopulacji limfocytów krwi obwodowej wykorzystuje się tzw. minimalny panel sprzężonych z fluorochromami przeciwciał monoklonalnych obejmujący następujące antygeny różnicowania:

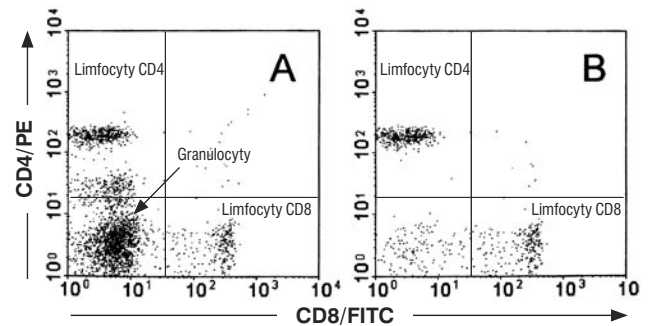
- CD45 – obecny na wszystkich leukocytach,
- CD14 – obecny na monocytach,
- CD3 – obecny na limfocytach T,
- CD4 – obecny na limfocytach T pomocniczych,
- CD8 – obecny na limfocytach cytotoksycznych,
- CD19 – obecny na limfocytach B,
- CD16 – obecny na komórkach NK.

W pierwszym etapie cytometrycznej analizy fenotypowej limfocytów krwi obwodowej ustalamy, najczęściej amorficzną, bramkę analityczną w obrębie układu współrzędnych FS/SS. Następnie, w układzie współrzędnych CD45/CD14 (rycina 8) znajdujemy i zaznaczamy subpopulację o najwyższej ekspresji antygeny CD45 (limfocyty) oraz określamy „czystość” bramki limfocytarnej poprzez określenie procentowej wartości komórek CD45+/CD14-. Jeżeli liczba „wybramkowanych” limfocytów mieści się w przedziale od 93% – 97% możemy wykonać cytometryczne badanie innych antygenów, pamiętając jednak o analizie innych podstawowych populacji leukocytów.



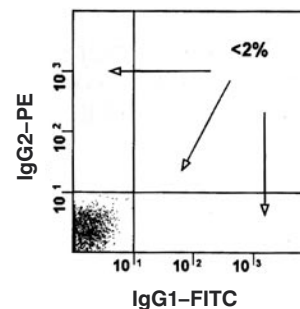
Rycina 8. Etapy oceny „czystości” bramki analitycznej dla subpopulacji limfocytów krwi obwodowej. A) ustalenia bramki dla limfocytów w oparciu o parametry FS/SS, B) wybramkowanie populacji o najsilniejszej ekspresji CD45/FITC; C) określenie procentowej wartości komórek CD45+/CD14-. G – granulocyty, L – limfocyty; M – monocyty.

W rutynowej diagnostyce cytometrycznej wykorzystuje się tzw. wzajemnie „wykluczające” się przeciwciała monoklonalne, np.: przeciwko antygenowi CD4 obecnemu na limfocytach T pomocniczych, lecz nie występującemu na limfocytach T cytotoksycznych oraz przeciwko antygenowi CD8, który ekspresjonowany jest tylko na limfocytach cytotoksycznych. Pozwala to na bardzo dokładną, cytometryczną analizę subpopulacji limfocytów oraz stosunkowo prostą interpretację wyników przedstawionych w postaci grafów kwadrantowych (rycina 9).



Rycina 9. Ocena wzajemnie wykluczających się antygenów CD4 i CD8. A) obraz limfocytów krwi obwodowej przed „bramkowaniem: limfocytów, B) obraz subpopulacji CD4 i CD8 po ustaleniu bramki na populacji limfocytów w oparciu o parametry FS/SS.

W celu obiektywnego badania ekspresji określonych antygenów powierzchniowych niezbędne jest wykonywanie próby kontrolnej (z kontrolnymi przeciwciałami izotypowymi) do każdej serii oznaczeń. W próbie izotypowej zamiast przeciwciał monoklonalnych stosowanych do oznaczania konkretnego antygeny powierzchniowego wykorzystuje się znakowane fluorochromami przeciwciała IgG, tej samej klasy jak stosowane przeciwciała monoklonalne. Ma to na celu potwierdzenie swoistego wiązania zdefiniowanych antygenów przez monoklonalne przeciwciała wykorzystane podczas analizy fenotypowej (rycina 10).



Rycina 10. Izotypowa kontrola swoistości monoklonalnych przeciwciał użytych w badaniu fenotypowym krwi obwodowej. Wyniki nieswoistego wiązania powyżej 2% wskazują na brak swoistości znakowania.

Rutynowa fenotypowa analiza cytometryczna komórek układu hematopoetycznego służy nie tylko do określenia obecności poszczególnych subpopulacji komórek czy ocenie stosunków odsetkowych badanych subpopulacji krwi obwodowej. Szersze zastosowanie CP znalazła w diagnostyce chorób rozrostowych układu krwiotwórczego, szczególnie w białaczkach i chłoniakach<sup>(2)</sup>. Podstawowym celem badania cytometrycznego w klinicznej diagnostyce laboratoryjnej białaczek i chłoniaków jest potwierdzenie:

- 1) obecności antygenów z wcześniejszych etapów dojrzewania (np. CD10 w cALL),
- 2) braku antygenów, których ekspresja jest charakterystyczna dla komórek dojrzałych,

- 3) istnienia antygenów linii mieloidalnej na komórkach linii limfoidalnej,
- 4) nasilonej ekspresji antygenów np. CD22 w (HCL-białaczka włochatokomórkowa),
- 5) występowania klonalnego rozplemu limfocytów B na podstawie rozkładu łańcuchów kappa i lambda,
- 6) obecności antygenów powierzchniowych i cytoplazmatycznych, pozwalających na dokładne zdefiniowanie etapu różnicowania populacji komórek w diagnostyce białaczek mieszanych,
- 7) występowania choroby resztkowej czyli wyodrębnienia populacji komórek białaczkowych spośród populacji komórek o prawidłowym fenotypie,
- 8) ekspresji glikoproteiny P (kodowanej przez gen oporności wielolekowej), której obecność jest odpowiedzialna za niepowodzenie leczenia chemioterapią.

Należy pamiętać jednak o tym, iż badanie cytometryczne powinno być wykonane równolegle do oceny hematologicznej rozmazu i mielogramu oraz badań cytochemicznych.

