



ISSN 1644-8448
nakład: 1000 egz.

LabForum



cobas[®]
Life needs answers



Szanowni Państwo!

Z wielką przyjemnością pragnę pogratulować Panu Profesorowi Janowi Kulpie uhonorowania go przez Prezydenta RP Krzyżem Komandorskim Orderu Odrodzenia Polski. Profesor Kulpa został wyróżniony za wybitne osiągnięcia w pracy naukowo-badawczej. Odbieramy ten fakt jako najlepsze podsumowanie jego wieloletniej pracy i wspaniałego dorobku naukowego. Jesteśmy dumni, że od wielu lat mamy okazję współpracować i korzystać z wiedzy i doświadczeń Pana Profesora. Jesteśmy przekonani, że jeszcze przez wiele lat jego dokonania będą pozytywnie wpływać na całą naszą społeczność.

Chciałbym również poinformować Państwa o ogólnopolskiej, społecznej akcji profilaktycznej „NIE MAM HCV”, do której przyłączył się Roche Diagnostics. Jest to akcja zorganizowana przez Krajową Izbę Diagnostów Laboratoryjnych i Kapitułę Nagrody „Złoty OTIS”. Program ten został zrealizowany w dniach 9–13 maja w wybranych 18 ośrodkach medycznych. Roche i inne firmy sponsorujące akcję przekazały nieodpłatnie odczynniki do wykonania oznaczeń anty-HCV, a diagnosty wykonali badania społecznie. Patronat medialny sprawowali Media TV Plus, więcej szczegółów na ten temat znajdą Państwo w Internecie na stronach KIDL, www.kidl.org.pl.

W bieżącym numerze polecam Państwu artykuły na temat hormonu wzrostu, najnowszych osiągnięć w diagnostyce HIV i diagnostyki tkankowej.

Z poważaniem,

Andrzej Banaszkiewicz
wraz z zespołem RDP



Spis treści:

Aktualności	2
Hormon wzrostu – znaczenie diagnostyczne i problemy metodyczne	3–8
Badania genotypów wirusa HPV	9–10
Postępowanie diagnostyczne w raku płuc	11–13
Medycyna personalizowana	14–15

Hormon wzrostu – znaczenie diagnostyczne i problemy metodyczne

Krystyna Stefko, Zakład Biochemii Klinicznej P-A Instytutu Pediatrii, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum

Zaburzenia przekazu informacji w układzie „podwzgórzowy czynnik uwalniający hormon wzrostu – hormon wzrostu – insulinopodobny czynnik wzrostu I (GHRH-GH-IGF)” mogą prowadzić do zaburzeń endokrynologicznych. Pulsacyjne wydzielanie GH z przysadki jest pod kontrolą GHRH, somatostatyny i prawdopodobnie greliny.

Kliniczne cechy wynikające z niedoboru lub nadmiaru hormonu wzrostu (GH) zależą od wieku pacjenta. Niedobór hormonu wzrostu (GHD) u dzieci może być wrodzony lub nabyty, może być izolowany, ale też może współistnieć z niedoborem innych hormonów przysadkowych. Przyczyną niskiego wzrostu jest nie tylko niedobór GH ale także wrodzony niski wzrost, opóźnione konstytucyjne wzrastanie lub dojrzewanie, psychosocjalna karłowatość lub niedożywienie kaloryczno-białkowe. Do najczęstszych przyczyn niskiego wzrostu u dzieci związanych z zaburzeniami endokrynologicznymi należą: niedoczynność tarczycy (wrodzona lub nabyta), nadmierne wydzielanie glukokortykoidów (jatrogenne lub niejatrogenne), niedoczynność przysadki, a także choroby o podłożu genetycznym. Istnieje wiele schorzeń, czasem nierozpoznawanych, którym może towarzyszyć nieprawidłowe wzrastanie, np. choroby płuc, choroby serca, przewodu pokarmowego (choroba Crohna i inne nieswoiste zapalenie jelit), choroba reumatyczna, schorzenia neurologiczne, choroby nerek i anemia.

Przyczyną niskiego wzrostu może też być genetycznie uwarunkowana obniżona odpowiedź receptorów obwodowych na hormon wzrostu (oporność na hormon wzrostu). Oporność pierwotna związana jest z nieprawidłowościami receptora dla GH (karłowatość Larona, wysoki poziom GH i niski poziom IGF-I). Znanych jest ponad 40 różnych mutacji receptora GH, z czego co najmniej 32 mutacje dotyczą domeny zewnątrzkomórkowej. Innymi przyczynami pierwotnej oporności na GH może być niedostateczna ekspresja receptora GH, błędy w przekazie informacji lub defekty w syntezie IGF-I. Może również występować wtórna oporność na GH związana z obecnością w krążeniu przeciwciał przeciwko GH lub przeciwciał przeciwko receptorowi GH. Zmieniona struktura cząsteczki GH powoduje utratę aktywności biologicznej tego hormonu, co również prowadzi do upośledzenia procesu wzrastania.

Najczęstszą przyczyną nadmiaru GH jest guz przysadki produkujący GH. Chociaż guzy te są łagodne, wydzielanie GH nie podlega kontroli czynników podwzgórzowych i hormon jest wydzielany w sposób ciągły. Ektopowe wydzielanie GH jest niezmiernie rzadkie. Nadmiar hormonu wzrostu powoduje gigantyzm u dzieci i akromegalię u dorosłych.

POMIAR STĘŻENIA GH

Pomiar stężenia hormonu wzrostu w surowicy krwi jest niezbędnym elementem w diagnostyce zaburzeń wydzielania GH. Ze względu na pulsacyjny charakter sekrecji hormonu wzrostu i niską czułość dostępnych zestawów immunochemicznych, pojedyncze oznaczenie stężenia GH w surowicy ma ograniczoną wartość diagnostyczną. Wprowadzenie do diagnostyki zaburzeń wydzielania GH oznaczania stężenia IGF-I i jego białek wiążących, głównie białka wiążącego IGF-BP3, polepszyło diagnostykę ale nadal laboratoryjna ocena niedoboru lub nadmiaru GH opiera się o punkty decyzyjne oceniające wzrost lub spadek stężenia GH w testach dynamicznych. Powszechnie stężenie hormonu wzrostu oznacza się po różnych bodźcach stymulujących przysadkę takich jak czynniki fizjologiczne (sen, wysiłek fizyczny) lub farmakologiczne (insulina, L-DOPA, klonidyna, arginina), co pozwala ocenić rzeczywisty niedobór GH. Pojedynczy test dynamiczny, ze względu na brak standaryzacji postępowania przedanalizy i niedoskonałość metod immunochemicznych, ma jednak niewystarczającą czułość i niską swoistość



