

LABFORUM

nr 68



Szanowni Państwo,

jest mi niezmiernie miło, że mogę przedstawić się Państwu jako nowy Dyrektor Generalny spółki Roche Diagnostics Polska. Ponieważ pełnię tę funkcję dopiero od 1 marca br. – nie miałem jeszcze zbyt wielu okazji, aby poznać przedstawicieli środowiska polskich diagnostów laboratoryjnych osobiście. Będę starał się jak najczęściej odwiedzać Państwa w Waszych placówkach służby zdrowia, spotykać się z Państwem na konferencjach i sympozjach tak, aby jak najszybciej i jak najlepiej zrozumieć potrzeby polskiej diagnostyki laboratoryjnej, jej osiągnięcia i wyzwania, przed którymi stoi. Zależy mi bowiem bardzo na tym, aby być blisko Państwa, uczyć się i czerpać z Państwa doświadczeń, rozmawiać i poznawać różne punkty widzenia. Wierzę, że taka wspólna debata jest najskuteczniejszym sposobem na wdrażanie zmian, nowych rozwiązań i kształtowania oblicza diagnostyki laboratoryjnej w Polsce.

Tymczasem, zanim się poznamy, proszę mi pozwolić przedstawić się Państwu za pośrednictwem naszego kwartalnika LabForum. Urodziłem się i wychowałem w Barcelonie, moi rodzice są Niemcami, jestem doktorem chemii. Doświadczenie zawodowe zdobywałem w różnych firmach farmaceutycznych w wielu krajach, a przez ostatnie 8 lat pracowałem dla Roche w Afryce, USA i Azji. Przeprowadziłem się do Polski z Singapuru i od razu polubiłem to miejsce. Mimo siarczystego mrozu, który był dość szokujący dla przybysza z tropików, odbieram Polskę jako kraj pełen ciepła, ze względu na serdeczność z jaką mnie powitano i z jaką nadal spotykam się na każdym kroku. Uwielbiam polskie pieczywo, pierogi i żurek. Intensywnie uczę się języka polskiego, aby móc w pełni uczestniczyć w życiu Polaków, lepiej poznać osoby, z którymi współpracuję na co dzień i kulturę kraju, w którym wraz z rodziną, spędzę kilka najbliższych lat.

Doskonale znają Państwo firmę, którą mam zaszczyt od niedawna kierować. Roche Diagnostics jest liderem na rynku od wielu lat. Jesteśmy obecni w niemal każdym szpitalu w kraju, dostarczamy coraz nowocześniejsze analizatory i testy diagnostyczne, dzięki czemu w Polsce wykonuje się obecnie niemal 200 milionów badań rocznie przy użyciu naszej aparatury. Z jednej strony odczuwam z tego powodu dumę, z drugiej zaś wiem jak duża ciężka na nas odpowiedzialność. Prawidłowa diagnoza pomaga wszak osiągnąć największe korzyści terapeutyczne dla pacjentów i jednocześnie zmniejsza całkowite koszty opieki zdrowotnej.

Wraz z ponad 230 pracownikami Roche Diagnostics Polska, dla których, podobnie jak dla mnie, praca na rzecz pacjentów jest życiową pasją, będę wspierał rozwój nowoczesnych rozwiązań w diagnostyce laboratoryjnej, aby każdemu polskiemu pacjentowi zapewnić dostęp do najlepszych testów diagnostycznych, a w konsekwencji do odpowiedniej terapii i możliwie wysokiej jakości życia. Jestem przekonany, że dzieląc Państwo to podejsie, dlatego z niecierpliwością czekam na pierwsze spotkania i rozmowy z Państwem.



Do zobaczenia już wkrótce!

Z wyrazami szacunku

Ralf Halbach

Dyrektor Generalny Roche Diagnostics Polska Sp. z o.o

Spis Treści

<i>Diagnostyka zakażenia wirusem cytomegalii - doświadczenia własne</i>	3
<i>Miejsce markerów zaburzonej angiogenezy (sFlt-1, PlGF) we współczesnej diagnostyce preeklampsji</i>	11
<i>Biomarkery w diagnostyce raka płuc - nowe perspektywy</i>	14
<i>Ślina - nowe perspektywy oznaczeń biomarkerów w diagnostyce medycznej</i>	17

Piśmiennictwo dostępne w redakcji

Diagnostyka zakażenia wirusem cytomegalii

- doświadczenia własne

Dr n. farm. Monika Jabłonowska, Kierownik Medycznego Laboratorium Analitycznego Szpitala Klinicznego im. Ks. Anny Mazowieckiej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w Warszawie, wcześniej Starszy Asystent, Centralne Laboratorium Analityczne, SPZOZ Wojewódzki Szpital Zakaźny w Warszawie.

Zakażenia wewnątrzmaciczne, określane w nomenklaturze międzynarodowej jako chorioamnionitis, amnionitis, intraamniotic infection, intrauterine infection to niewątpliwie obszerne zagadnienie, często sprawiające trudności już na etapie definiowania tego procesu.

Niemniej określenie zakażenia wewnątrzmaciczne odnosi się do zakażenia, które występuje w okresie ciąży i może stanowić szczególne zagrożenie nie tylko dla płodu, ale również dla zdrowia matki. Oddziaływanie zakażenia matki na płód lub noworodka zależy, oprócz takich czynników jak natura drobnoustroju (intensywność inwazji, wirulencja szczepu) czy patogenoza zakażenia, od wielu innych, złożonych uwarunkowań:

- okresu ciąży, w którym doszło do zakażenia;
- stopnia rozwoju łożyska (przepuszczalność łożyska zwiększa się w miarę rozwoju ciąży);
- sprawności odpowiedzi immunologicznej matki i płodu;
- czasu wykrycia zakażenia i podjęcia leczenia.

Mikroorganizmy mogą docierać do jamy macicy:

- drogą migracji z jamy brzusznej poprzez jajowody: przez ciągłość (zakażenia bakteryjne);
- drogą krwionośną poprzez łożysko (kiła, listerioza, paciorkowce grupy B i inne bakterie, CMV, parwowirus B19, HCV, toksoplazmoza, HPV);
- drogą wstępującą z pochwy przez szyjkę macicy: (BV, vaginitis bacterialis - zakażenia bakteryjne, rzeżączka, chłamydie, paciorkowce grupy B i inne bakterie, mikoplazmy, drożdżaki);
- drogą śródporodową (rzeżączka, chłamydie, CMV, HBV, HPV, HSV, drożdżaki, zakażenia bakteryjne).

Zakażenia wewnątrzmaciczne, których następstwem są wrodzone choroby płodów i noworodków cechują pewne podobieństwa: nierzadko przebiegają bezobjawowo, mijają często nierozpoznane, oraz wymagają przesiewowych badań serologicznych dla rozpoznania ryzyka wystąpienia podczas ciąży. Choroby wrodzone i uszkodzenia u dzieci, nie zawsze są wykrywalne bezpośrednio po porodzie, często ujawniają się później, w postaci dysfunkcji ośrodkowego układu nerwowego oraz innych ważnych dla życia narządów, w szczególności narządu wzroku i słuchu.

Zgodnie z rozporządzeniem ministra zdrowia z dn.23.09.2010r (www.mz.gov.pl/wwwfiles/ma_struktura/docs/zal_opiek_24092010.pdf) w sprawie standardów postępowania oraz procedur medycznych z zakresu opieki okołoporodowej sprawowanej nad kobietą w okresie ciąży, fizjologicznego porodu, porodu oraz opieki nad noworodkiem, wśród świadczeń zdrowotnych znalazły się badania diagnostyczne w tym m.in. w kierunku toksoplazmozy, różyczki: do 10 t.c., u kobiet z ujemnym wynikiem w I trymestrze - badanie w kierunku toksoplazmozy: 21-26 t.c. W większości krajów, w tym w Polsce, nie prowadzi się rutynowych badań w kierunku CMV u kobiet ciężarnych. Taką decyzję argumentuje się następująco:

- istnienie udokumentowanej odporności w postaci obecności przeciwciał anti-CMV IgG nie wyklucza możliwości zakażenia wrodzonego;
- zakażenie wewnątrzmaciczne nie zawsze prowadzi do wystąpienia zakażenia objawowego i późniejszych następstw u dziecka;
- nie ma ustalonego postępowania leczniczego w stosunku do płodu;
- badania rutynowe mogą wywoływać niepotrzebny niepokój u ciężarnej, szczególnie jeśli są wykonywane bez zapewnienia odpowiedniej porady dotyczącej interpretacji wyniku;
- koszty badań rutynowych są wysokie i nieopłacalne w obliczu braku skutecznej interwencji terapeutycznej.