Fenotypowa analiza cytometryczna okazała się bardzo pomocna w diagnostyce klinicznej wrodzonych (SCID – ciężki złożony zespół niedobór immunologiczny) i nabytych niedoborach immunologicznych (AIDS), zaburzeniach autoimmunizacyjnych, przeszczepach narządów, chorobach nowotworowych oraz chorobach płuc. W każdym z w/w przypadków CP w istotny i niekwestionowany sposób przyczyniała się do postawienia precyzyjnego rozpoznania, włączenia optymalnej terapii oraz monitorowania efektów leczenia choroby.

## ■ Cytometryczna analiza DNA

Analiza zawartości komórkowego DNA jest jednym z najczęściej wykonywanych badań cytometrycznych. Wynika to z faktu, iż w komórkach nowotworowych bardzo często dochodzi do aberracji genowych i chromosomowych, które mogą mieć znaczenie prognostyczne oraz poznawcze. Ogromną zaletą cytometrycznego oznaczania DNA jest fakt, iż do analizy możemy wykorzystać materiał archiwalny (błoczki parafinowe) oraz tkankę zamrożoną. Barwniki fluorescencyjne stosowane w analizie ploidii mają zdolność kowalencyjnego łączenia się z podwójną nicią DNA badanej komórki. Zawartość DNA wyraża się nasileniem fluorescencji barwników związanych stechiometrycznie z DNA jądrowym. W rutynowym badaniu zawartości DNA stosuje się tzw standard wewnętrzny, który stanowią komórki o prawidłowej ilości DNA dodawane do próbki badanej przed pomiarem. Na podstawie pomiaru stosunku nasilenia fluorescencji badanych komórek do standardowych komórek kontrolnych

wyznaczany jest indeks DNA. Wzbudzenie fluorochromów powoduje emisję światła proporcjonalną do zawartości DNA w komórce.<sup>(3)</sup> Najczęściej stosowane fluorochromy w analizie DNA zestawiono w tabeli 3.

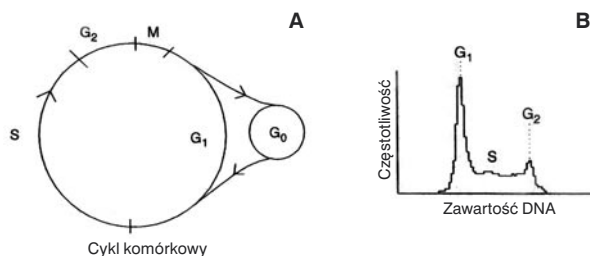
Tabela 3. Najczęściej używane fluorochromy w cytometrycznej analizie DNA.

Fluorochrom	Wzbudzenie (nm)	Emisja (nm)	Laser (nm)
Propidium Iodide	495	639	488A
Ethidium Bromide	493	637	488A
7-Aminoactinomycin D	546	647	488A
Hoechst 33342	395	450	UVA, HeCd
DAPI	372	456	UVA, HeCd
YO-PRO-1	491	509	488A
Pyronin Y	545	565	488A

A – laser argonowy; HeCd – laser helowo-kadmowy

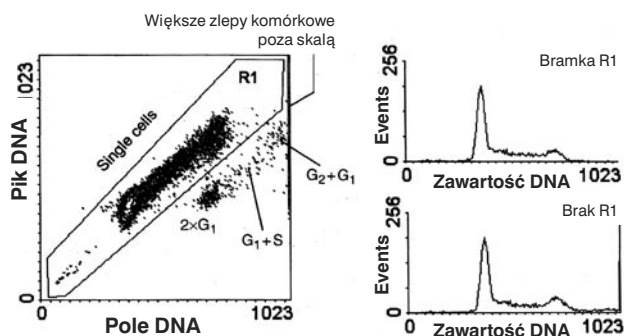
Aby zrozumieć sens analizy DNA należy wyjaśnić mechanizm cyklu komórkowego, i jego, graficzną prezentację cytometryczną (rycina 11). Cyklem komórkowym określamy cykl zmian i procesów zachodzących w komórce między 2 kolejnymi podziałami mitotycznymi. W typowej diploidalnej (2n) komórce cykl komórkowy rozpoczyna się fazą G1 następującą bezpośrednio po zakończonym podziale komórki. Trwa ona najdłużej i charakteryzuje się intensywnym metabolizmem. Drugą jest faza S, w której odbywa się replikacja DNA i powstawanie siostrzanych chromatyd. Po replikacji DNA następuje stosunkowo najkrótsza faza G2, w której zachodzą procesy wstępne do podziału komórki. Cykl kończy faza M, czyli podział mitotyczny jądra i podział komórki, w wyniku którego powstają dwie, diploidalne komórki potomne. W różnych organizmach i różnych typach komórek cykl komórkowy może trwać od 8 godz. do ponad 1 roku. Cytometryczna ocena ploidii pozwala na dokładną analizę liczby chromosomów w komórce somatycznej danego organizmu. Prawidłowa komórka somatyczna człowieka posiada diploidalną liczbę chromosomów. Czasami zmienione nowotworowo komórki lub populacja komórek mogą posiadać zwielokrotnioną liczbę chromosomów do 4n (tetraploidia), czy nawet 8n (oktaploidia). Oznacza to, że całkowity materiał genetyczny danej populacji komórkowej/komórki został zwielokrotniony 2- i 4-krotnie. Liczba chromosomów większa niż 2n zazwyczaj nazywana jest hyperploidią, a liczba chromosomów mniejsza od 2n nazwana jest hypoploidią. Terminem aneuploidia DNA określa się brak co najmniej 1 chromosomu w liczbie 2n. Ubytek nawet jednego chromosomu w garniturze 2n można określić za pomocą oznaczenia indeksu DNA, który wyraża stosunek pomiędzy zawartością DNA w komórce nowotworowej do zawartości DNA w diploidalnej komórce zdrowej.





Rycina 11. Analiza zawartości DNA w komórce w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. A) fazy cyklu komórkowego: G<sub>0</sub> – faza spoczynkowa, G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> oraz M; B) histograficzne zobrazowanie cyklu komórkowego za pomocą cytometrii przepływowej.

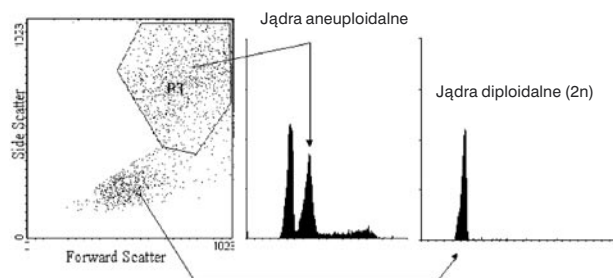
Najważniejszym warunkiem prawidłowego wykonania analizy DNA jest odpowiednia zidentyfikowanie i oddzielenie populacji pojedynczych komórek znajdujących się w poszczególnych fazach cyklu komórkowego od tak zwanych dubletów utworzonych przez komórki zlepione. Można to osiągnąć poprzez odpowiednie bramkowanie analizowanych komórek, które pozwala na wykluczenie konglomeratów składających się z dwóch lub większej liczby komórek (rycina 12).