Analizator cobas e 601

· system
immunochemiczny
przeznaczony
dla średnich i dużych
laboratoriów



cobas® 6000

· zintegrowany system
biochemiczno-
immunochemiczny



Analizator cobas e 411

· system
immunochemiczny
przeznaczony
dla średnich i dużych
laboratoriów

dianostyczną. Również żaden ze stosowanych testów dynamicznych nie może być uważany za „złoty standard” w diagnostycznej ocenie niedoboru hormonu wzrostu. Do ostatecznego rozpoznania niedoboru GH, oprócz badania klinicznego i oznaczenia IGF-I i IGFBP3, musi wykonać się co najmniej dwa testy dynamiczne. Kryteria dla ustalenia prawidłowych przedziałów referencyjnych dla GH oznaczanego w testach dynamicznych są arbitralne, zależą od typu wykonywanego testu i metody stosowanej do oznaczania GH. Niestety kryteria te często ulegają zmianie, co związane jest m.in. z wprowadzaniem nowych generacji metod do oznaczania GH. Podobne problemy pojawiają się w przypadku diagnostyki nadmiaru hormonu wzrostu. Brak ustalonego punktu odcięcia w glukozowym teście hamującym wydzielanie hormonu wzrostu wynika przede wszystkim z braku odpowiedniej czułości analitycznej metod immunochemicznych. Pomiedzy zestawami immunochemicznymi stwierdza się duże różnice w stężeniu GH mierzonym w tych samych próbkach surowic pacjentów. Pomimo polepszenia formatu metod i ich jakości, zmienność wyników oznaczeń GH pomiędzy metodami wzrosła w ciągu ostatnich 20 lat zamiast się zmniejszyć. Od każdej metody do oznaczania stężenia GH wymaga się, aby cechowała się prostotą wykonania, posiadała odpowiednią czułość analityczną, była dokładna i odzwierciedlała aktywność biologiczną hormonu. Jednakże istotne problemy z wiarygodnym oznaczeniem GH są nadal powszechne a wynikają one z a) heterogenności hormonu wzrostu w surowicy krwi; b) braku właściwej standaryzacji metod immunochemicznych; c) obecności czynników interferujących, takich jak np. białka wiążące GH (GHBP), autoprzeciwciała i przeciwciała heterofilowe; d) różnic dotyczących przeciwciał wychwytyjących stosowanych w różnych zestawach immunochemicznych; e) niskiej czułości analitycznej

a) Heterogenność hormonu wzrostu

Hormon wzrostu jest heterogennym białkiem składającym się z kilku form molekularnych. U ludzi GH jest produktem pięciu spokrewnionych genów w chromosomie 17q24.2. Dwa z nich kodują dwa różne warianty GH nazywane GH-N (lub GH-1) i GH-V (lub GH-2). Dwa inne kodują somatomamotropinę (CS1 i CS2), a piąty koduje białko podobne do CS. GH-N wykazuje ekspresję głównie w komórkach somatotropowych przysadki i w mniejszym stopniu w układzie immunologicznym (zwłaszcza w limfocytach B). GH-V z kolei wykazuje ekspresję głównie w syncytiotroblastach łożyska. Większość GH obecnego we krwi pochodzi z komórek somatotropowych przysadki. Nie ma dowodów na to, że GH pochodzący z limfocytów przyczynia się znacząco do stężenia GH oznaczanego w osoczu.

Zarówno GH-N jak i GH-V są pojedynczymi łańcuchami peptydowymi zawierającymi 191 aminokwasów o masie cząsteczkowej 22 kDa. Ich pierwszorzędowa struktura różni się zaledwie 13 resztami aminokwasowymi. Forma GH-V jest białkiem bardziej zasadowym i zawiera sekwencję umożliwiającą N-glikozylację.

Przysadkowa forma GH 22kDa ulega modyfikacjom posttranslacyjnym i występuje w postaci amino-acylowanej formy i dwóch form deamidowanych (Asp¹⁵², Glu¹³⁷). GH-N może występować w przysadce i w osoczu jako monomer ale także jako homogenne lub heterogenne (nawet w postaci pentamerów) oligomery połączone niekowalencyjnie lub mostkami dwusiarczkowymi. W porównaniu do monomerów, oligomeryczne formy mają mniejszą aktywność biologiczną i niższe powinowactwo do receptora GH. Również czas biologicznego półtrwania oligomerów jest dłuższy (wolniejszy klirens) niż formy monomeryczne. Monomer GH występuje w największej ilości w surowicy i przysadce, charakteryzuje się najwyższą aktywnością biologiczną i jest najlepiej poznaną formą.

Mniejsza forma GH-N o masie cząsteczkowej 20 kDa nie zawiera wewnętrznych 15 aminokwasów, które są obecne w formie 22 kDa. GH 20 kDa stanowi zaledwie 5–10% całkowitej produkcji GH i w dużej mierze forma ta ulega dimeryzacji. Niewielka ilość GH o masie cząsteczkowej 17.5 kDa jest także produkowana przez przysadkę. Forma 20kDa charakteryzuje się mniejszą aktywnością biologiczną i wiąże się z receptorem GH z mniejszym powinowactwem. Klirens metaboliczny formy 20 kDa jest wolniejszy niż formy 22 kDa, głównie z powodu tendencji do dimeryzacji. Prawdopodobnie formy 22 kDa i 20 kDa są wydzielane przez przysadkę w stałym stosunku.

GH-V pochodzi z sincytotrofoblastów i występuje w wyższym stężeniu we krwi w porównaniu do stężenia GH-N w trzecim trymestrze ciąży. Forma ta wykazuje pełną aktywność biologiczną porównywalną z formą GH-N 22 kDa (jako somatogeny hormon) ale ma mniejszą aktywność laktogenną. GH-V 20 kDa występuje w postaci glikozylowanej i nieglikozylowanej.

Proporcja izoform GH we krwi zmienia się jako funkcja czasu. Wydzielanie przysadkowego GH zachodzi pulsacyjnie, z pulsami pojawiającymi się co 2–3 godziny. Stężenie GH wydzielanego pomiędzy pulsami jest bardzo niskie. Przyczynia się to do bardzo dużych wahań stężenia GH od minimalnego, prawie niemierzalnego stężenia do wartości w piku nawet do 100 ng/ml. Wydzielanie łożyskowego GH jest tonicznie, bo łożysko nie jest pod kontrolą podwzgórza.

b) Standaryzacja metod immunochemicznych do oznaczania hormonu wzrostu

Standaryzacja metod immunochemicznych do oznaczania heterogennych białek jest bardzo dużym wyzwaniem dla laboratoriów. Nie ma idealnego, czystego standardu dla heterogennych białek, w tym również dla hormonu wzrostu. Każdy dostępny standard dla GH ma swoje zalety i wady. Naturalny, ekstrahowany z przysadki GH jest najlepszym przybliżeniem natywnego GH. Przysadka zawiera wszystkie izoformy GH, ale ich proporcja nie zawsze jest taka sama jak w surowicy czy innych płynach biologicznych. Ponadto, ekstrahowany z przysadki GH może zawierać artefakty powstające w wyniku procesu oczyszczania i różnego rodzaju zanieczyszczenia. Ekstrakcja peptydu z przysadki może prowadzić do powstania różnej proporcji form molekularnych. Dodatkowo, dla tak heterogennej mieszanki izoform GH nie da się przypisać jednostki w układzie SI i używane są tylko jednostki biologiczne (IU), które nie zawsze są precyzyjne. Międzynarodowe standardy GH ekstrahowane z przysadki stosowane dawniej miały numery 66/217 i 80/505.

Podobnie jak dla wielu heterogennych białek, międzynarodowe standardy dla GH są stale ulepszane. Monomeryczna forma 22 kDa jest najbardziej powszechna dla przysadki i surowicy, zatem dobrym przybliżeniem jest standard zawierający tę formę. W latach 90. ubiegłego wieku zaczęto stosować rekombinowany standard GH (88/624). Najnowszym wzorcem jest drugi międzynarodowy standard (Second International Standard for somatotropin 98/574), którego podstawą jest rekombinowana forma 22 kDa, dostępny w formie monomerycznej o bioaktywności 3 IU/L ($1\mu\text{g/L} = 3\text{ mIU/L}$). Rekombinowany standard jest dostępny w dowolnych ilościach, ma czystość 96% i może podlegać kontroli. Czysty, chemicznie zdefiniowany standard, chociaż bardzo pożądanym, nie odzwierciedla jednak biologii i może prowadzić do mylnych, z klinicznego punktu widzenia, wyników. Jednak stosowanie przez producentów zestawów immunochemicznych identycznego wzorca GH 98/574 może znacznie polepszyć porównywalność oznaczeń GH różnymi metodami, ale komutabilność (równoważność) tego wzorca z próbkami kontrolnymi i surowicami pacjentów nie została jak dotąd udowodniona.