Logicznie uzasadniona decyzja o wykluczeniu z rutynowych badań oznaczeń w kierunku CMV może być jednak niekorzystna w skutkach. Po pierwsze może być jedną z przyczyn obniżenia świadomości zagrożeń jakie stwarza CMV u kobiet ciężarnych, po drugie skutki takiego postępowania mogą mieć nie tylko konsekwencje medyczne, ale także ekonomiczne, biorąc pod uwagę długotrwałe leczenie i opiekę nad osobami ze znacznym stopniem niepełnosprawności.

Podsumowując, pomimo istnienia regulacji prawnych i standardów opieki nad kobietą ciężarną, w dalszym ciągu nie obserwuje się zadowalającego wzrostu liczby badań zlecanych w kierunku diagnostyki zakażeń wewnątrzmacicznych. Ponadto, należy podkreślić, iż statystyka w zakresie częstości występowania tych chorób w Polsce jest wysoce niedoszacowana.

Wirus cytomegalii (CMV – cytomegalovirus)

CMV jest wirusem z grupy DNA należącym do rodziny Herpesviridae opisanym na początku XX wieku pod nazwą wirusowe schorzenie gruczołów ślinowych lub choroba wtrętowa. Do rodziny tej należą także takie patogeny jak: Herpes Simplex typu 1 i 2, wirus ospy wietrznej i półpaśca (Varicella zoster) oraz wirus Epsteina i Barr. Genom CMV stanowi podwójna nić liniowego DNA o długości 124-235 kbp, związana z kapsydem o średnicy 100-110 nm. Kapsyd składa się ze 162 podjednostek ułożonych w symetrii ikosaedralnej (kształt dwudziestościanu). Nukleokapsyd otoczony jest warstwą białek, składających się na tegument, oraz fosfolipidową osłonką, w której zakotwiczone są białka powierzchniowe tworzące wypustki. Możliwości kodujące genomu CMV określa się na ponad 200 białek, stąd też wirus ten jest jednym z najbardziej złożonych wirusów. Najistotniejszymi, z punktu widzenia reakcji odpornościowych białkami CMV są te, których antygeny stymulują odpowiedź ze strony:

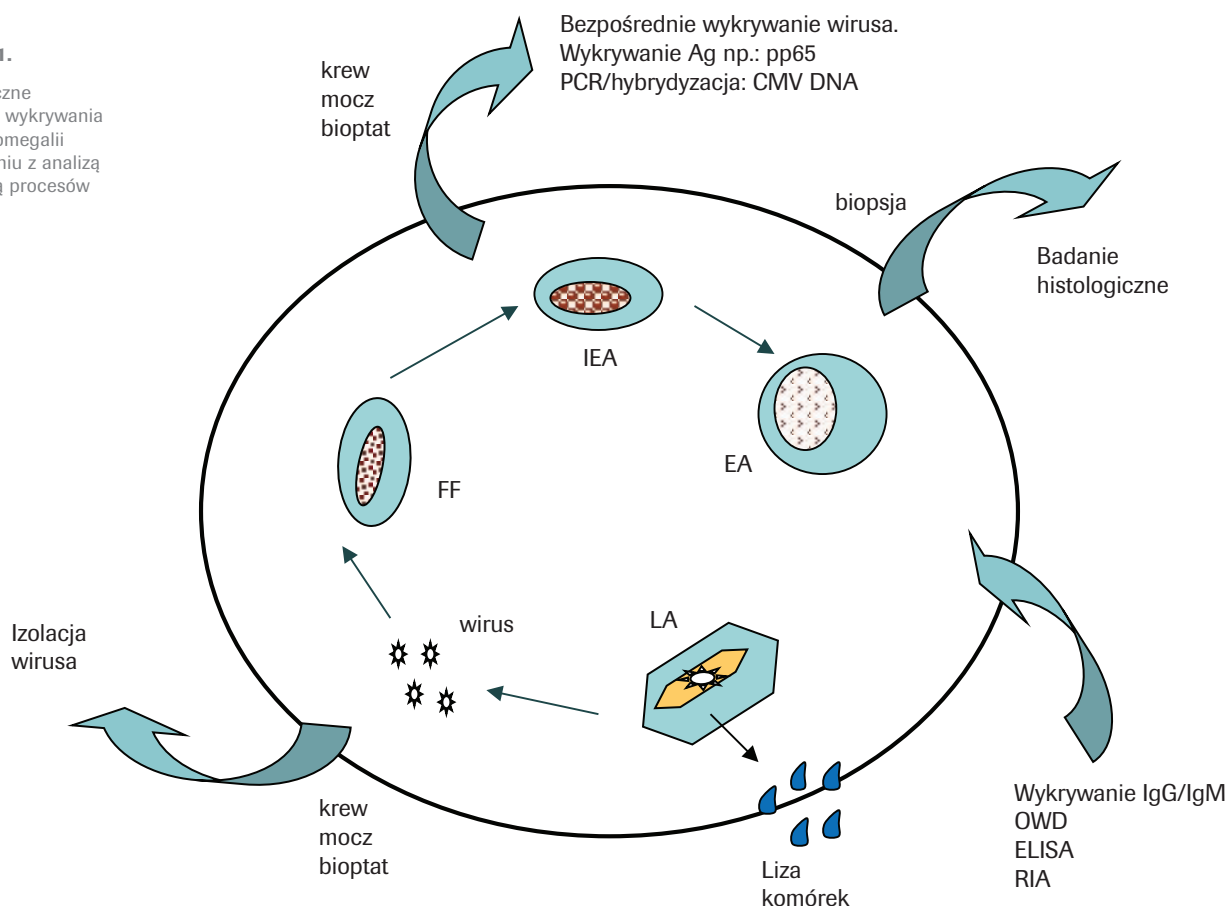
- przeciwciał neutralizujących – są to glikoproteiny: B (gB, gpUL55), H (gH, gpUL75), kompleks gN-gM (gpUL73-gpUL100);
- limfocytów cytotoksycznych – pp65 (ppUL83), IE1 (ppUL123), glikoproteiny GB i gH; oraz limfocytów pomocniczych – pp65, IE1, glikoproteiny gB i gH.

Replikacja wirusa cytomegalii przebiega według schematu typowego dla wirusów o dwuniciowym DNA. Czas pełnego cyklu replikacyjnego wynosi około 96 godzin. CMV powszechnie uważany jest za wirus wolno replikujący się. Proces replikacyjny rozpoczyna się przyłączeniem, fuzją a następnie penetracją do wnętrza komórki gospodarza. Dobrze poznanymi receptorami komórkowymi biorącymi udział w pierwszej fazie zakażenia jest EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), oraz PDGF

(Platelet-derived Growth Factor). Określenie, który z nich pełni kluczową rolę w procesie wnikania wirusa do komórki ma duże znaczenie dla badań związanych z poszukiwaniem skutecznych terapii przeciwwirusowych. Najważniejszym wirusowym białkiem receptorem jest glikoproteina powierzchniowa gB. Synteza wirusa w komórkach gospodarza przebiega kaskadowo w 3 stadiach: bezpośrednio-wczesna (IE, Immediately-Early), wczesna (E, Early) i późna (L, Late). Geny, produkty genów i procesy replikacji klasyfikujemy zależnie od fazy, np. wiadomo już, że transkrypcja dwóch najistotniejszych genów IE72, IE86 we wczesnej fazie IE odgrywa kluczową rolę w kontrolowaniu ekspresji genów wirusa CMV w komórce gospodarza. Znajomość kolejności aktywacji odpowiednich grup genów, ich produktów jest szczególnie ważna dla nowoczesnych metod diagnostycznych, gdzie poszukujemy już nie tylko ważnych białek antygenowych, ale i kwasów nukleinowych [Schemat 1].