Rycina 12. Prawidłowe bramkowanie pojedynczych komórek w cytometrycznej analizie DNA. 2xG<sub>1</sub> – połączone dwie komórki w fazie G<sub>1</sub>; G<sub>1</sub>+S – dublety komórek w fazie G<sub>1</sub> i S; G<sub>2</sub>+G<sub>1</sub> – połączone komórki w fazie G<sub>2</sub>+G<sub>1</sub>.

Skojarzona, cytometryczna analiza ploidi komórek nowotworowych o określonym fenotypie pozwala nie tylko na wykrycie niepożądanego populacji komórkowej wśród komórek prawidłowych, ale może również dostarczyć cennych informacji o skuteczności zastosowanej terapii oraz biologii cyklu komórkowego. Ocena DNA może przyczynić się do wczesnego wykrycia choroby, a obecność aneuploidii DNA może wskazywać na zwiększone ryzyko czynnego procesu nowotworowego. Dodatkowo, analiza ploidi DNA może być również przydatna w wyborze leczenia i rokowaniu, a we wczesnym okresie choroby pozwala wyselekcjonować grupę nowotworów, które wymagają agresywniejszej procedury terapeutycznej. Cytometryczna analiza DNA znalazła zastosowanie w diagnostyce i klinice nowotworów przewodu pokarmowego, raka pęcherza moczowego, raka sutka, nowotworów jajników i raka macicy, raka płuc oraz chłoniaków niezłośliwych. Przykład

histogramu przedstawiającego nieprawidłową zawartość DNA zaprezentowano na rycinie 13.



Rycina 13. Analiza ploidi DNA w jądrach komórek raka piersi, izolowanych z materiału tkankowego zatopionego w parafinie.

Przedstawione powyżej przykłady zastosowań cytometrii przepływowej w analizie DNA potwierdzają użyteczność tej metody w nie tylko w diagnostyce, prognozowaniu i wyborze terapii przeciwnowotworowej, ale również w przypadku wielu innych chorób o różnej patogenezie, o których wspomniano wcześniej.

## ■ Cytometryczna analiza programowanej śmierci komórki

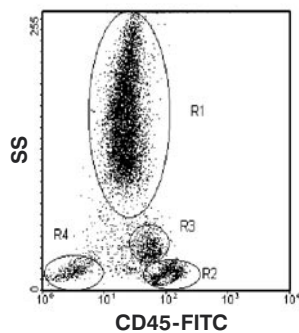
Programowana śmierć komórki jest aktywnym, wieloetapowym procesem fizjologicznym prowadzącym do planowej eliminacji komórki. Cytometria przepływowa pozwala na szybką oraz wieloparametrową analizę procesów biologicznych związanych z apoptozą w kilku populacjach komórkowych równocześnie. Odkrycie mechanizmów regulujących apoptozę oraz udoskonalenie technik jej analizy doprowadziło do prób wykorzystania cytometrycznej oceny programowanej śmierci komórki w:

- 1) diagnostyce nowotworów,
- 2) klinicznej odpowiedzi na zastosowaną terapię,
- 3) transplantologii (klonalna delecja alloreaktywnych limfocytów T biorcy),
- 4) diagnostyce i prognoście AIDS,
- 5) diagnostyce męskiej niepłodności.

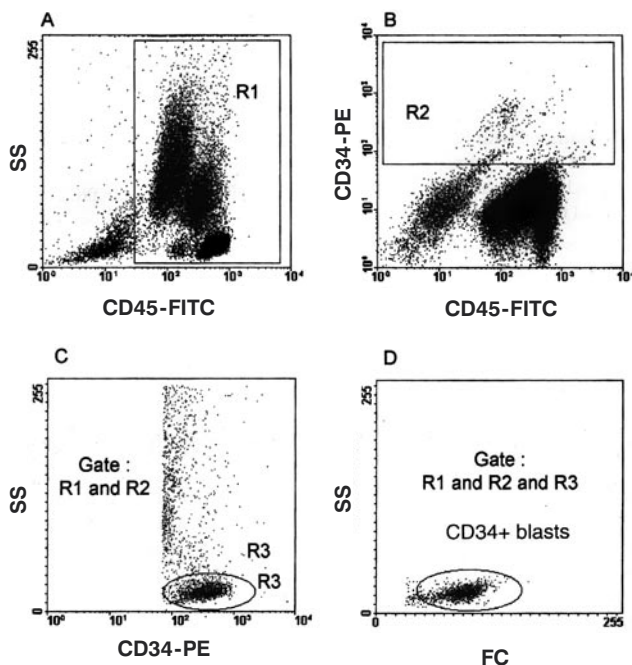
Głównymi cechami pozwalającymi na cytometryczne odróżnienie komórek martwych od żywych jest zmiana zdolności rozpraszania światła przez komórki apoptyczne, utrata ich funkcji transportowych, oraz utrata asymetrii fosfolipidów w wczesnym etapie apoptozy, powodująca pojawienie fosfatydyloseryny po zewnętrznej stronie błony cytoplazmatycznej. Równoległa ocena apoptozy oraz diagnostyka fenotypowa z użyciem sprzężonych z fluorochromami monoklonalnych przeciwciał pozwala na precyzyjne określenie spontanicznej i indukowanej (np. lekami) apoptozy w badanej subpopulacji komórkowej (rycina 14).



selekcję pierwotnych form HKM za pomocą sortera komórkowego.<sup>(4)</sup> Fenotyp HKM możemy określić jako CD34+, MDR-1+, c-kit+ i CD45RO+ oraz CD38-, HLA-DR- oraz LDM- (Lieneage-Differentiation Marker), jednak w praktyce transplantacyjnej dla ich identyfikacji wystarcza selekcja populacji CD34+/CD38-. Ze względu na łatwą dostępność oraz możliwość efektywnej modulacji cytokinami zastosowanie wyizolowanych komórek macierzystych z krwi obwodowej oraz szpiku kostnego ma w chwili obecnej najszersze zastosowanie kliniczne. Dzięki swojej prostocie i stosunkowo wysokiej dokładności pomiaru cytometryczna ocena fenotypu HKM oraz techniki selekcji komórek krwiotwórczych znalazły szerokie zastosowanie w onkologii i transplantologii klinicznej. Podstawowa analiza cytometryczna hematopoetycznych komórek macierzystych szpiku izolowanego od zdrowego dawcy została przedstawiona na rycinach 17 i 18.