Analizator cobas e 601

· system
immunochemiczny
przeznaczony
dla średnich i dużych
laboratoriów



cobas® 6000

· zintegrowany system
biochemiczno-
immunochemiczny



Analizator cobas e 411

· system
immunochemiczny
przeznaczony
dla średnich i dużych
laboratoriów

c) Interferencje z białkami wiążącymi, fragmentami GH i przeciwciałami

W osoczu krwi występują dwa białka wiążące GH (GHBP), jedno o wysokim a drugie o niskim powinowactwie do GH. Pierwsze białko łączy się z zewnątrzkomórkową domeną receptora GH. W warunkach prawidłowych około 45–55% krążącego GH jest połączone z GHBP. Poziom GHBP w surowicy krwi wykazuje dużą zmienność międzyosobniczą, zależy od stadium rozwoju organizmu i stanu odżywienia, a także jest pod wpływem zmian metabolicznych i hormonalnych. Drugie białko GHBP wiąże GH z niskim powinowactwem, reprezentuje zmodyfikowaną alfa-2-makroglobulinę i odpowiada za wiązanie około 5–8% GH w surowicy. GH łączy się z GHBP bezpośrednio po wydzieleniu, co powoduje wydłużenie okresu półtrwania hormonu.

GH obecny we krwi stanowi mieszaninę różnych form molekularnych, które występują zarówno w postaci wolnej jak i związanej z GHBP. Obecne są również inne podobne struktury, takie jak fragmenty pochodzące z katabolizmu GH. Wzajemna proporcja różnych form molekularnych GH w osoczu jest inna niż w przysadce, ze względu na inny czas biologicznego półtrwania i zmienia się jako funkcja czasu od momentu wydzielenia. Niestety, relatywna bioaktywność lub immunoreaktywność różnych form GH w osoczu w danym momencie czasowym nie jest dokładnie znana.

Interferencja białek wiążących, autoprzeciwciał czy fragmentów GH jest w znacznym stopniu uzależniona od rodzaju metody. Metody kompetycyjne z reguły powodują zawyżenie wyniku oznaczenia GH, a metody niekompetycyjne zaniżenie wyniku. Z tego powodu producenci odczynników powinni w instrukcji do zestawu podawać stopień interferencji GHBP dla fizjologicznych stężeń GH. Podobnie, powinny być znane reakcje krzyżowe pomiędzy przeciwciałem wychwytyującym a fragmentami GH, które mogą pojawić się w surowicy na skutek metabolizmu GH.

d) Wpływ przeciwciał wychwytyjących na oznaczenie GH

Różne formy GH dają znaczne reakcje krzyżowe z przeciwciałami wychwytyjącymi w różnych zestawach immunologicznych. Problem dotyczy zarówno przeciwciał poliklonalnych (znaczne reakcje krzyżowe), jak i monoklonalnych, które z kolei mogą rozpoznawać różne epitopy na izoformach GH. Duże różnice właściwości przeciwciał wychwytyjących w różnych zestawach immunochemicznych są także przyczyną nieporównywalności wyników oznaczeń GH. Najwyższe stężenia GH uzyskuje się w przypadku stosowania przeciwciał poliklonalnych, najniższe – monoklonalnych. Najlepszą zgodność wyników obserwuje się dla metod RIA z przeciwciałem poliklonalnym gdy reakcja immunochemiczna przeprowadzana jest w stanie równowagi. Obecne metody, w celu zwiększenia szybkości oznaczeń, są przeprowadzane bez osiągnięcia równowagi reakcji, co prowadzi do interferencji ze strony białek wiążących. Przeciwciała poliklonalne mają większe powinowactwo do antygeny w porównaniu do przeciwciał monoklonalnych, co zmniejsza interferencje z GHBP. Szczegółowe informacje na temat rodzaju przeciwciał i epitopów, przeciwko którym są skierowane, może być pomocna przy porównywaniu wyników GH uzyskanych różnymi metodami. Generalnie metoda powinna być swoista dla ludzkiego GH 22 kDa.

e) Czułość metod oznaczania hormonu wzrostu

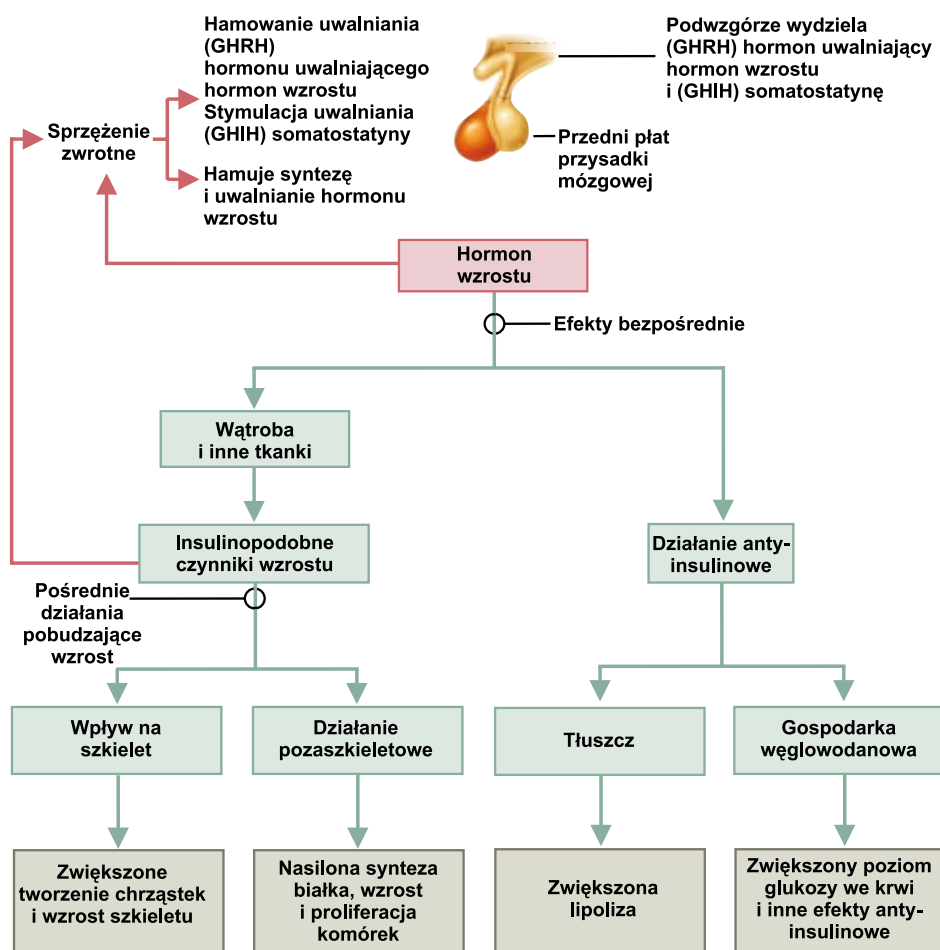
Początkowo GH mierzono metodami radioimmunologicznymi (RIA) z zastosowaniem przeciwciał poliklonalnych. Wyniki uzyskiwane przy stosowaniu różnych RIA były w miarę porównywalne, chociaż nie identyczne. Metody te jednak były za mało czułe, a podawana przez producentów granica wykrywalności w zakresie od 0.3 do 0.5 µg/L rzadko była osiągana w warunkach rutynowych. Obecnie do oznaczania GH stosuje się

ulepszone metody immunochemiczne kompetycyjne i niekompetycyjne z izotopowymi lub nieizotopowymi znacznikami, a dolna granica pomiaru podawana dla niektórych metod mieści się w zakresie od 0.001 do 0.002 $\mu\text{g/L}$. Ostatnio sugeruje się aby metoda osiągała dolną granicę pomiaru 0.05 $\mu\text{g/L}$ przy CV <20%. Jedną z najnowszych metod immunochemicznych (elektrochemiluminescence immunoassay, Roche Diagnostics) pozwala na oznaczanie GH 20 kDa i GH 22 kDa w surowicy krwi w zakresie 0.03–50,0 $\mu\text{g/L}$. Dzięki oznaczaniu obu form można uzyskać bardziej wiarygodne wyniki stężenia GH. Czułość metod jest niezbędna nie tylko do pomiaru bardzo niskich stężeń GH pomiędzy pulsami ale także dla pomiaru stężenia GH w teście hamującym z glukozą (optymalny nadir) u pacjentów z akromegalią. Jednakże pamiętać należy, że u osób zdrowych każda interpretacja niskich



Analizator cobas e 601

· system
immunochemiczny
przeznaczony
dla średnich i dużych
laboratoriów



Objaśnienia:

- ← - zwiększa, stymuluje
- - redukuje, hamuje
- - bodziec inicjujący
- - odpowiedź fizjologiczna
- - efekt



cobas® 6000

· zintegrowany system
biochemiczno-
immunochemiczny



Analizator cobas e 411

· system
immunochemiczny
przeznaczony
dla średnich i dużych
laboratoriów

stężeń GH wymaga uwzględniania wieku, płci, BMI i obwodu pasa. Te zależności GH od różnych czynników nie są, niestety, do końca znane w przypadku pacjentów z akromegalią.