Schemat 1.

Diagnostyczne możliwości wykrywania wirusa cytomegalii w powiązaniu z analizą genetyczną procesów replikacji.



Na podstawie: Małafiej E. Bad.Diag. 2005, 11:61

Proces replikacji kończy się osadzeniem w osłonce białek powierzchniowych i opuszczeniem komórki, co równoznaczne jest z jej lizą. CMV ma zdolność zakażenia komórek śródbłonna, nabłonka, monocytów, makrofagów, komórek mięśniówki gładkiej i granulocytów. CMV, tak jak inne herpeswirusy, ma zdolność do ustanawiania długotrwałej latencji. Miejscem latencji wirusa są monocyty, makrofagi oraz komórki progenitorowe o fenotypie CD33+ CD34+. Ze stanu latencji CMV może okresowo ulegać reaktywacji, podczas której zachodzi pełny cykl replikacyjny, co skutkuje produkcją zakaźnych cząstek wirusowych. Ponadto wiadomo, że CMV może być istotnym czynnikiem reaktywacji innych herpeswirusów.

Patogeneza i postacie kliniczne

Do zakażenia dochodzi zazwyczaj przez kontakt ze śliną, moczem, łzami, krwią, mlekiem, nasieniem, wydzieliną szyjki macicy osób zainfekowanych. W tym kontekście często zapomina się o możliwości zakażenia CMV drogą kontaktów seksualnych. W sporadycznych przypadkach możliwe są także zakażenia w wyniku transfuzji krwi czy transplantacji. Infekcje CMV obserwuje się u ludzi wszystkich ras, w każdym wieku, z różnych klas socjoekonomicznych i z wyjątkiem osób z obniżoną odpornością oraz kobiet w ciąży – nie stanowią one zagrożenia dla zdrowia.

Po wnikięciu do organizmu wirus rozprzestrzenia się drogą krwi do różnych organów: nerek, śledziony, wątroby, serca, mózgu, siatkówki, okrężnicy, ucha wewnętrznego, płuc, ślinianek. W czasie wirerii DNA wirusa stwierdzane jest w komórkach krwi obwodowej: w monocytach, limfocytach i neutrofilach. Wirus replikujący w makrofagach nie powoduje ich lizy, a gromadzi się w dużych cytoplazmatycznych wakuolach, które nie mają zdolności do łączenia się z błoną cytoplazmatyczną komórki. Uniemożliwia to prezentację antygenów wirusa oraz pozwala na rozprzestrzenienie się wraz z makrofagami po całym organizmie i zakażenie komórek śródbłonki i fibroblastów.

Poprzez takie procesy jak: ograniczenie prezentacji własnych antygenów i blokowanie powierzchniowej ekspresji HLA I i HLA II oraz fosforylację białek bezpośrednio-wczesnych, a także poprzez hamowanie apoptozy, blokowanie lizy przez komórki NK w wyniku prezentacji glikoproteiny wirusowej będącej homologiem cząsteczki MHC I-CMV ma zdolność unikania odpowiedzi immunologicznej gospodarza. To zjawisko z kolei sprzyja rozwojowi przewlekłego zakażenia z okresowymi, bezobjawowymi epizodami reaktywacji, w trakcie których dochodzi do aktywnej replikacji wirusa i krążenia w organizmie jego zakaźnych cząstek. A więc pomimo istnienia mechanizmów odporności wytworzonych w wyniku zakażenia pierwotnego (obecności swoistych przeciwciał oraz komórek pamięci) należy pamiętać, iż istniejąca odporność nie zabezpiecza przed reaktywacją zakażenia latentnego, a także przed nadkażeniem egzogennymi szczepami wirusa. Niemniej u osób seropozytywnych taka sytuacja zdarza się dość rzadko.

Ze względu na sposób, czas bądź przebieg kliniczny, zakażenia wirusem cytomegalii dzielimy na: wrodzone lub nabyte, naturalne lub jatrogenne, pierwotne lub wtórne, objawowe lub bezobjawowe.

Cytomegalia jest chorobą szeroko rozpowszechnioną i w ponad 90% bezobjawową. Sporadycznie choroba ta ma przebieg klinicznie jawny, z objawami zespołu mononukleozowego w postaci: gorączki lub stanów podgorączkowych, powiększenia węzłów chłonnych, bólów mięśniowych, bólów głowy i gardła, kaszlu oraz czasami powiększenia wątroby. Objawy cytomegalii przypominają obraz mononukleozy. W rzadkich przypadkach ostrej infekcji może wystąpić śródmiąższowe

zapalenie płuc, zapalenie wątroby, opon mózgowo-rdzeniowych, mięśnia sercowego, małopłytkowość i niedokrwistość hemolityczna. Najwięcej zakażeń stwierdza się we wczesnym dzieciństwie, okresie dojrzewania i okresie rozrodczym.

Zakażenie CMV u kobiet w ciąży

Populacja kobiet w ciąży stanowi grupę szczególnego ryzyka, tym bardziej, że CMV jest najczęstszą wirusową przyczyną wewnątrzmacicznego zakażenia płodu. Do transmisji wirusa przez łożysko dochodzi głównie w przebiegu pierwotnej infekcji u ciężarnej i już dzisiaj wiadomo, że ryzyko rośnie wraz z czasem trwania ciąży od 30-40% w pierwszym trymestrze do 77,6% w trzecim trymestrze ciąży. W rzadkich przypadkach zakażenie płodu następuje wskutek reaktywacji wirusa u ciężarnej lub nadkażenia innym serotypem wirusa, wówczas ryzyko transmisji dopłodowej wynosi 1-3%. Na podstawie badań przeprowadzonych w Wielkopolsce do infekcji pierwotnej w populacji kobiet ciężarnych dochodziło u 4% z nich, a ryzyko transmisji do płodu sięgało podobnie, jak podają inni autorzy, nawet do 75%.

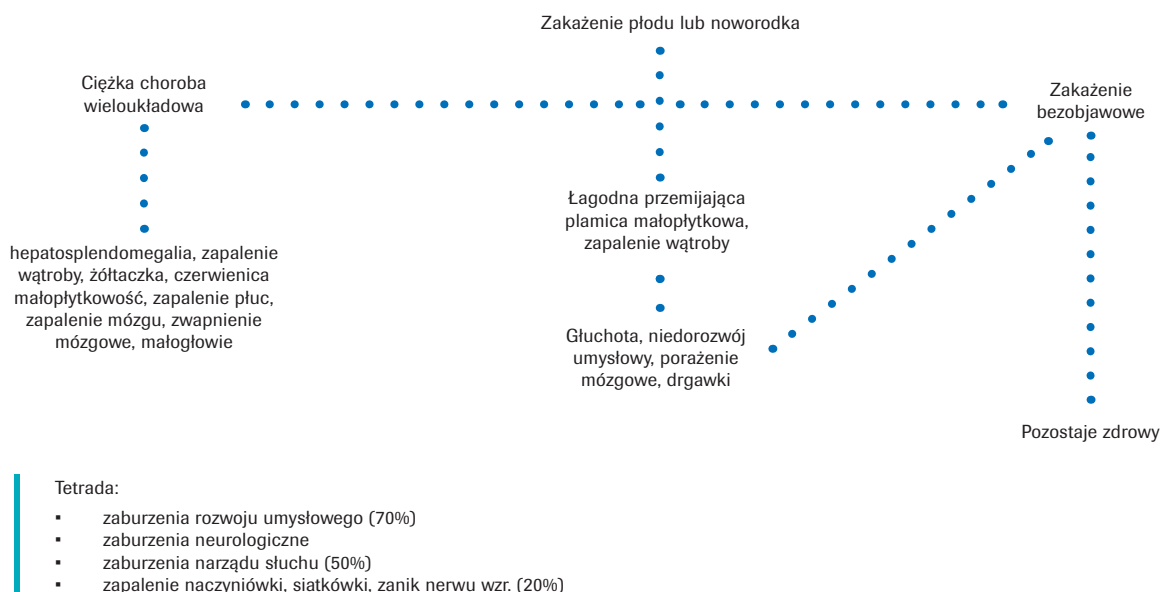
Jeżeli do zakażenia dochodzi między 4 a 22 tyg. to ryzyko wystąpienia objawowej cytomegalii wrodzonej oraz ciężkich upośledzeń szacuje się odpowiednio na 12% i 29%.