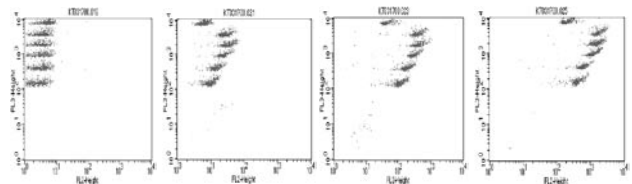
Rycina 17. Kropkowy wykres komórek szpikowych uzyskany w wyniku analizy parametrów FITC i SS. R1 – linia granulocytarna, R2 – linia limfocytarna, R3 – linia monocytarna, R4 – linia erytrocytarna.



Rycina 18. Cytometryczna ocena populacji komórek HKM CD34+. Izolowanych ze szpiku kostnego. A – ustanowienie bramki analitycznej R1 na leukocytach; B – bramkowanie komórek CD-34+; C – selekcja komórek CD34+ uzyskana w wyniku dodania bramek analitycznych R1+ R2; D – cytogram komórek CD34+ po odrzuceniu artefaktów.

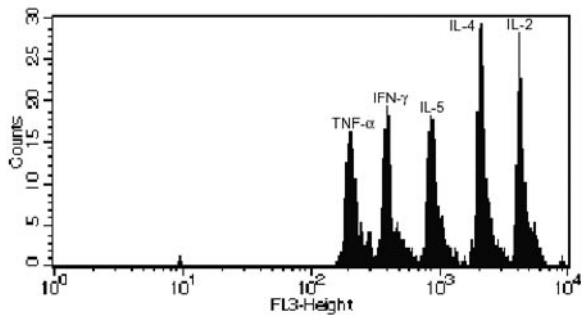
## ■ Ocena stężenia cytokin za pomocą CP.

Cytokiny stanowią grupę niskocząsteczkowych glikoprotein odgrywających kluczową rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej, proliferacji oraz różnicowania komórek. Oddziałując na wiele typów komórek cytokiny są mediatorami reakcji zapalnych i immunologicznych oraz uczestniczą w reakcji krwiotworzenia. Oznaczenie poziomu cytokin ma kluczowe znaczenie w diagnostyce, monitorowaniu i leczeniu chorób o podłożu autoimmunologicznym, nowotworów, chorób zakaźnych, alergicznych oraz wstrząsu septycznego. Klasycznym testem oznaczania stężenia cytokin jest immunoenzymatyczny test ELISA wykorzystujący znakowane, monoklonalne przeciwciała diagnostyczne, swoście rozpoznające epitopy badanej cytokiny. Metoda ta pozwala na stosunkowo precyzyjne określenie stężenia cytokiny w badanym materiale, ale jest czasochłonna i dodatkowo obciążona ryzykiem popełnienia błędów metodycznych. Ponadto, w czasie pomiaru możemy określić poziom tylko jednej cytokiny, co ze względu na koszty wykonania badania w dużym stopniu ogranicza możliwość rutynowego stosowania testu w praktyce klinicznej. W ostatnich latach, dzięki rewolucyjnemu zastosowaniu sprzężonych z fluorochromem mikrokulek, kowalencyjnie związanych ze swoistym wobec badanej cytokiny przeciwciałem monoklonalnym, możemy w ciągu kilku godzin, ściśle ocenić stężenie do dwunastu cytokin w jednej próbce.<sup>(5)</sup> Metoda CBA (Cytometric Beads Array- cytometryczne macierze kulkowe) umożliwia obiektywną, równoczesną ocenę poziomu wielu cytokin w surowicy krwi, płynach wysiękowych, popłuczynach oskrzelowych, łzach, lizatach komórkowych oraz pożywkach hodowlanych. Technika CBA polega na pomiarze średniej wartości fluorescencji znacznika sprzężonego z daną grupą mikrokulek oraz różnicy intensywności fluorescencji po inkubacji materiału z przeciwcytokinowymi, swoistymi przeciwciałami monoklonalnymi, sprzężonymi z FITC lub PE. Dołączenie do każdego zestawu testowego standardów badanej cytokiny umożliwia wyznaczenie krzywej standardowej oraz dokładne określenie stężenia badanej substancji (rycina 19 i 20).



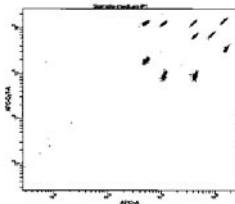
Rycina 19. Wykres kropkowy przedstawiający średnią wartość fluorescencji standardów dla sześciu analizowanych cytokin. A – kontrola negatywna, B – standard 80 pg/ml, C – standard 1250 pg/ml; D – standard 5000 pg/ml (pg-pikogram; ml -mililitr).





Rycina 20. Histogram przedstawiający intensywność fluorescencji ~ 650nm (FL3) mikrokulek opłaszczonych przeciwciałami przeciwko cytokinom produkowanym przez limfocyty Th1/Th2.

Obecnie istnieje możliwość indywidualnego doboru sprzężonych z przeciwcytokinowymi przeciwciałami monoklonalnymi mikrokulek, co umożliwi stworzenie dowolnych paneli macierzy analitycznych oceniających stężenie cytokin (rycina 21).



Rycina 21. Oznaczenie stężenia cytokin w płynie hodowlanym za pomocą techniki CBA Flex Set (badania własne). APC – allophycocyanine, IL – interleukiny, GM-CSF – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów, IFN – (-interferon gamma), RANTES – grupa chemokin wydzielanych przez prawidłowe limfocyty T, VEGF – czynnik wzrostu śródbłonna naczyń.

Cytometria przepływowa znalazła również zastosowanie w analizie cytokin wewnątrzkomórkowych. Wykorzystując technikę permeabilizacji błony cytoplazmatycznej oraz równoczesną ocenę fenotypową, możemy z dużą łatwością zdefiniować profil cytokin produkowanych i uwalnianych przez określoną subpopulację komórkową (np. określić polaryzację odpowiedzi immunologicznej w kierunku Th1 lub Th2). Jednak szersze zastosowanie tego badania w rutynowej diagnostyce laboratoryjnej jest limitowane wysoką ceną testu oraz zbyt długim czasem trwania analizy.