WSPÓŁCZESNE METODY IMMUNOCHEMICZNE DO OZNACZANIA HORMONU WZROSTU

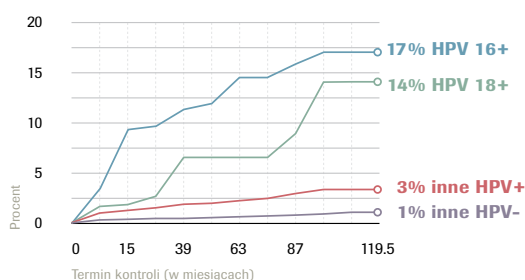
Obecnie stosowane metody immunochemiczne mierzą przede wszystkim formę GH 22 kDa, ale możliwe jest również oznaczenie „non-22 kDa” GH po wcześniejszej ekstrakcji tej formy z surowicy przy pomocy swoistego przeciwciała. Pozostały GH 22 kDa jest mierzony np. przy pomocy metody IRMA. Dostępne są także metody do bezpośredniego oznaczania GH 20 kDa. Choć nie ma klinicznych wskazań do pomiaru stężenia GH 20 kDa, oznaczanie tej formy może mieć znaczenie w medycynie sportowej u osób podejrzanych o stosowanie dopingu. Mierząc stężenie GH 20 kDa swoistym zestawem można rozróżnić endogenne GH od egzogenne GH, ponieważ podawana sportowcom egzogenna forma jest rekombinowanym GH 22 kDa. Egzogenne GH 22 kDa hamuje wydzielanie endogenne GH, w tym również formy 20 kDa. Możliwe jest także oznaczanie stężenia GH-V, ale ma to tylko znaczenie u kobiet w ciąży w badaniach naukowych.

Najlepszym rozwiązaniem byłaby dostępność metod swoistych dla każdej izoformy, usunięcie GHBP przed oznaczeniem i posiadanie kalibratorów dla każdej izoformy oraz dostępność metody referencyjnej dla GH. Na razie jednak na takie rozwiązanie trzeba jeszcze poczekać.

Piśmiennictwo dostępne w redakcji.

Genotypowanie typu 16 i typu 18 daje lekarzowi możliwość identyfikacji kobiet najbardziej zagrożonych rozwojem raka szyjki macicy

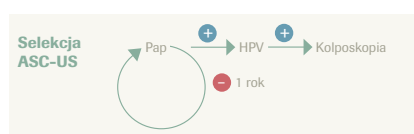
Skumulowana częstość wystąpienia >CIN3 w ciągu 10 lat dla HPV 16/18+ vs. inne typy wysokiego ryzyka
Zaadaptowane z Khan et al, 2005¹



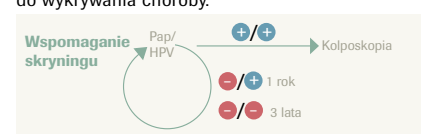
Badanie 20 514 kobiet na obecność genotypów HPV podczas rejestracji wskazało na zwiększone ryzyko raka szyjki macicy u kobiet zakażonych typem 16 i typem 18 w porównaniu do wszystkich pozostałych typów HPV.

Walidowane dla ASC-US i wspomagania badań przesiewowych

Amerykańskie Towarzystwo Kolposkopii i Patologii Szyjki Macicy (ASCCP) rekomenduje wykonanie testu DNA HPV u kobiet z wynikiem ASC-US w badaniu cytologicznym.



Badania przesiewowe wykorzystujące tylko cytologię (Pap[†]) nie identyfikują blisko połowy przypadków raka szyjki macicy. Dodanie testu DNA HPV z genotypowaniem 16/18 jako część rutynowych badań przesiewowych znacznie zwiększa zdolność do wykrywania choroby.



[†] Pap: Wizualna ocena komórek szyjki macicy mająca na celu wypatrzeć wskaźniki raka szyjki macicy lub warunków które mogą prowadzić do rozwoju raka.

¹ Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, et al. Elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. J Natl Cancer Inst. 2005;97:1072-1079.

Badania genotypów wirusa HPV

Nowe dane wskazują, że badanie genotypów 16 i 18 wirusa HPV pozwala wykryć zmiany przedrakowe w szyjce macicy, których nie wykrywa badanie cytologiczne metodą Papanicoulau (Pap).

1 na 10 kobiet w wieku 30 lat i starszych, biorących udział w badaniu ATHENA, u których rozpoznano zakażenie wirusem HPV (genotypem 16 lub 18) testem cobas® 4800 HPV Test, miała zmiany przedrakowe, choć wynik cytologii za pomocą rozmazu Pap był prawidłowy.

Badaniem w programie ATHENA objęto ponad 47 000 kobiet; jest to największe badanie przesiewowe, jakie kiedykolwiek wykonano w kierunku wczesnego diagnozowania raka szyjki macicy.

Wyniki badań uzyskane w ramach programu ATHENA (*Addressing THE Need for Advanced HPV Diagnostics*), prowadzonego w USA i obejmującego ponad 47 000 kobiet, wskazują na to, że badanie w kierunku wirusa HPV (dotyczy zwłaszcza genotypów 16 i 18) może skutecznie wykrywać stany przedrakowe u kobiet, u których wynik rozmazu Pap wskazał na brak objawów chorobowych. Wykazano, iż 1 na 10 kobiet w wieku 30 lat i starszych, biorących udział w badaniu ATHENA, u których rozpoznano zakażenie wirusem HPV (genotypem 16 lub 18) testem cobas® 4800 HPV, miała zmiany przedrakowe, choć rozmaz Pap był u niej prawidłowy. Dane te wskazują na to, jak bardzo ważna jest diagnostyka onkogennych genotypów HPV dla zwiększenia wiarygodności oceny ryzyka zachorowania na raka szyjki macicy. Dotyczy to zwłaszcza najbardziej onkogennych genotypów 16 i 18, co pozwala znieść ograniczenia badań cytologicznych wykonywanych metodą Pap, które nie dość precyzyjnie określają ryzyko zachorowania na raka szyjki macicy. Uzyskane wyniki badań zostały zaprezentowane przez Thomasa C. Wright'a Jr., doktora z Uniwersytetu w Kolumbii, na 26. Międzynarodowej Konferencji w Montrealu w Kanadzie.