A zatem obraz kliniczny wrodzonej cytomegalii zależy bezpośrednio od tego, w którym okresie ciąży matka przeżyła zakażenie. Najcięższy przebieg mają infekcje nabyte na początku ciąży, wówczas u noworodka obserwuje się cechy opóźnionego wzrastania wewnątrzmacicznego, małowagi, poszerzenie układu komorowego, zwapnienia wewnątrzczaszkowe, wady serca, powiększenie śledziony i żółtaczkę, wybroczyny, niedokrwistość, objawy ze strony OUN, opóźnienie rozwoju psychomotorycznego, ślepotę, niedosłuch, a nawet głuchotę [Schemat 2].

Ryzyko ujawniania się konsekwencji zakażenia jest dużo mniejsze jeśli dochodzi do niego w późniejszych tygodniach ciąży. Przy zakażeniu ciężarnej między 16 a 27 tyg., objawy przy urodzeniu obserwuje się u 16% noworodków przy praktycznie zerowym ryzyku wystąpie-

Schemat 2.

Objawy kliniczne cytomegalii wrodzonej.



nia ciężkich uszkodzeń. Natomiast zakażenie w III trymestrze ciąży z reguły nie wiąże się z ryzykiem wystąpienia ciężkich powikłań (85–90% przypadków), co jednak nie oznacza możliwości ujawnienia się przebytego zakażenia wrodzonego w późniejszym okresie życia dziecka i u ponad 25% tych dzieci mogą się rozwinąć późne następstwa choroby, takie jak: niedosłuch odbiorczy lub głuchota, niedowidzenie, opóźnienie rozwoju psychoruchowego czy umysłowego oraz padaczka. Badania wykazały, że od 6% do 23% dzieci, które nie wykazywały objawów zakażenia CMV w okresie poporodowym i noworodkowym, w późniejszym dzieciństwie traciły słuch. Niedosłuch może być obustronny, często ulega progresji lub ujawnia się późno, dlatego bardzo ważna jest długotrwała audiologiczna obserwacja tej grupy pacjentów. Ponieważ zaraz po urodzeniu słuch najczęściej jest prawidłowy, przesiewowe badania słuchu pozwalają wykryć tylko 50% noworodków z niedosłuchem odbiorczym spowodowanym zakażeniem CMV.

U noworodków z objawową cytomegalią (10% wszystkich zakażeń wertykalnych) i nieleczonych przyczynowo, analogiczne powikłania wystąpią w 90% przypadków. Ponadto należy pamiętać, że przebyte infekcje w późniejszym okresie ciąży zwiększa ryzyko wystąpienia u płodu ostrej choroby z lokalizacją narządową: posocznicy, śródmiąższowego zapalenia płuc, zapalenia wątroby, siatkówki i naczyńówki, mózgu, stanu zapalnego przewodu pokarmowego, mięśnia sercowego i wybroczyn. Dlatego też, rozpoznanie cytomegalii wrodzonej powinno się brać pod uwagę u noworodków z posocznicą lub zapaleniem płuc, nieodpowiadających na standardową antybiotykoterapię.

Zakażenie CMV w czasie porodu lub po urodzeniu nie stanowi poważnego zagrożenia dla rozwoju noworodków, z wyjątkiem tych z bardzo niską masą urodzeniową, i na ogół przebiega bezobjawowo. Wyjątkowo, między 4 a 12 tygodniem życia, może rozwinąć się zapalenie płuc, zapalenie wątroby lub niedokrwistość hemolityczna. Co ciekawe, zainfekowane dzieci wydzielają wirusa z dróg oddechowych, a także z moczem przez dłuższy czas (do 4 lat przy zakażeniu wewnątrzmacicznym, 2 lata przy zakażeniu w czasie porodu).

W Polsce nie obowiązują badania skriningowe noworodków w kierunku wrodzonego zakażenia CMV. W codziennej praktyce pojawia się zatem pytanie, kiedy powinna być wykonana diagnostyka w kierunku cytomegalii. W pierwszej kolejności należy zwrócić uwagę na objawy z okresu ciąży sugerujące świeże zakażenie matki (wyniki badań serologicznych) oraz ewentualne odchylenia w badaniach ultrasonograficznych pło-

du, wskazujące na transmisję wirusa przez łożysko. Wystąpienie u noworodka objawów klinicznych, które sugerują wrodzone, objawowe zakażenie CMV, także obliuguje do przeprowadzenia diagnostyki u dziecka i matki w kierunku zakażenia wirusem cytomegalii.

Obecnie „złotym standardem” rozpoznania cytomegalii jest molekularne badanie moczu dziecka metodą PCR. Pobranie moczu u noworodków bywa czasem utrudnione ze względów technicznych, dlatego niektórzy autorzy sugerują, że próbki śliny są bardziej wiarygodnym i wygodniejszym materiałem w diagnostyce wrodzonej CMV (potwierdzono bardzo dużą czułość i swoistość badania płynnej i wysuszonej śliny metodą PCR w czasie rzeczywistym (real time PCR). Wykrycie obecności CMV w moczu lub w ślinie jest względnie proste, ponieważ w tych płynach ustrojowych noworodki wydalaają wiele kopii wirusa. U dzieci, które ukończyły 3 tydzień życia, nie można odróżnić zakażenia wrodzonego od nabytego. W przypadku diagnostyki metodą PCR tzw. suchej kropli krwi wyniki badań są rozbieżne, natomiast podczas analizy dużych grup badanych zwraca uwagę niska czułość tej metody. Aktualne zalecenia dotyczące rozpoznawania i leczenia wrodzonej cytomegalii zaakceptowane i stosowane również przez naszych specjalistów zaproponowali Kadambari S. i wsp.

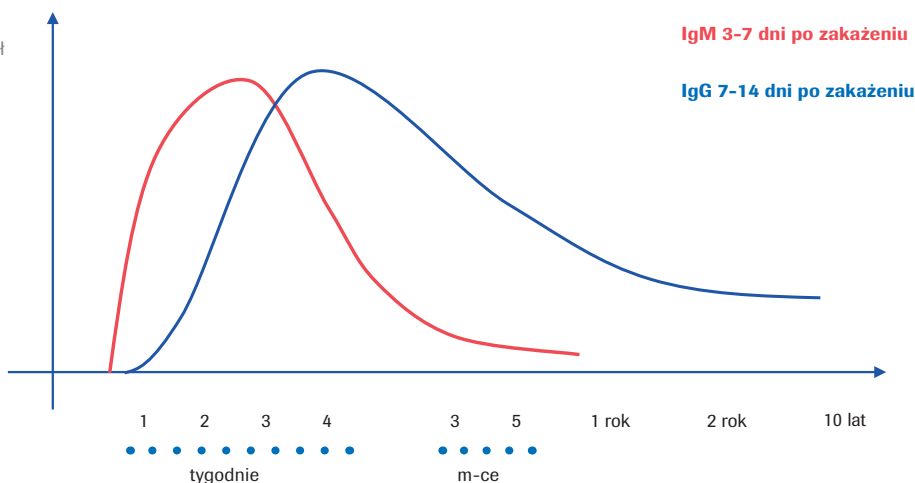
Diagnostyka zakażeń CMV u kobiet ciężarnych

W Europie program mający na celu wykrywanie zakażeń pierwotnych u ciężarnych, był prowadzony przez kilka lat we Włoszech. Obecnie w wielu krajach europejskich w tym także w Polsce, o czym zasygnalizowano już we wstępie tego artykułu, prowadzone są badania, ale w ograniczonym zakresie, gdyż dotyczą one głównie osób z grup wysokiego ryzyka oraz we wszystkich przypadkach podejrzenia wystąpienia zakażenia wrodzonego. Wytyczne w zakresie diagnostyki zakażeń CMV niewiele zmieniły się od tych podanych przez grupę badaczy Lazzarotto i wsp. Algorytm diagnostyki laboratoryjnej zakażenia CMV w ciąży przedstawiono na schemacie 4 [patrz str. 10].