### ■ Perspektywy rozwoju cytometrii przepływowej.

Dynamiczny rozwój technik cytometrii przepływowej umożliwił jej szersze zastosowanie w diagnostyce klinicznej. Obecnie metoda ma głównie zastosowanie w diagnostyce chorób układu krwiotwórczego oraz chorób zakaźnych. Istotnym ograniczeniem wykorzystania CP w rutynowej diagnostyce laboratoryjnej jest wysoka cena aparatury oraz brak niezbędnego doświadczenia personelu laboratoryjnego. Wydaje się, iż w najbliższej przyszłości zostanie opracowane nowe pokolenie urządzeń analitycznych łączących zalety cytometrycznej oceny fenotypu oraz stężenia cytokin z możliwością szybkiej analizy morfologicznej i biochemicznej. Głównym celem strategii rozwoju cytometrii przepływowej jest doprowadzenie do powszechnego dostosowania znanych protokołów rutynowych oznaczeń cytometrycznych do standardów obowiązujących w diagnostyce klinicznej.

### Piśmiennictwo

1. Melamed MR, Lindmo T, Mendelsohn ML. Flow Cytometry and Sorting. Wiley-Liss, New York, 1990
2. Landay AL., Ault KA, Bajer KD i WSP. Clinical Flow Cytometry. Annals of the New York Academy of Sciences. New York: The New York Academy of Sciences. 1993, 677, 1-467
3. Li X, Melamed MR, Darzynkiewicz Z. Detection of apoptosis and DNA replication by differential labeling of DNA strand breaks with fluorochromes of different color. Exp Cell Res. 1996, 10;222(1):28-37.
4. Rivadeneyra-Espinoza L, Perez-Romano B, Gonzalez-Flores A, Guzman-Garcia MO, Carvajal-Armora F, Ruiz-Arguelles A. Instrument- and protocol-dependent variation in the enumeration of CD34+ cells by flow cytometry. Transfusion. 2006 ;46(4):530-6.
5. Morgan E, Varro R, Sepulveda H, Ember JA, Apgar J, Wilson J, Lowe L, Chen R, Shivraj L, Agadir A, Campos R, Ernst D, Gaur A. Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. Clin Immunol. 2004;110(3):252-66.

# WSKAŹNIKI CZERWONOKRWINKOWE

## Blood red cell indices

Andrzej Wyciński  
Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej Samodzielny Publiczny Szpital Wojewódzki w Gorzowie Wielkopolskim  
ul. Warszawska 48, 66-400 Gorzów Wielkopolski  
lab\_gorzow@info-publishing.com

### ■ Streszczenie

Podstawowe wskaźniki czerwonych krwinek znane są od przeszło siedemdziesięciu lat. Ich wartości są charakterystyczne dla określonych populacji czy grup wiekowych. Największą dynamikę zmian obserwuje się w pierwszych tygodniach i miesiącach po urodzeniu. Sugeruje się, że wskaźniki czerwonych krwinek kontrolowane są przez charakterystyczny układ genów. Największe znaczenie diagnostyczne przypisuje się MCV, znacznie mniejsze MCH i MCHC. Współczesne analizatory hematologiczne precyzyjnie wyliczają, chociaż nie bez pewnych ograniczeń, wartości wskaźników. Coraz szersze zastosowanie znajdują również do wewnętrznej kontroli jakości pracy analizatora.

### ■ Summary

Basic red blood cell indices are well-known for over seventy years. Their values are characteristic for definite populations or age groups. The greatest dynamics is observed in first weeks and months of infancy. It is suggested that they are controlled by the system of genes. The greatest diagnostic meaning has MCV, considerably less MCH and MCHC. Present haematological analysers precise enumerate, though not without certain limitations, values for indices. Because of small biological variations they are used for purposes of internal quality control of analysers.

**Słowa kluczowe:** MCV, MCHC, MCH, wskaźniki czerwonych krwinek.

**Key words:** MCV, MCHC, MCH, red cell indices.

### ■ Wstęp

Podstawowe wskaźniki czerwonych krwinek, zwane również wskaźnikami Wintroba znane są od ponad siedemdziesięciu lat i stanowią tradycyjne uzupełnienie obrazu morfologicznego krwi obwodowej.<sup>(2,6)</sup> Zaliczają się do nich:

- MCV – średnia objętość krwinki czerwonej,
- MCH – średnia masa hemoglobiny w krwince czerwonej,
- MCHC – średnie stężenie hemoglobiny w krwince czerwonej

Manualnie wyliczane są według następujących wzorów:

$MCV (fl) = \text{Hematokryt (w \%)} \times 10 / \text{liczba krwinek czerwonych} \times 10^9/l$

$MCH (pg) = \text{Hemoglobina (w g/dl)} \times 10 / \text{liczba krwinek czerwonych (mln/\mu l)}$

$MCHC (g/dl) = \text{Hemoglobina (w g/dl)} / \text{hematokryt (l/l)}$

Ze względu na to, że do ich wyliczenia niezbędne są wartości hematokrytu, liczba krwinek czerwonych i stężenie hemoglobiny, precyzyjne pomiary wymienionych parametrów są gwarancją wiarygodności uzyskanych wyników.

Od przeszło 40 lat – czyli od wprowadzenia liczników hematologicznych i analizatorów hematologicznych kolejnych generacji, pomiar liczby erytrocytów, stężenia hemoglobiny oraz objętości krwinki czerwonej odbywa się bezpośrednio, z wykorzystaniem technologii impedancji elektrycznej lub pomiaru rozproszenia światła laserowego. Wiadomo, że wielkość impulsu impedancyjnego jest proporcjonalna do wielkości krwinki czerwonej zawieszonyj w roztworze o odpowiedniej



osmolalności i przechodzącej przez system pomiarowy, Jest ona również uzależniona od kształtu komórki a ten z kolei zależy od lepkości cytoplazmatycznej, na którą główny wpływ ma zawartość hemoglobiny w komórce. Połączenie tych dwóch prostych zależności sprawia, że w niektórych przypadkach system impedancyjny, bazujący na izosmotycznych rozcieńczalnikach nie powinien być używany do wyznaczania wartości MCV. Dotyczy to stanów związanych z zaburzeniami gospodarki wodno- elektrolitowej, kiedy wartości MCV oraz MCHC muszą być bezwzględnie wyliczane przy użyciu powyższych wzorów lub wyznaczone przy użyciu innej technologii, na przykład pomiaru rozproszenia światła laserowego. Nie należy również zapominać, że w ocenie tych zaburzeń ważne jest obserwowanie dynamiki zmian wskaźników, a nie bazowanie wyłącznie na pojedynczym pomiarze.<sup>(6,9)</sup>

Technologia pomiaru rozproszenia światła laserowego pozbawiona powyższych niedogodności, nie jest pozbawiona wad. Umożliwia co prawda bezpośredni pomiar hemoglobiny w krwince czerwonej, co podnosi wiarygodność pomiaru, nie ma jednak zastosowania w przypadku niedokrwistości sierpowatych.