„Dane uzyskane z badań prowadzonych w ramach projektu ATHENA wskazują na to, że kobiety zdiagnozowane jako zakażone wirusem HPV onkogennym, takim jak genotyp 16 i 18, powinny być poddawane dokładniejszym badaniom szyjki macicy poprzez kolposkopię” twierdzi dr Wright. „Badania przesiewowe na obecność wysoko onkogennych genotypów HPV są bardzo ważnym uzupełnieniem dla standardowych badań cytologicznych, a wykrywanie najbardziej onkogennych genotypów 16 i 18 powinno zostać włączone do panelu badań mających znaczenie prognostyczne dla kobiet w odniesieniu do występowania stanów przedrakowych lub raka szyjki macicy”. Wyniki badań uzyskane w programie ATHENA wykazały, że kobiety, u których przy użyciu testu cobas® 4800 HPV Test wykryto obecność wirusa HPV o genotypie 16 lub 18, a których wynik badania cytologicznego był prawidłowy, narażone są w podobnym stopniu na zachorowanie na raka szyjki macicy, jak kobiety, u których stwierdzono obecność któregośkolwiek z pozostałych 14 genotypów wysokiego ryzyka, a których wynik cytologii wskazywał na obecność atypowych komórek nabłonka płaskiego o nieznanym znaczeniu diagnostycznym (ASC-US, ang. *atypical squamous cells of undetermined significance*). Powyższy fakt skłania do twierdzenia, iż kobiety, u których wykryto zakażenie wirusem HPV o genotypie 16 lub 18, powinny natychmiast być poddane dalszym specjalistycznym badaniom, pomimo prawidłowego wyniku badania cytologicznego.

„ATHENA jest badaniem pokazującym, jak najnowocześniejsze narzędzia diagnostyczne wskazują na ograniczenia metod cytologicznych i kwestionują wartość badania Pap jako



**Wirus brodawczaka
ludzkiego HPV**



Analizator cobas x 480
· system
immunochemiczny
przeznaczony
dla średnich laboratoriów
klinicznych



Analizator cobas z 480

jedynego testu przesiewowego w kierunku raka szyjki macicy” twierdzi Daniel O’Day, Dyrektor Operacyjny Roche Diagnostics. „Gdyby więcej kobiet poddawało się badaniom na obecność genotypów wysokiego ryzyka HPV (w szczególności genotypów 16 i 18), w większej liczbie przypadków wczesne zmiany nowotworowe lub przednowotworowe mogłyby zostać szybko wykryte i leczone. Zapobiegłoby to progresji choroby nowotworowej i ocaliłoby życie wielu kobiet”.

O BADANIU KLINICZNYM ATHENA PROWADZONYM PRZEZ ROCHE DIAGNOSTICS

Badanie kliniczne ATHENA prowadzone przez firmę Roche z wykorzystaniem testu cobas® 4800 HPV Test jest największym w USA tego typu programem obejmującym ponad 47 000 kobiet. Badania zaprojektowano tak, by uzyskać odpowiedzi na aktualne, medyczne i naukowe, pytania o wartość wykonywania badań na obecność genotypów HPV wysokiego ryzyka jako testów przesiewowych w kierunku raka szyjki macicy, oraz by uzyskać kliniczne informacje na temat tego, które genotypy niosą ze sobą największe ryzyko zachorowania na raka szyjki macicy.

O ZESTAWIE COBAS® 4800 HPV TEST I SYSTEMIE COBAS® 4800 SYSTEM

Jak wykazano w badaniu klinicznym ATHENA, test cobas® 4800 HPV jest jedynym zastosowanym w badaniu przeprowadzonym na dużą skalę w USA, który posiada zdolność do jednoczesnego wykrywania 12 genotypów HPV wysokiego ryzyka (genotypy 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 i 68), których obecność raportowana jest jako wynik zbiorczy, jak również do wykrywania genotypów 16 i 18 (wyniki indywidualne dla każdego z tych genotypów).

Firma Roche wprowadziła test cobas® 4800 HPV Test posiadający znak CE w roku 2009. Pod koniec kwietnia br. test uzyskał również aprobatę FDA.

O WIRUSIE BRODAWCZAKA LUDZKIEGO (HPV) I RAKU SZYJKI MACICY

Przewlekła infekcja wirusem HPV jest najważniejszą przyczyną zachorowań na raka szyjki macicy, u ponad 99% przypadków raka szyjki macicy na całym świecie stwierdza się infekcję wirusem HPV. Spośród ponad 118 różnych genotypów HPV, 13–16 genotypów klasyfikuje się jako genotypy wysokiego ryzyka w powstawaniu raka szyjki macicy i stanów przedrakowych, z czego genotypy 16 i 18 zakwalifikowane zostały jako najbardziej onkogenne, powodujące ponad 70% przypadków raka szyjki macicy. Badanie DNA jest bardzo czułą i nieinwazyjną metodą wykrywania zakażenia wirusem HPV.

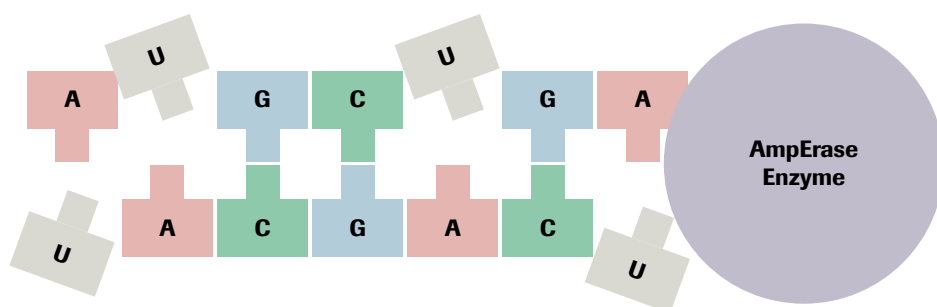
*Tłumaczenie tekstu ze źródeł własnych
Roche Diagnostics*

Integralność wyników

Zastrzeżony system enzymatyczny AmpErase niszczy wszystkie amplikony wygenerowane w poprzednich cyklach pracy, co redukuje ryzyko zanieczyszczenia krzyżowego.

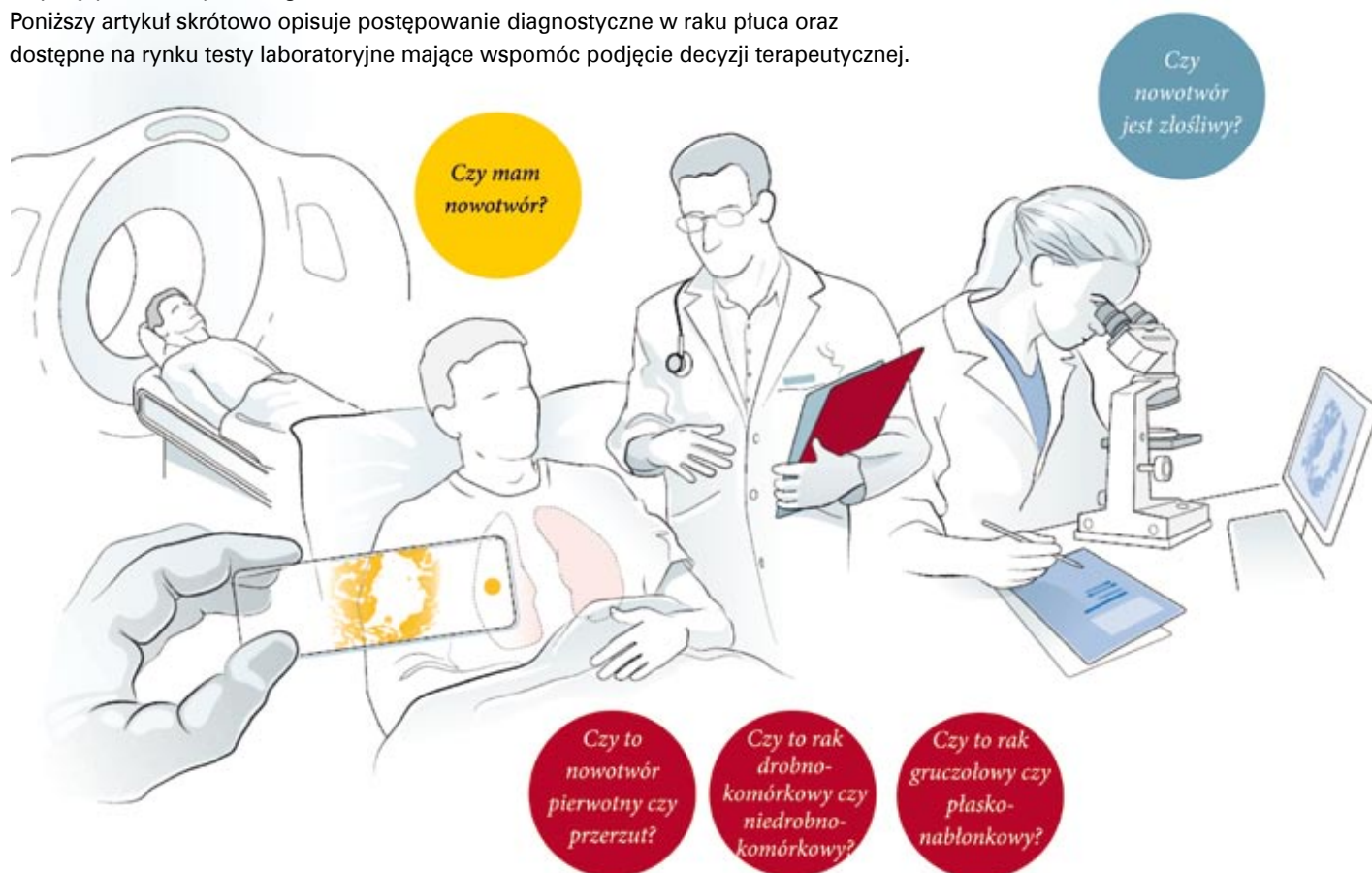
Kontrola wewnętrzna (b – globina z komórki) wykorzystywana jest podczas całego procesu wykonywania oznaczenia, począwszy od przygotowywania próbki aż po etapy amplifikacji i detekcji, w celu zminimalizowania ryzyka uzyskania wyników fałszywie ujemnych.