W związku z tym, że największe ryzyko wystąpienia ciężkich uszkodzeń płodu związane jest z zakażeniem pierwotnym u matki, głównym celem diagnostyki jest potwierdzenie bądź wykluczenie tego zakażenia. Najpewniejszą metodą potwierdzenia jest wykazanie serokonwersji tj. wykrycie pojawienia się de novo swoistych przeciwciał CMV IgG u uprzednio seronegatywnej kobiety [Schemat 3].

Schemat 3.

Wytwarzanie przeciwciał w przebiegu zakażenia CVM.



Z drugiej strony, jeżeli w okresie prekonceptyjnym stwierdzono obecność przeciwciał IgG, to pozwala to z dużym prawdopodobieństwem wykluczyć pierwotne zakażenie w trakcie ciąży, co uzasadniałoby sens i wręcz konieczność wykonywania badań profilaktycznych. Znany marker pierwotnego zakażenia, jakim z reguły określane są swoiste przeciwciała CMV IgM, ma pewne ograniczenia. Należy pamiętać, że wzmożona synteza przeciwciał IgM może mieć miejsce podczas reaktywacji zakażeń latentnych, bądź reinfekcji, ponadto w rzadkich przypadkach ich obecność może być stwierdzana powyżej 12 m-cy od momentu zakażenia jako tzw. „przetrwale przeciwciała IgM”. W trudnych do interpretacji sytuacjach klinicznych pomocnym narzędziem diagnostycznym w rozróżnieniu obecnie nabytego zakażenia od przewlekłej fazy choroby jest określenie awidności przeciwciał IgG. Dla lepszego zrozumienia zasady działania testów diagnostycznych stosowanych w rutynowej diagnostyce określających ten parametr, warto przypomnieć kilka istotnych pojęć z zakresu immunologii. W reakcji antygen-przeciwciała udział biorą liczne wiązania niekowalencyjne: wodorowe, elektrostatyczne, van der Waalsa i hydrofobowe. Daje to w sumie dużą energię wiązania, która w znacznym stopniu zależy od odległości dzielącej reagujące ze sobą grupy chemiczne, czyli od komplementarności miejsc wiążących i determinantów antygenowych. Awidność (avidity) wyraża się całkowitą siłą i trwałością wiązania antygen-przeciwciała, które zależą nie tylko od siły wiązania (affinity), ale także od liczby determinantów antygenowych i wartościowości przeciwciała. Dlatego też nie należy jej mylić z powinowactwem (affinity), które określamy jako siłę wiązania między pojedynczym miejscem wiążącym, a jednowartościowym antygenem (determinantem antygenowym). Awidność jest zawsze wielokrotnie większa niż suma sił wiązania poszczególnych połączeń Ag-Ab. Co istotne, awidność wzrasta w miarę „dojrzwania” odpowiedzi immunologicznej. Należy również pamiętać, że w przeciwieństwie do przeciwciał IgG/IgA, których awidność rośnie wraz z czasem trwania infekcji przeciwciała IgM „nie dojrzewają”.

W konwencjonalnych testach do badania awidności przeciwciał IgG wykorzystuje się odczynniki dysocjujące kompleksy Ag-Ab o małej awidności przeciwciał (np. mocznik). Na tej podstawie wylicza się tzw. indeks awidności. Stwierdzenie wysokiej awidności IgG zasadniczo wyklucza nabycie zakażenia w ostatnich 3-4 miesiącach, z kolei niska awidność przy obecności CMV IgM z dużym prawdopodobieństwem przemawia za zakażeniem w ostatnich kilku miesiącach. Niemniej w rzadkich przypadkach niski wskaźnik awidności nie wyklucza wcześniejszego zakażenia z przed 3-4 m-cy, ponieważ część osób zakażonych może wykazywać utrzymywanie się przeciwciał IgG o niskiej awidności przez wiele miesięcy. Jednak w sytuacjach związanych z długotrwałym utrzymywaniem się CMV IgM oraz w przypadku dość częstych reakcji fałszywie dodatnich metoda oznaczania awidności przeciwciał IgG może być rozstrzygająca. Szczegółowe omówienie interferencji związanych z metodami immunochemicznymi wykracza poza ramy tego opracowania, warto jednak pamiętać, że w przypadku próbek materiału badanego od kobiet ciężarnych efekty matrycowe mogą mieć istotne znaczenie na

przebiegu reakcji antygen-przeciwciała stosowanej metody. Dla przypomnienia: efekt matrycowy jest definiowany jako wpływ własności próbki, niezależnie od obecności analitu, na pomiar, a przez to na wartość mierzonej ilości; matryca próbki to wszystkie składniki znajdujące się w systemie biologicznym z wyjątkiem samego analitu.

Diagnostyczne testy immunochemiczne umożliwiają wykrycie przeciwciał w rozcieńczonej surowicy w ciągu około godziny. Automatyzacja pozwala na zwielokrotnienie wydajności metody, ponadto chroni przed ryzykiem kontaminacji materiału badanego, daje możliwość monitorowania stężenia przeciwciał w czasie oraz niewątpliwie przyczyniła się do uzyskania wysokiej czułości i swoistości stosowanych metod.

W tabelach nr 1-2 zestawiono charakterystykę dostępnych testów serologicznych najczęściej wykorzystywanych w diagnostyce zakażenia CMV u kobiet ciężarnych w Polsce. Na podstawie zebranych danych, łatwo można wywnioskować, iż interpretacja wyników badań laboratoryjnych z okresu ciąży, zwłaszcza przez niedoświadczonych klinicystów jak i diagnostów laboratoryjnych może być utrudniona.

Należy pamiętać, że uzyskiwane wyniki mogą różnić się w zależności od metody czy laboratorium wykonującego badanie. Różnice w zakresach referencyjnych testów diagnostycznych prezentowanych w tabelach, wynikają bowiem z braku międzynarodowej standaryzacji i stosowania różnych standardów do kalibracji metod. I tak np. w szczegółowej procedurze do testu firma Roche podaje informację, że „metoda została wystandaryzowana wobec wewnętrznego standardu Roche dla CMV IgG/IgM”, natomiast firma Biomerieux podaje, że „badanie VIDAS CMV IgM/IgG zostało skalibrowane na podstawie zebranych surowic”, z kolei firma DiaSorin podaje, że „stężenia kalibratorów są ustalane w stosunku do własnego wzorcowego preparatu przeciwciał”.

Kolejnym ważnym aspektem, szczególnie przy interpretacji dynamiki przyrastania stężeń CMV IgG w kolejnych badaniach jest fakt, iż plateau ich stężeń jest osobniczo zmienne. Istotne narastanie stężeń przeciwciał IgG (3-4-krotne) może być oznaką aktywacji układu odpornościowego w odpowiedzi na wirusa. Zatem, warunkiem bezwzględny interpretacji badań wykonanych w odstępie czasowym jest oznaczenie przeciwciał w tym samym laboratorium.