Pomijając niedoskonałości technologiczne, powinno się pamiętać, że systemy hematologiczne dostarczają, oprócz podstawowych wskaźników czerwonekrwinkowych, wiele innych parametrów (rekordziści oferują ich prawie czterdzieści) oraz wykresów graficznych (histogramy i skatergramy), umożliwiających postawienie wstępnej diagnozy lub jej potwierdzenie, bez konieczności wykonywania dodatkowych badań (biochemicznych, immunochemicznych). Nawet relatywnie prosty analizator dostarcza informacji o podstawowych wskaźnikach czerwonekrwinkowych, które zostały wykorzystane do podziału niedokrwistości.<sup>(2,7)</sup>

Spśród wymienionych parametrów najważniejsze znaczenie diagnostyczne posiada MCV. Jest bowiem głównym czynnikiem decydującym między innymi o podziale niedokrwistości, na niedokrwistości makrocytowe, mikrocytowe i normocytowe, sugerującym podjęcie odpowiedniego działania przez klinicystę. (Tabela 1). Znaczenie MCH i MCHC w diagnostyce niedokrwistości jest mniejsze.<sup>(3,7,8)</sup>

Automatyzacja oznaczeń hematologicznych przyczyniła się do bardzo dobrej powtarzalności wartości wskaźników, które ze względu na bardzo małą zmienność biologiczną znalazły zastosowanie w procesie kontroli jakości analitycznej. Większe problemy są ze zdefiniowaniem ich zakresu wartości prawidłowych. Dla MCV różni autorzy podają różne dane między 80 i 98 fl. (80 – 94, 82 – 96, 82 – 98). W klasyfikacji niedokrwistości za punkty odcięcia przyjęto 80 (poniżej jest mikrocytoza)

i 100fl (powyżej jest makrocytoza). Jednak już przy wartościach 94fl można spodziewać się towarzyszących niedoborów wit. B12, lub początku niedokrwistości wieloniedoborowej.

Tabela 1.

Wartość MCV	Stan kliniczny
poniżej 80 fl	niedokrwistość mikrocytowa: – z niedoboru żelaza – talasemie – syderoblastyczne choroby przewlekłe hemoglobinopatie
80 – 100 fl	niedokrwistość normocytowa: – hipoproliferycyjne – aplastyczne – hemolityczne – pokrwotoczne wczesna faza niedokrwistości z niedoboru żelaza niedokrwistość oporna na leczenie
powyżej 100 fl	niedokrwistości makrocytowe i megaloblastyczne: – z niedoboru witaminy B12 – z niedoboru kwasu foliowego niedokrwistości hipoproliferycyjne zespoły mielodysplastyczne niedokrwistość oporna na leczenie niedokrwistości hemolityczne choroby wątroby

Prawie wszystkie analizatory hematologiczne wyliczają wskaźnik anizocytozy krwinek czerwonych (rozkładu objętości), określany jako RDW i wyrażany najczęściej w %<sup>(4)</sup>. Im wyższe wartości RDW tym większa heterogenność populacji krwinek czerwonych (intensywna odnowa czerwonekrwinkowa lub obecność co najmniej dwóch różnych populacji krwinek czerwonych po przetoczeniach krwi). RDW nie może być oceniany samodzielnie tylko łącznie z histogramem krwinek czerwonych. Wartości RDW wykazują nieznaczne wahania zależne do wieku, są natomiast niezależne od płci.

Podstawowe wskaźniki czerwonekrwinkowe wykazują w warunkach fizjologii bardzo małą zmienność tak wewnątrz jak i międzysobniczą, co zostało wykorzystane w programach ruchomej średniej, monitorujących jakość pracy większości nowoczesnych analizatorów hematologicznych. Analizy ruchomej średniej w hematologii zostały zapoczątkowane przez analizy X-B, wykorzystujące do monitorowania jakości pracy analizatorów automatyczną średnią, znanych, stabilnych wskaźników czerwonekrwinkowych (MCV, MCH, MCHC). Analizy programu X-B, gdzie XB, jest symbolem dla średniej, używają do wyliczenia ruchomej średniej dla wskaźników czerwonekrwinkowych algorytmu opisanego przez Bulla. Każde odchylenie od ustalonych w laboratorium wartości średnich, wyliczonych w oparciu o zbiór yników, uzyskanych od pacjentów może świadczyć o nieprawidłowościach w pracy analizatora.

W zaawansowanych technologicznie systemach hematologicznych monitorowanie jakości pracy systemu odbywa się z wykorzystaniem algorytmów podobnych do algorytmów analiz programu wykorzystującego wskaźniki czerwonokrwinkowe. Wykorzystywane są parametry RBC/PLT (RBC, RDW, HGB, HCT, PLT) parametry krwinek białych (WBC) i retikulocytów (%R) To monitorowanie zostało również poszerzone na niektóre wartości mierzone nazywane populacjami statystycznymi, które zawierają wartość średnią i współczynnik zmienności dla kanałów danych w pomiarach optycznych.

Wiadomo, że zmiany wartości wskaźników czerwonokrwinkowych są odzwierciedleniem zmian zachodzących w erytrocytach. Do prawidłowej budowy krwinki czerwonej niezbędne są między innymi aminokwasy, witaminy (B12, B6, C, E, kwas foliowy, ryboflawina, kwas pantoteny, tiamina) jony metali (żelaza, kobaltu, magnezu), a także substancje regulatorowe takie jak erytropoetyna, hormony tarczycy czy androgeny.

Produkcja erytrocytów rozpoczyna się już około 14 dnia od zapłodnienia i trwa nieprzerwanie aż do śmierci organizmu. W okresie życia płodowego wyróżnia się trzy główne fazy – megaloblastyczną (do około 6 tygodnia życia płodowego), wątrobową (przebiegającą w wątrobie płodu od około 6 tygodnia życia płodowego do mniej więcej końca 2 trymestru ciąży) oraz szpikową, która rozpoczyna się już pomiędzy 4 i 5 miesiącem życia płodowego) Okres do około 12 tygodnia życia płodowego nazywany jest również okresem erytropoezy prymitywnej. Pierwsze normoblasty pojawiają się w krążeniu płodowym około 10 tygodnia życia. W organizmie osoby dorosłej w ciągu jednej sekundy ze szpiku do krwioobiegu przemieszczane jest około 2 milionów krwinek czerwonych.