Nieodpowiednie pobranie próbki spowoduje zaraportowanie wyniku jako nieważny.

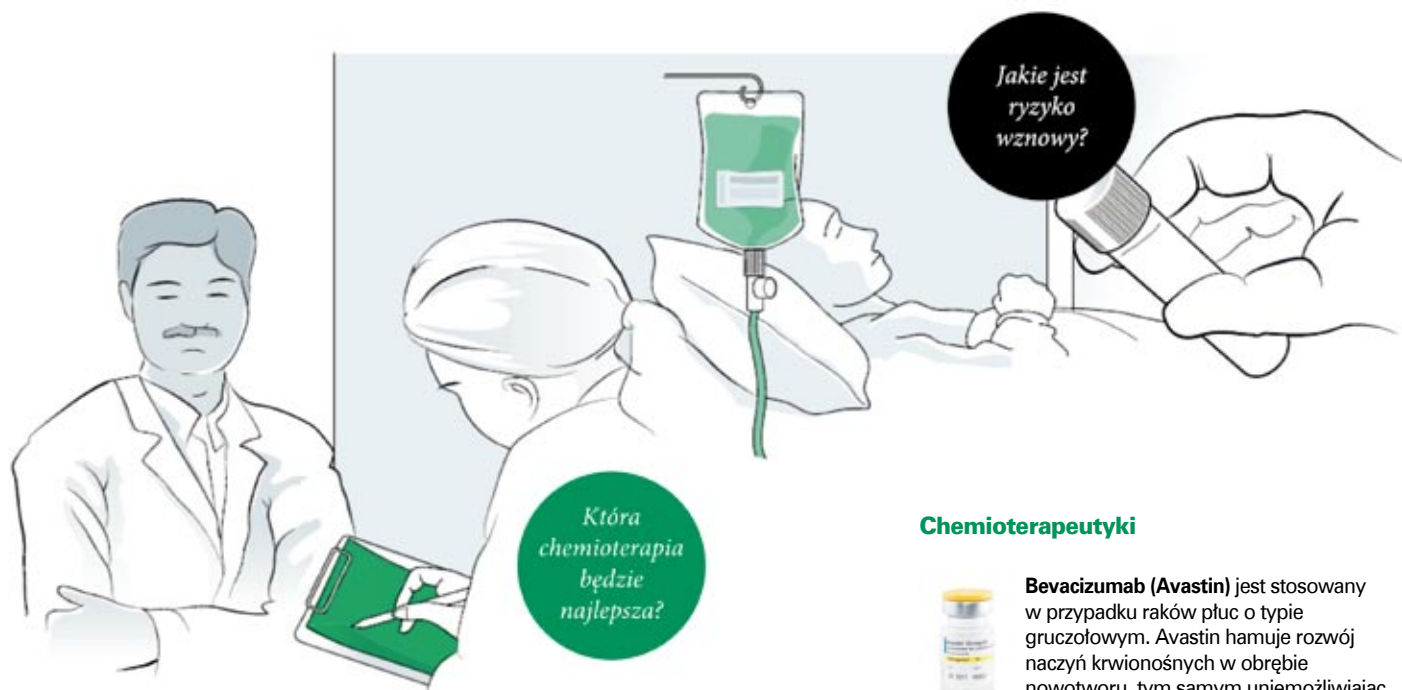


Postępowanie diagnostyczne w raku płuc

Rak niedrobnokomórkowy płuca (NSCLC) jest obecnie najczęstszą przyczyną zgonów wśród pacjentów onkologicznych na świecie. Zdecydowana większość przypadków (60–70%) jest diagnozowana zbyt późno, kiedy choroba ma charakter zaawansowany. Postać gruczolowa nowotworu występuje najczęściej, również wśród pacjentów niepalących, u których zdiagnozowano nowotwór. Poniższy artykuł skrótkowo opisuje postępowanie diagnostyczne w raku płuca oraz dostępne na rynku testy laboratoryjne mające wspomóc podjęcie decyzji terapeutycznej.



Pierwsze kroki diagnostyczne	Wstępna diagnostyka histopatologiczna	Szczegółowa diagnostyka histopatologiczna	Rokowania
Diagnozowanie nowotworu płuca jest procesem złożonym i wieloetapowym. Na wstępnym etapie wykorzystywana jest diagnostyka obrazowa. Dalszym krokiem jest uzyskanie materiału do badań histopatologicznych.	Tkanka uzyskana podczas biopsji lub komórki pobrane podczas bronchoskopii są oceniane przez patomorfologa w celu potwierdzenia obecności komórek nowotworowych. Każdy próbek jest najpierw barwiona hematoksyliną i eozyną w celu wstępnej oceny morfologicznej pobranej tkanki. W 80% przypadków uzyskuje się wynik ujemny. Pozostałe 20% przypadków kierowanych jest do dalszej weryfikacji.	Barwienia immunohistochemiczne i testy oparte na hybrydyzacji in situ, wykonywane przy pomocy aparatów Benchmark pozwalają ocenić typ histologiczny raka.	Patomorfolog ocenia tkankę nowotworową. Brany pod uwagę jest stopień zróżnicowania komórek. Ostateczna ocena zaawansowania procesu nowotworowego jest wynikiem analizy histopatologicznej, obrazu RTG, obrazów uzyskanych z tomografii komputerowej (CT). Ocena zaawansowania opiera się na systemie TNM, w którym uwzględnia się rozmiar guza, ewentualną obecność zmian w węzłach chłonnych. Ponieważ ocena przeprowadzana przez histopatologa jest subiektywna, stąd potrzeba opracowania większej liczby pomocniczych testów molekularnych wspomagających proces diagnostyczny i rokowniczy.
	 Barwienie hematoksyliną i eozyną	 Barwienie immunohistochemiczne	



Markery diagnostyczne

EGFR

Mutacja lub jej brak w obrębie genu EGFR (receptora naskórkowego czynnika wzrostu) ma duże znaczenie w raku płuca. Nowotwory charakteryzujące się zwiększoną ekspresją EGFR mają tendencję do szybszego rozwoju, większą skłonność do powstawania przerzutów oraz rzadziej odpowiadają na standardową chemioterapię.