Często brak tej elementarnej wiedzy niepotrzebnie naraża kobiety ciężarne na stres związany z nierzetelnym przeprowadzeniem procesu diagnostycznego, co przyczynia się do wielokrotnego oznaczania poziomu przeciwciał CMV IgG/IgM w różnych laboratoriach. W efekcie klinicysta posiada wiele, różnych wyników badań, które nie dają jednoznacznej odpowiedzi i nierzadko kieruje pacjentkę do ośrodka referencyjnego na powtórne wykonanie wszystkich oznaczeń. Takie postępowanie nie tylko wydłuża proces diagnostyczny ale naraża system opieki zdrowotnej lub często same pacjentki na dodatkowe koszty.

Tabela 1.

Charakterystyka najczęściej wykorzystywanych testów immunochemicznych wykrywających **CMV IgG** w laboratoriach diagnostycznych w Polsce.

Nazwa testu	Roche CMV IgG	Vidas CMV IgG	Architect CMV IgG	Liaison IgG
Metoda	ECLIA elektrochemiluminescencja	ELFA metoda enzymo-immunofluorescencyjna	Dwustopniowy test immunochemiczny - Chemiflex	CLIA chemiluminescencyjno-immunologiczną
Jednostki	U/ml	AU/ml	AU/ml	U/ml
Materiał badany	Surowica, Osocze krwi pobranej na heparynę litową, K2-EDTA i K3-EDTA.	Surowica	Surowica, Osocze (heparyna litowa, EDTA – sól potasową, cytrynian sodowy, heparyna sodowa, ACD, CPDA-1, CPD, szczawian K/NaF)	Surowica, Osocze (heparyna sodowa i litowa, cytrynian sodowy)
Objętość próbki	170 µl (20 µl próbki + 150 µl objętości martwej)	100 µl	75 µl (25 µl próbki + 50 µl objętości martwej)	170 µl (20 µl próbki + 50 µl objętości martwej)
Zakres pomiarowy	0.25-500 U/mL	0-400 AU/mL	0 – 250.0 AU/mL	5.0 do 180 U/mL
Interpretacja wyników	<0.5 U/ml Niereaktywne 0.5-<1.0 U/ml Niejednoznaczne >1.0 U/ml Reaktywne	<4.0 AU/ml Niereaktywne 4.0-<6.0 AU/ml Niejednoznaczne ≥ 6.0 U/ml Reaktywne	<6.0 AU/ml Niereaktywny ≥6.0 AU/ml Reaktywny	<12.0 U/ml Niereaktywne 12.0-<14.0 U/ml Niejednoznaczne >14.0 U/ml Reaktywne
Czułość diagnostyczna	90.7-97.5% (n=368) badania przeprowadzono w 4 różnych ośrodkach	98,26% Przedział ufności 95%: 94.90 – 99,42 %	100.0% (560/560), 95% Przedział ufności: 99.34% – 100%*	99.55% (657/660) 95% przedział ufności: 98.68 – 99.91%)
Swoistość diagnostyczna	96.6 % (422/437)	100% Przedział ufności 95%: 96.15 – 100 %	99.15% (938/946), 95% Przedział ufności: 98.34% – 99.63%*	99.74% (383/384) 95% przedział ufności: 98.56 – 99.99%)

* Dane reprezentatywne: wyniki uzyskane w poszczególnych laboratoriach mogą różnić się od zamieszczonych.

Tabela 2.

Charakterystyka najczęściej wykorzystywanych testów immunochemicznych wykrywających **CMV IgM** w laboratoriach diagnostycznych w Polsce.

Nazwa testu	Roche CMV IgM	Vidas CMV IgM	Architect CMV IgM	Liaison IgM
Metoda	ECLIA elektrochemiluminescencja	ELFA metoda enzymo-immunofluorescencyjna	Dwustopniowy test immunochemiczny - Chemiflex	CLIA chemiluminescencyjno-immunologiczną
Jednostki	Indeks	Indeks	Indeks	Indeks
Materiał badany	Surowica, Osocze krwi pobranej na heparynę litową, K2-EDTA i K3-EDTA	Surowica	Surowica, Osocze (heparyna litowa, heparyna sodowa, sól potasowa EDTA, cytrynian sodowy)	Surowica, Osocze (heparyna sodowa i litowa, cytrynian sodowy)
Objętość próbki	160 µl (10 µl próbki + 150 µl objętości martwej)	100 µl	75 µl (25 µl próbki + 50 µl objętości martwej)	170 µl (20 µl próbki + 150 µl objętości martwej)
Interpretacja wyników	<0.7 Indeks niereaktywny 0.7-<1.0 Indeks niejednoznaczny ≥1.0 Indeks reaktywny	<0.7 Indeks niereaktywny 0.7-<0.9 Indeks niejednoznaczny ≥0.9 Indeks reaktywny	<0.85 Indeks Niereaktywny ≥1.00 Indeks Reaktywny	<18.0 Indeks niereaktywny 18.0 -<22.0 Indeks niejednoznaczny ≥22.0 Indeks reaktywny
Swoistość diagnostyczna	90.7-98.8% (n=1646) badania przeprowadzono w 3 różnych ośrodkach 95% Przedział ufności: 95.20-97.40%.	99.41% (169/171) 95% Przedział ufności: 96.65-99.90%.	99.53% (1056/1061), 95% Przedział ufności: 98.90%-99.85%*	99.07% (955/964) 95% Przedział ufności: 98.23-99.57%.

* Dane reprezentatywne: wyniki uzyskane w poszczególnych laboratoriach mogą różnić się od zamieszczonych.



Przypadki kliniczne

Poniżej przedstawiono przykłady wyników badań serologicznych u pacjentek w ciąży, które zgłosiły się do Poradni Chorób Zakaźnych Wojewódzkiego Szpitala Zakaźnego w Warszawie. Laboratorium diagnostyczne dysponuje dwoma, niezależnymi systemami diagnostycznymi:

firmy Roche – aparat cobas i firmy BioMérieux – aparat Vidas i dla lepszego zobrazowania problematyki poruszonej powyżej, wykonano badania w tych samych próbkach materiału badanego, w tych samych warunkach laboratoryjnych, na dwóch różnych platformach diagnostycznych. Tabela 3 przedstawia interpretację wyników badań w obydwu zastosowanych testach immunochemicznych.

Tabela 3.

Interpretacja wyników badań serologicznych kierunku wirusa CMV systemach cobas Vidas.

	Interpretacja	CMV IgM	CMV IgG	Awidność	CMV IgGAv
COBAS	Reaktywny	≥1.0	≥1.0	Wysoka	>55%
	Niejednoznaczny	≥0.7<1.0	0.5<1.0	Nieokreślona	45-54.9%
	Niereaktywny	<0.7	<0.5	Niska	<45%
VIDAS	Reaktywny	>0.9	>6.0	Wysoka	>0.650
	Niejednoznaczny	0.7-0.9	4.0-6.0	Nieokreślona	0.400-0.650
	Niereaktywny	<0.7	>4.0	Niska	>0.400

Przypadek nr 1. 39-letnia kobieta, w 16 tyg. ciąży została skierowana na badania serologiczne w kierunku CMV. Na podstawie wywiadu ustalono, że na początku ciąży pacjentka przeszła infekcję grypopodobną. Status immunologiczny odnośnie CMV przed ciążą nie był znany.

Brak obecności przeciwciał CMV IgM oraz stwierdzenie przeciwciał IgG o wysokiej awidności w teście cobas, ale nieokreślonej w teście Vidas, pozwala jednak wykluczyć pierwotną infekcję u ciężarnej. Wniosek ten dodatkowo potwierdza kolejne badanie próbki surowicy po okresie 3 tygodni od pierwszego pobrania.

Tabela 4.

Wyniki badań serologicznych pacjentki nr 1.