Zmiany wskaźników czerwonokrwinkowych są odzwierciedleniem zmian przebiegających w erytrocytach i zachodzą już od pierwszych dni ich produkcji. Średnia objętość krwinki czerwonej zmniejsza się od wartości 180 fl w 12 tygodniu życia płodowego, poprzez 135 fl w tygodniu 20, do wartości 118 fl w 34 tygodniu. Ponieważ wartości hemoglobiny i erytrocytów stopniowo wzrastają (od 8 – 10 g/dl i 1,5 mln/ $\mu$ l w 12 tygodniu ciąży do 15 g/dl i 4,4 mln/ $\mu$ l w 34 tygodniu, w sposób proporcjonalny spadają wartości MCH (od 60 pg w 12 tygodniu do 38 pg w 34 tygodniu) Wartości MCHC wykazują najmniejsze zmiany (w analogicznych okresach notowane są wartości 34 i 32 g/dl).<sup>(4,7,8)</sup>

Najbardziej dynamiczne zmiany w erytrocytach zachodzą w pierwszych kilku tygodniach i miesiącach po urodzeniu. Jest to okres intensywnych zmian początkowo adaptacyjnych do nowych warunków

życiowych. Erytrocyty są większe, charakteryzują się krótszym czasem życia, zawierają więcej hemoglobiny płodowej w porównaniu z erytrocytami, dzieci, czy osób dorosłych. Odzwierciedleniem tych zachodzących procesów są zmiany w wartościach wskaźników czerwonokrwinkowych. Obserwowane jest stałe zmniejszanie się objętości krwinki czerwonej. Tuż po urodzeniu, u donoszonych noworodków wartości te wahają się od około 114 fl, poprzez 96 fl w 14 dniu życia do około 77 fl po upływie 6 miesięcy. Analogicznie zachowują się pozostałe wskaźniki. Wartości MCH zmieniają się od 34 pg, poprzez 31,5 pg, żeby pod koniec 6 miesiąca życia osiągnąć wartości 26 pg. W tym samym okresie wartości MCHC wynoszą odpowiednio 31,7 g/dl, 33 g/dl oraz 34,2 g/dl. Zaobserwowano, że wartości hematokrytu, hemoglobiny i MCV są nieznacznie wyższe u osób rasy białej niż u osób rasy czarnej. Odrębnym aspektem są różnice wynikające ze sposobu odżywiania się kobiet w okresie ciąży i związanego z tym zapotrzebowania na substancje niezbędne do produkcji erytrocytów. Jest to specyficzna populacja, dla której mają zastosowanie odrębne wartości referencyjne.<sup>(2,3,4)</sup>

U zdrowych osób dorosłych wartości hemoglobiny, krwinek czerwonych, hematokrytu oraz średnia objętość krwinki czerwonej zmieniają się nieznacznie w czasie. Począwszy od okresu dzieciństwa aż do osiągnięcia pełnej dojrzałości obserwowany jest stały wzrost tych parametrów. Zaobserwowano, że wzrost ten jest nieznacznie większy u mężczyzn niż u kobiet. Jest to najprawdopodobniej związane z wzajemnym oddziaływaniem szeregu hormonów, w tym głównie testosteronu i insulino-podobnego czynnika wzrostu (IGF1), których stężenie wzrasta wraz z wiekiem. Wzrost stężenia hemoglobiny oraz wskaźników czerwonokrwinkowych zaobserwowano u chłopców w okresie dojrzewania, bezpośrednio po wzroście w surowicy poziomu testosteronu lub IGF-1. Sugeruje się, że wskaźniki czerwonokrwinkowe kontrolowane są w okresie dojrzewania przez charakterystyczny układ genów, występujących zarówno u płci żeńskiej jak i męskiej. Inny układ genów kontroluje wskaźniki przed 12 rokiem życia a inny powyżej niego.<sup>(5)</sup>

Wartości wskaźników czerwonokrwinkowych zależne są nie tylko od wieku i płci, ale również obserwowane są znaczące różnice pomiędzy grupami etnicznymi. Jest to szczególnie zauważane w okresie dojrzewania. Afro-Amerykanie i Afrykanie wykazują generalnie niższe wartości wszystkich parametrów hematologicznych w porównaniu z rasą Kaukaską. Na stan taki wpływ ma wiele czynników. Najważniejszymi z nich są czynniki środowiskowe oraz wysokość nad poziomem morza.<sup>(1,7)</sup>

Pomimo, że od pierwszego opisu erytrocytów, dokonanego przez Jana Swammedrama w 1658 roku, minęło prawie trzysta pięćdziesiąt lat, nasza wiedza na ich temat nadal nie jest kompletna, i dlatego dodat-

kowe informacje dostępne przy zastosowaniu najnowszych technik pomiarowych po ich klinicznej weryfikacji mogą okazać się bardzo przydatne.

## Piśmiennictwo

---

1. Beulter E, West C. Hematologic differences between African-American and whites: the roles of iron deficiency and  $\beta$ -thalassemia on hemoglobin levels and mean corpuscular volume. *Blood* 2005; 106: 740-745.
2. Cavaliere TA. Red blood cell indices: Implication for practice. *NBIN*, 2004; 4: 231-239.
3. Cheng CK, Chan J, Cembrowski GS i wsp. Complete blood count reference interval diagrams derived from NHANES III: stratification by age, sex and race. *Lab Hematolog*. 2004; 10: 42-53.
4. Domellof M, Lonnerdal B, Dewey KG i wsp. Sex Difference in Iron Status During Infancy. *Pediatrics* 2002; 110:545-552.
5. Evans DM, Frazer IH, Boomsma DI i wsp. Development Genetics of Red Cell Indices During Puberty: A Longitudinal Twin Study” *LIHG* 2001; 1: 41-53.
6. Mahandas N, Kim YR, Tycko DH i wsp. Accurate and Independent Measurement of Volume and Hemoglobin of Individual Red Cell by Laser Light Scattering. *Blood*; 1986, 68: 506-513.
7. Mohsen AF El-Hazmi, Warsy AS. Normal reference values for hematological parameters, red cell indices, HbA2 and HbF from early childhood through adolescence in Saudis. *Ann Saudi Med* 2001; 21: 165-169.
8. Savage DG, Ogundipe A, Allen RH i wsp. Etiology and Diagnostic Evaluation of Macrocytosis. *Am J Med Sci* 2000; 319: 3443 - 3452.
9. Van Hove L, Schiasano T, Brace L. Anemia Diagnosis, Classification and Monitoring Using Cell-Dyn Technology Reviewed for the New Millennium. *Laboratory Hematology* 2000; 6: 93-108.