Testy diagnostyczne firmy Roche

PCR (w przygotowaniu)

Roche i firma OSI Pharmaceuticals współpracują przy tworzeniu testu diagnostycznego wykrywającego mutacje w obrębie genu EGFR, predysponujące do lepszej odpowiedzi na zastosowany w terapii erlotynib (Tarceva). Pacjenci z zaawansowaną postacią NSCLC, i wykrytymi mutacjami będą otrzymywać Tarcewę jako lek pierwszego rzutu. Rak niedrobnokomórkowy bez mutacji aktywujących receptor EGF lub bez danych o występowaniu mutacji, uzyskają korzyści z terapii lekiem w kolejnych zestawach chemioterapii.

IHC, ISH

W ofercie Roche znajdują się zarówno przeciwciała monoklonalne, jak i odczynniki do oznaczania statusu genu EGFR przy pomocy hybrydyzacji in situ.

Chemioterapeutyki



Bevacizumab (Avastin) jest stosowany w przypadku raków płuca o typie gruczolowym. Avastin hamuje rozwój naczyń krwionośnych w obrębie nowotworu, tym samym uniemożliwiając dopływ substancji odżywczych i dalszy rozrost patologicznej tkanki.



Erlotinib (Tarceva) jest inhibitorem kinazy tyrozynowej dla EGFR. Jest stosowany jako lek drugiego lub trzeciego wyboru w przypadkach zaawansowanego NSCLC, w którym potwierdzono mutację w obrębie genu EGFR. W roku 2011 spodziewane jest rozszerzenie stosowania Tarcevy jako leku pierwszej linii w NSCLC.

GA201/RG7160 (w przygotowaniu)

Firma Roche prowadzi zaawansowane badania nad wykorzystaniem monoklonalnego przeciwciała anti-EGFR o wzmocnionej cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciała (ADCC) w terapii NSCLC.

MET

Met to receptor czynnika wzrostu hepatocytów, odgrywający ważną rolę we wzroście i tworzeniu przerzutów w wielu typach nowotworów, w tym w niedrobnokomórkowym raku płuca.

Met (SP44) (w przygotowaniu)

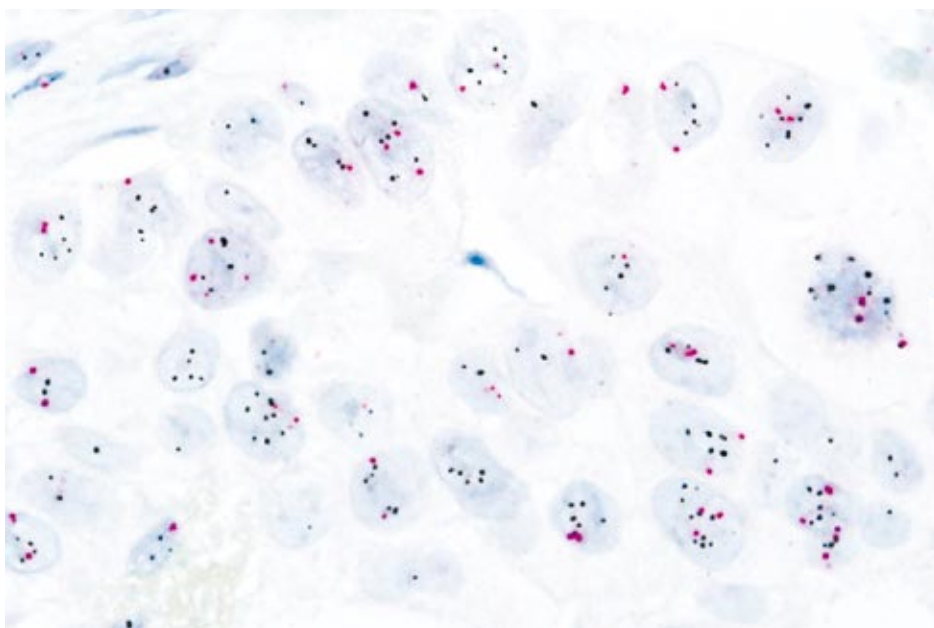
W kooperacji z Roche Pharma przygotowywane jest monoklonalne przeciwciała Met (klon SP44) służące w przyszłości do wykrywania nadmiernej ekspresji białka metodami immunohistochemicznymi (podczas badań klinicznych nad MetMab). Wśród testów diagnostycznych Roche oferuje również odczynniki do oznaczania statusu genu Met metodą hybrydyzacji in situ.

MetMab/RG3638 (w przygotowaniu)

Wstępne wyniki otrzymane z II fazy badań klinicznych, pokazują, że podawanie MetMab/RG3638 skojarzonego z Tarcewą w leczeniu drugiego lub trzeciego rzutu zwiększa przeżywalność pacjentów z rakiem niedrobnokomórkowym płuca z obecnością przerzutów.

PI3K	Test wykrywający mutacje w genie PIK3CA (w przygotowaniu)	GDC-0941/RG7321 (w przygotowaniu)
Gen kinazy PI3K jest onkogenem często podlegającym mutacjom w różnych typach nowotworów, regulującym proces wzrostu komórki.	Test oparty na technice ilościowej reakcji PCR wykrywający mutacje w obrębie onkogenu PI3K, będzie wykonywany przy wykorzystaniu aparatu cobas 4800.	GDC-0941/RG7321 to inhibitor kinazy PI3K. Wstępne etapy badań wykazały możliwość podawania leku doustnie oraz działania cząsteczki na inhibitor MEK (GCD-0973).

Przewidywanie skuteczności terapii			Monitorowanie po leczeniu
Szlaki komórkowe Zidentyfikowano wiele genów mających wpływ na rozwój NSCLC. Niektóre z nich to onkogeny mające szczególne tendencje do mutacji punktowych powodujących rozrost nowotworowy. W innych przypadkach u podstaw procesu nowotworzenia leży zwiększenie liczby kopii danego genu (amplifikacja). Trzecią opcją jest fuzja genów. Obecnie, firma Roche jest w trakcie badań szlaków komórkowych odpowiedzialnych za regulację wielu cząsteczek mających udział w powstawaniu NSCLC, m.in.: ALK, IGFR, KRAS. W przypadku EGFR, MET, PI3K badania zarówno nad testami diagnostycznymi, jak i lekami są bardzo zaawansowane.	Testy laboratoryjne Badania laboratoryjne najczęściej mają pomóc klinicystom w ocenie stopnia zaawansowania nowotworu oraz pomóc w dobraniu najskuteczniejszej opcji leczenia. Firma Roche w swojej ofercie posiada zarówno odczynniki do badań histopatologicznych (barwienia immunohistochemiczne, hybrydyzacja in situ) oraz molekularnych (PCR).	Opcje leczenia W przypadku leczenia nowotworów płuc leki takie, jak Avastin czy Tarceva są standardem obok innych uznanych chemoterapeutyków oraz metod chirurgicznych czy radioterapii. Dział farmaceutyczny firmy Roche współpracuje ściśle z Roche Diagnostics podczas badań nad nowymi, aktywnymi cząsteczkami, aby jednocześnie dostarczyć klinicystom narzędzia diagnostyczne w postaci testów laboratoryjnych oraz nowych, skutecznych leków.	W bogatym portfolio badań wykonywanych z surowicy krwi znajduje się test wykrywający antygen karcinoembrionalny (CEA), który jest podstawowym markerem do monitorowania ewentualnej wznowy nowotworu, który można oznaczyć na analizatorach cobas firmy Roche.