	COBAS			VIDAS		
Nr 1	CMV IgM	CMV IgG U/ml	CMV IgGAv	CMV IgM	CMV IgG AU/ml	CMV IgGAv
R. J.	0.465	62.09	65.60	0.65	11.0	0.640
R. J. próbka pobrana po 3 tyg.	0.530	71.01	61.20	0.68	9.0	0.650

Przypadek nr 2. 28-letnia kobieta, w I trymestrze ciąży bez szczegółowych informacji z wywiadu lekarskiego. Brak obecności przeciwciał CMV IgM w obydwu zastosowanych testach i występowanie przeciwciał IgG o wysokiej awidności, zarówno w teście cobas jak i Vidas, pozwala z dużym prawdopodobieństwem stwierdzić wtórną infekcję CMV. Wartość stężenia CMV IgG w teście cobas jest ok. 15 razy wyższa w porównaniu do testu Vidas, co jak już wcześniej wspomniano wynika z braku standaryzacji tych metod. Bardzo często jednak, na sprawozdaniu z przeprowadzonego badania laboratorium diagnostyczne podają ostateczny wynik w postaci CMV IgG >500 U/ml. Taki

schemat postępowania można zaobserwować w placówkach, które nie dysponują w swojej ofercie możliwością oznaczania awidności CMV IgG. Jest to niezgodne z obowiązującymi procedurami i ogólnie przyjętą dobrą praktyką kliniczną. Producent testu wyraźnie zaznacza, że próbki o stężeniu przeciwciał CMV IgG powyżej zakresu pomiarowego należy rozcieńczyć za pomocą odpowiedniego rozcieńczalnika, podając nawet zalecane rozcieńczenie (1:20). Warto również podkreślić, że dokładna wartość stężenia przeciwciał CMV IgG ma duże znaczenie kliniczne, szczególnie w przypadku monitorowania dynamiki zmian poziomu CMV IgG.

Tabela 5.

Wyniki badań serologicznych pacjentki nr 2.

	COBAS			VIDAS		
Nr 1	CMV IgM	CMV IgG U/ml	CMV IgGAv	CMV IgM	CMV IgG AU/ml	CMV IgGAv
L. A	0.323	>500 po zalecanym rozcz. 1:20 800.5	79.70	0.37	53.0	0.804

Przypadek nr 3. 30-letnia kobieta, w 17 tygodniu drugiej ciąży. Podczas pierwszej ciąży kobieta była seronegatywna w zakresie przeciwciał CMV. W wywiadzie lekarskim w pierwszym miesiącu ciąży pojawiła się gorączka z ogólnym złym samopoczuciem i objawami grypopodobnymi. Wysokie indeksy przeciwciał CMV

IgM i niska awidność CMV IgG, w świetle danych klinicznych sugerują możliwość świeżo przebytej infekcji pierwotnej. Wysoce uzasadnione jest ustalenie potencjalnego ryzyka transmisji przełożyskowej i przeniesienie zakażenia na płód. W tym celu rekomendowana jest diagnostyka prenatalna [Schemat 4].

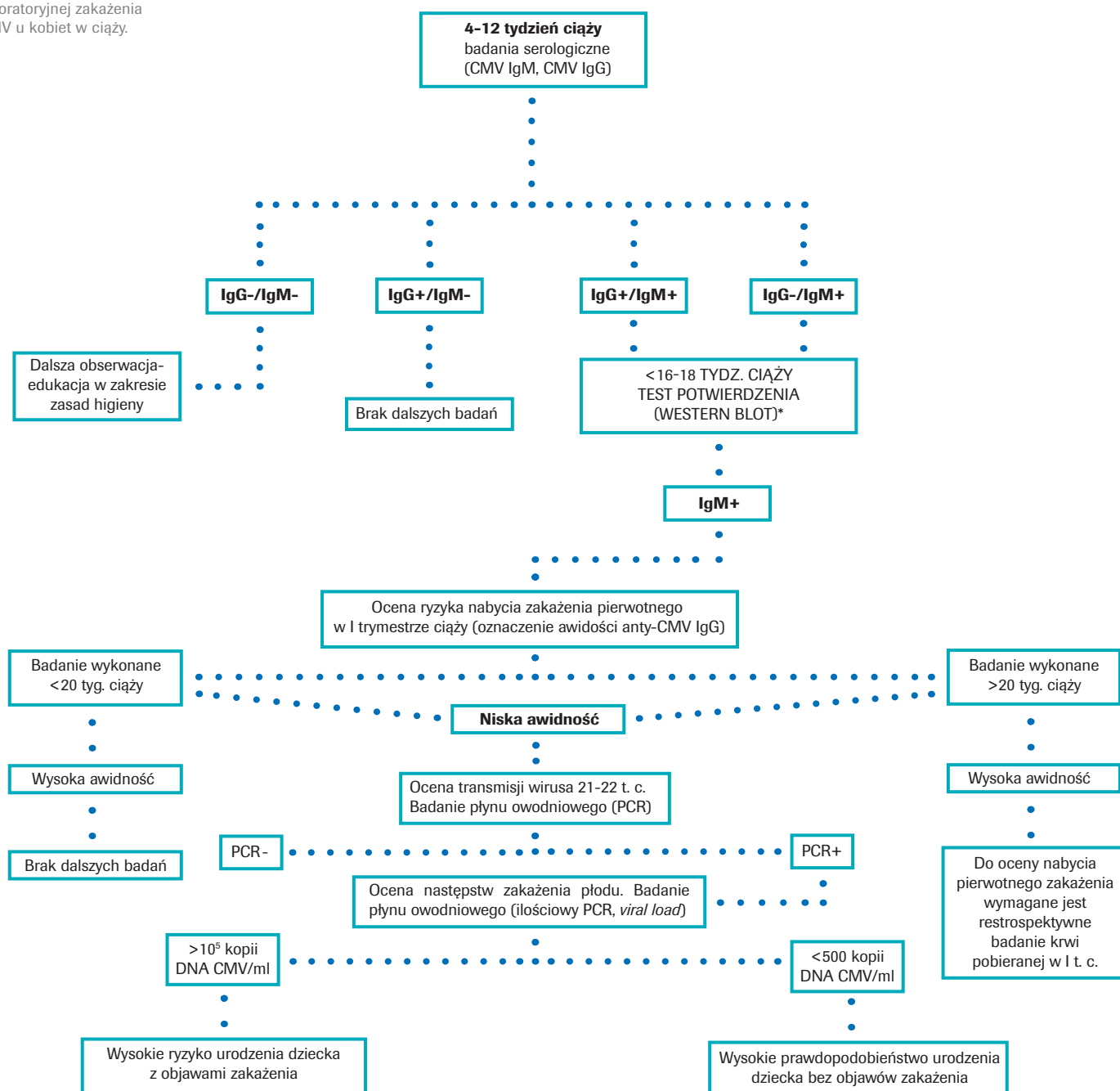
Tabela 6.

Wyniki badań serologicznych pacjentki nr 3.

	COBAS			VIDAS		
Nr 1	CMV IgM	CMV IgG U/ml	CMV IgGAv	CMV IgM	CMV IgG	CMV IgGAv
R. M.	7.15	7.7	26.60	1.83	24.0	0.400

Schemat 4.

Schemat diagnostyki laboratoryjnej zakażenia CMV u kobiet w ciąży.



* WB CMV IgG IgM (test potwierdzenia) nie jest wykonywany w rutynowych laboratoriach w Polsce.