## Nowe testy na analizator AxSYM

3L85-20	AxSYM D-Dimer Reagent Kit	1 x 100 testów
3L85-01	AxSYM D-Dimer Calibrators	6 x 2,8 ml
3L85-10	AxSYM D-Dimer Controls	6 x 1,0 ml
3L91-20	AxSYM Anti-CCP Reagent Kit	1 x 100 testów
3L91-01	AxSYM Anti-CCP Calibrators	6 x 4,3 ml
3L91-10	AxSYM Anti-CCP Controls	2 x 7,0 ml
3L83-20	AxSYM HoloTC Reagent Kit	1 x 100 testów
3L83-01	AxSYM HoloTC Calibrators	6 x 4,3 ml
3L83-10	AxSYM HoloTC Controls	2 x 8,3 ml

## Nowe testy na analizator ARCHITECT

8D15-25	ARCHITECT Cortisol Reagent Kit	1 x 100 testów
8D15-35	ARCHITECT Cortisol Reagent Kit	1 x 500 testów
8D15-01	ARCHITECT Cortisol Calibrators	6 x 4,0 ml
8K25-20	ARCHITECT Intact PTH Reagent Kit	4 x 100 testów
8K25-25	ARCHITECT Intact PTH Reagent Kit	1 x 100 testów
8K25-01	ARCHITECT Intact PTH Calibrators	6 x 4,0 ml
8K25-10	ARCHITECT Intact PTH Controls	3 x 8,0 ml
6C17-25	ARCHITECT Rubella IgG Reagent Kit	1 x 100 testów
6C17-35	ARCHITECT Rubella IgG Reagent Kit	1 x 500 testów
6C17-01	ARCHITECT Rubella IgG Calibrators	6 x 4,0 ml
6C17-10	ARCHITECT Rubella IgG Controls	3 x 8,0 ml
1L76-25	ARCHITECT Sirolimus Reagent Kit	1 x 100 testów
1L76-01	ARCHITECT Sirolimus Calibrators	1 x 9,0 ml (A) 5 x 4,5 ml (B-F)
1P05-10	Immunosuppressant MCC Controls	3x12,0 ml
1L77-20	ARCHITECT Tacrolimus Reagent Kit	1 x 400 testów
1L77-25	ARCHITECT Tacrolimus Reagent Kit	1 x 100 testów
1L77-35	ARCHITECT Tacrolimus Reagent Kit	1 x 500 testów
1L77-01	ARCHITECT Tacrolimus Calibrators	1 x 9,0 ml (A) 5 x 4,5 ml (B-F)
1P05-10	Immunosuppressant MCC Controls	3 x 12,0 ml



**Austria**

Abbott Ges.m.b.H.  
Diagnostics  
Tel. (+43) 1 89 122 0  
Fax (+43) 1 89 122 44

**Belgium/Luxembourg**

Abbott S.A./N.V.  
Tel. (+32) 10 47 53 11  
Fax (+32) 10 47 53 34

**Croatia**

Abbott Representative Office  
Tel. (+385) 1 23 50 560  
Fax (+385) 1 24 41 331

**Czech Republic**

Abbott Laboratories s r.o.  
Tel. (+420) 2 672 92 111  
Fax (+420) 2 672 92 233

**Denmark**

Abbott Laboratories A/S  
Diagnostics  
Tel. (+45) 39 77 00 00  
Fax (+45) 39 77 01 99

**Egypt (MEN)**

ADD Egypt  
Tel. (+20) 2 2 68 49 31  
Fax (+20) 2 2 68 49 21

**Finland**

Abbott Oy/Diagnostics  
Tel. (+358) 9 75 18 42 1  
Fax (+358) 9 75 18 41 50

**France**

Abbott France S.A.S.  
Tel. (+33) 1 45 60 25 00  
Fax (+33) 1 45 60 04 98

**Germany**

Abbott GmbH & Co. KG  
Tel. (+49) 6122 580  
Fax (+49) 6122 581244

**Greece**

Abbott Laboratories  
(Hellas) S.A.  
Tel. (+30) 2 10 99 85 171  
Fax (+30) 2 10 99 58 361

**Hungary**

Abbott Kft.  
Tel. (+36) 1 465 2100  
Fax (+36) 1 465 2199

**Ireland**

Abbott Diagnostics  
Tel. (+353) 1 469 1560  
Fax (+353) 1 469 1565

**Italy**

Abbott S.p.A.  
Abbott Diagnostici  
Tel. (+39) 06 52 99 11  
Fax (+39) 06 52 99 14 36

**Latvia**

Abbott Laboratories S.A.  
Latvian Representative Office  
Tel. (+371) 7 31 48 23  
Fax (+371) 7 31 48 38

**Netherlands**

Abbott B.V.  
Tel. (+31) 23 55 44 500  
Fax (+31) 23 55 44 577

**Norway**

Abbott Norge AS  
Tel. (+47) 81 55 99 20  
Fax (+47) 66 98 39 09

**Poland**

Abbott Laboratories  
Poland Sp. z o.o.  
Tel. (+48) 22 606 10 50  
Fax (+48) 22 606 10 80

**Portugal**

Abbott Laboratórios Lda.  
Diagnósticos  
Tel. (+351) 21 472 72 00  
Fax (+351) 21 472 72 00

**Romania**

Abbott Laboratories  
Representative Office Romania  
Tel. (+4021) 3 36 86 00  
Fax (+4021) 3 36 86 42

**Russian Federation**

Abbott Laboratories S.A.  
Tel. (+7) 0952 5842 70  
Fax (+7) 0952 5842 71

**Saudi Arabia**

Mediserv  
Tel. (+966) 14 6122 26  
Fax (+966) 14 6133 39

**Slovak Republic**

Abbott Laboratories  
Slovakia s r.o.  
Tel. (+421) 244 454 188  
Fax (+421) 244 454 420

**South Africa**

Abbott Laboratories (Pty) Ltd.  
Tel. (+27) 11 858 2000  
Fax (+27) 11 858 2130

**Spain**

Abbott Científica S.A.  
Tel. (+34) 91 337 3400  
Fax (+34) 91 734 9664

**Sweden**

Abbott Scandinavia AB  
Tel. (+46) 8 5465 6700  
Fax (+46) 8 5465 6800

**Switzerland**

Abbott AG  
Diagnostics  
Tel. (+41) 41 768 44 44  
Fax (+41) 41 768 44 50

**Turkey**

Abbott Laboratuvarlari  
Tel. (+90) 216 5 38 74 00  
Fax (+90) 216 4 25 09 78

**United Arab Emirates**

Abbott Laboratories S.A.  
Tel. (+971) 43 327 862  
Fax (+971) 43 327 904

**United Kingdom**

Abbott Laboratories Ltd.  
Diagnostics  
Tel. (+44) 16 28 7840 41  
Fax (+44) 16 28 6442 05