Podwójna hybrydyzacja in situ w kierunku EGFR

Medycyna personalizowana

Dr Agnieszka Brzezińska, Dyrektor ds. Komunikacji i Rozwoju, Roche Polska

Medycynę personalizowaną (PM) (*personalized medicine, personalized healthcare*) w odróżnieniu od medycyny „prób i błędów”, można zdefiniować krótko – „**leczenie odpowiednim lekiem odpowiedniej osoby**”. W takim ujęciu odchodzi w przeszłość pojęcie standardów terapeutycznych, obejmujących całe populacje chorych. Od około 10 lat medycyna personalizowana staje się coraz bardziej realna. Szybki rozwój biologii molekularnej w ostatnich dwóch dekadach oraz nowe możliwości technologiczne umożliwiają zrozumienie podłoża biologicznego chorób. Istotą tych nowości jest rozwój metod diagnostycznych umożliwiających ocenę indywidualnych cech chorego na poziomie molekularnym nie tylko w warunkach eksperymentalnych, ale także w warunkach codziennej praktyki klinicznej oraz tworzenie terapii ukierunkowanych na konkretne mechanizmy molekularne, w większym stopniu dostosowanych do potrzeb pacjentów.

Badania genomu człowieka oraz osiągnięcia epigenetyki, proteomiki i metabolomiki pomogły zidentyfikować szereg molekularnych biomarkerów, wskazujących na zmianę w ekspresji lub postaci białka, co koreluje z ryzykiem zachorowania lub progresji choroby albo podatnością schorzenia na leczenie danym lekiem. Doprowadziło to do rozwoju szeregu badań przesiewowych oraz prognostycznych, jak również ułatwiło przewidywanie i monitorowanie reakcji na leki.

Eksperci określają takie postępowanie pojęciem „stratyfikacji terapii”. **Wbrew dotychczasowej zasadzie „One size fits all” (jeden rozmiar dla wszystkich) chodzi o to, aby decyzje terapeutyczne rozpoczynać od identyfikacji pacjentów, w przypadku których istnieje największe prawdopodobieństwo odniesienia korzyści z leczenia lub tych, którzy najpewniej na lek nie zareagują. Dzięki takiemu podejściu zwiększa się ogólna skuteczność terapii oraz bezpieczeństwo leku (choćby poprzez unikanie działań niepożądanych).**

❶ Decyzje terapeutyczne powinny być podejmowane na podstawie właściwej identyfikacji pacjentów.

❷ HER 2 – jeden z pierwszych przykładów realizacji medycyny spersonalizowanej.



W ostatnich 10 latach pojawiły się leki, których zapisy rejestracyjne wskazują na konieczność oznaczenia biomarkera charakterystycznego dla subpopulacji pacjentów z danym schorzeniem. Co więcej, wiele kolejnych leków czeka w kolejce na podobne rejestracje. Oto kilka przykładów biomarkerów, które powinny mieć wpływ na podejmowanie decyzji terapeutycznych:

Białko HER2 – testy diagnostyczne oceniające jego ekspresję lub liczbę kopii genu kodującego to białko są już od dłuższego czasu stosowane przez lekarzy pomagając w podjęciu decyzji terapeutycznej w przypadku pacjentek chorych na raka piersi. Stan genu KRAS – białko KRAS stanowi istotny element szlaku sygnałowego inicjowanego przez receptor EGFR. Szlak ten odgrywa ważną rolę w onkogenezie wielu nowotworów, m.in. płuca, jelita grubego, trzustki. Dane z badań pokazują, że pacjenci z prawidłowym genem kodującym białko KRAS dużo lepiej odpowiadają na leczenie anty-EGFR niż pacjenci z genem zmutowanym.

Mutacje EGFR – mutacje w obrębie genu kodującego receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu korelują z odpowiedzią na leczenie pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca za pomocą inhibitorów kinazy tyrozynowej. Najnowsze doniesienia każą przypuszczać, że skrining genetyczny takich pacjentów w kierunku mutacji EGFR może pomóc lekarzom w identyfikacji tych chorych, którzy najbardziej skorzystają z leczenia I linii tymi lekami.

Gen BRAF – mutacje w jego obrębie występują u ponad 50% chorych na czerniaka skóry. Inhibitor białka będącego produktem tego zmutowanego genu może wkrótce stać się przełomem w leczeniu tego źle rokującego nowotworu.

Pomiar wirerii oraz genotyp wirusa determinują rodzaj terapii w przypadku chorych na wirusowe zapalenie wątroby typu C.

Zarówno wyzwania, jak i oczekiwania w zakresie medycyny personalizowanej, są bardzo duże. Roche, jako nowoczesna firma diagnostyczna i farmaceutyczna z ogromnym doświadczeniem w dziedzinie biologii molekularnej jest predestynowana do tego, aby być liderem rozwoju medycyny personalizowanej. Roche jest pierwszą firmą na rynku medycznym, która skoncentrowała swoje procesy badawcze i rozwojowe na zagadnieniach personalizacji terapii. Obecnie ścisła współpraca pomiędzy działami: diagnostycznym i farmaceutycznym firmy ma miejsce na wszystkich etapach rozwoju nowego leku. Koncepcja stratyfikacji terapii pomaga rozwijać nowe systemy diagnostyczne równoległe z pracami badawczymi nad substancją czynną przyszłego leku. **Wprowadzanie w życie koncepcji medycyny spersonalizowanej, zwłaszcza w obliczu tak szybkiego postępu w tej dziedzinie, to również wielkie wyzwanie dla laboratoriów, będących kluczową częścią składową dla prawidłowego działania całego procesu leczniczego.** Wyzwania te dotyczą zarówno zagadnień związanych ze zwiększającą się liczbą oznaczeń diagnostycznych, jak i ich jakością, ponieważ od niej będzie coraz częściej zależało bezpieczeństwo pacjenta oraz skuteczność zastosowanego leczenia.



**Roche jest liderem w dziedzinie biologii molekularnej.
Nasze osiągnięcia umożliwiają nieustający postęp
w nauce, a nauka to nieskończoność możliwości.**

- Najwyższa jakość w nauce to warunek postępu, dlatego pracujemy z najlepszymi naukowcami na świecie.
- W ciągu ostatnich lat zgłosiliśmy imponującą liczbę patentów.
- Jesteśmy światowym liderem w dziedzinie biotechnologii, diagnostyki *in vitro* oraz diagnostyki onkologicznej.
- Dzięki bliskiej współpracy działów rozwoju leków i diagnostyki, z powodzeniem wdrażamy koncepcję medycyny personalizowanej.
- Od ponad 110 lat umożliwiamy pacjentom i lekarzom korzystanie z najnowszych osiągnięć w medycynie.
- W dwóch kolejnych latach (2009 r. i 2010 r.) uznano nas światowym liderem zrównoważonego rozwoju w sektorze ochrony zdrowia. Otrzymaliśmy tytuł Super Lidera w indeksie giełdowym Dow Jones Sustainability World Index (DJSI).

Więcej informacji o działalności Roche
znajduje się na stronie www.roche.pl



We Innovate Healthcare



COBAS i LIFE NEEDS ANSWERS są
znakami towarowymi należącymi do Roche
©2010 Roche Diagnostics

Nasz adres:
Roche Diagnostics Polska Sp. z o.o.
ul. Wybrzeże Gdyńskie 6B
01-531 Warszawa

centrala: tel. 0-22/481 55 55, 56
faks 0-22/481 55 99
call center: tel. 0-22/481 54 54
e-mail: dia.callcenterpl@roche.com

obsługa klienta: tel. 0-22/481 54 00-05
faks 0-22/481 55 96
e-mail: polska.diagnostics@roche.com
internet: www.roche.pl

Opracowanie techniczne: Elżbieta Czarnacka
DTP: Iwona Domagała-Pławny
Przygotowanie do druku i druk:
AR-W Arkadiusz Grzegorzczak, www.grzeg.com.pl