Podsumowanie

Chociaż wrodzone zakażenie wirusem cytomegalii jest częstym problemem, jednak wiedza o nim jest niedostateczna. Prowadzenie właściwej diagnostyki i kwalifikacja do leczenia nadal są przedmiotem badań. Wielu autorów za najlepszą metodę identyfikacji ryzyka infekcji uważa przesiewowe badania serologiczne w trakcie trwania ciąży, co zatem podkreśla ich istotną kwestię w aspekcie zapobiegania wrodzonej infekcji CMV. Wyraża-

ny jest także sprzeciw wobec wykonywania rutynowych badań skryningowych, a klinicyści zajmujący to stanowisko twierdzą, że wiarygodność testów serologicznych jest wątpliwa, informacja o statusie immunologicznym nie daje praktycznych korzyści, a diagnostyka in utero ma ograniczoną wartość. Próbując znaleźć konsensus dla tych dwóch skrajnych opinii wydaje się konieczne, aby przesiewowe badania laboratoryjne w kierunku zakażenia CMV wykonywane były z należytą precyzją i zgodnie z dobrze pojętą „dobrą praktyką laboratoryjną. - Good Laboratory Practice”.

Miejsce markerów zaburzonej angiogenezy (sFlt-1, PlGF) we współczesnej diagnostyce preeklampsji

Dr hab. n. med. Sebastian Kwiatkowski, Klinika Położnictwa i Ginekologii Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego, Szczecin.

Na preeklampsję i schorzenia związane z upośledzoną perfuzją łożyska choruje blisko 10% wszystkich kobiet ciężarnych. W ostatnich dwóch dziesięcioleciach odsetek tych patologii wzrósł w Stanach Zjednoczonych o 25%. Według statystyk zespoły kliniczne powstające w wyniku niedokrwienia łożyska odpowiadają za blisko 50% porodów przedwczesnych, 50% hospitalizacji na oddziałach patologii ciąży i 25% pobyków kobiet ciężarnych na oddziałach intensywnej terapii. Co roku z powodu preeklampsji umiera na świecie blisko 60 tysięcy kobiet.

Obecnie nie potrafimy skutecznie leczyć tych schorzeń, a jedyną efektywną terapią pozostaje zakończenie ciąży. W ostatnich latach pojawiły się jednak metody diagnostyczne, które znacząco zwiększyły predykcję wystąpienia objawów patologicznych i poprawiły jakość monitorowania ciężarnych i płodu.

Obecne piśmiennictwo rozróżnia wczesną oraz późną formę preeklampsji. Wczesna postać rozwija się przed 32-34 tygodniem ciąży i jest zdecydowanie związana z upośledzoną inwazją trofoblastu. Zbyt płytka przebudowa tętnic spiralnych prowadzi do niedokrwienia i niedotlenienia łożyska, a następnie do uruchomienia patologicznych procesów, takich jak nasilony stres oksydacyjny, zapalenie czy zaburzona angiogeneza. W konsekwencji dochodzi do uogólnionego uszkodzenia śródbłónki i rozwoju różnorodnych objawów klinicznych takich jak nadciśnienie tętnicze, białkomocznica, wzrost markerów uszkodzenia wątroby, rzucawka czy też zahamowanie wzrastania płodu. Druga postać schorzenia z podobną prezentacją kliniczną rozwija się po 34 tygodniu ciąży i według obecnych danych przebudowa tętnic spiralnych jest w niej tylko nieznacznie zaburzona, a główną rolę odgrywają czynniki matczyne np. zespół metaboliczny. Być może w rozwoju późnych zespołów preeklampsji bierze udział również zaprogramowany czas funkcjonowania łożyska, który jest uwarunkowany osobniczo.

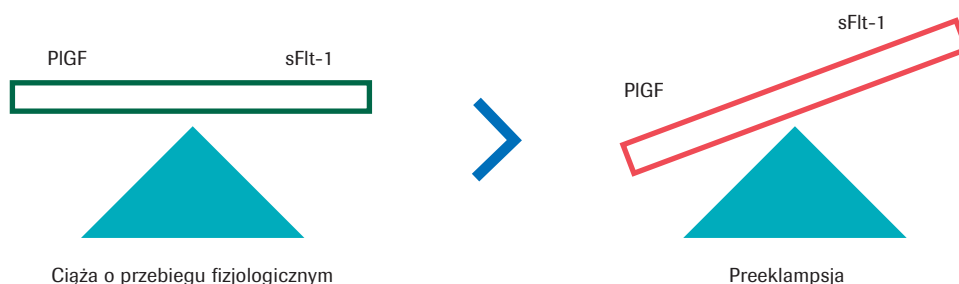
Dotychczasowa diagnostyka preeklampsji opierała się przede wszystkim na rozpoznawaniu objawów klinicznych oraz parametrach laboratoryjnych, które odzwierciedlały stopień uszkodzenia narządów. Niejednokrotnie kryteria te były tak niejednoznaczne, że

postawienie właściwej diagnozy było trudne i uzyskiwane po dłuższym czasie drogą eliminacji. Takie podejście sprawia, że nasza diagnoza bywa zbyt późna, a konsekwencje dla matki i jej dziecka nierzadko bardzo poważne. Obecnie zmierzamy do bardziej precyzyjnego procesu diagnostycznego, który ma wykorzystywać wcześniejsze etapy rozwoju schorzenia. Jedną z metod wykorzystującą zaburzoną angiogenezę w łożysku jest oznaczanie jej markerów. Obecnie istnieją już komercyjne zestawy laboratoryjne do oznaczania fms-podobnej kinazy tyrozynowej (sFlt-1 – rozpuszczalny receptor kinazy tyrozynowej) oraz łożyskowego czynnika wzrostu (PlGF). sFlt-1 produkowany jest przez syncytiotrofoblast i jego stężenia w fizjologicznej ciąży przekraczają jedynie kilkukrotnie stężenia PlGF. W przypadkach niedotlenienia oraz upośledzonej perfuzji łożyska, dochodzi do masywnej produkcji sFlt-1 przez trofoblast i jego stężenie rejestrowane w krążeniu matczynym są przynajmniej kilkadziesiąt razy wyższe niż stężenia PlGF. sFlt-1 w tak dużych stężeniach ma działanie niekorzystne i jest odpowiedzialne za większość objawów klinicznych i laboratoryjnych obserwowanych w preeklampsji.

PlGF to substancja o działaniu stabilizującym funkcję śródbłónki. Wywiera pozytywny efekt m.in. na funkcję łożyska, jednak w miarę uszkodzania struktur trofoblastu jego stężenie obniża się. Ponadto sFlt-1 odpowiedzialny jest za neutralizację PlGF i zmniejszenie jego dostępności. Poniższy schemat najlepiej oddaje sytuację, która panuje w warunkach homeostazy w ciąży fizjologicznej oraz przy zaburzonej angiogenezie towarzyszącej preeklampsji.

Schemat 1.

Równowaga markerów angiogenezy w ciąży fizjologicznej i jej zaburzenia w preeklampsji.



Zmiany zachodzące w stężeniach sFlt-1 i PlGF wyprzedzają o około 5-6 tygodni objawy kliniczne i parametry biochemiczne uszkodzenia narządów obserwowane w preeklampsji.

PlGF w diagnostyce preeklampsji może być wykorzystywany już w pierwszym trymestrze ciąży. Połączenie badań biofizycznych z oceną markerów biochemicznych pozwoliło wypracować optymalny model wykrywania ciężarnych ze zwiększonym ryzykiem rozwoju preeklampsji wczesnej. Algorytm oceniający ryzyko, wykorzystuje dane z wywiadu kobiety ciężarnej, średnie ciśnienie tętnicze (mierzone dwukrotnie na obu ramionach- MAP), wartości indeksów pulsacji w tętnicach macicznych (UtA PI) oraz stężenia białka PAPPa wraz ze stężeniem PlGF. Model ten został zmodyfikowany w 2016 roku. Zaproponowano dwustopniowy proces predykcyjny przeprowadzany pomiędzy 11-14 oraz 19-24 tygodniem ciąży z wykorzystaniem MAP, UtA PI oraz PlGF. Dzięki temu algorytmowi udało się osiągnąć wskaźnik wykrywalności (DR), odpowiednio 75 i 85% dla pierwszego oraz pierwszego i drugiego trymestru przy FPR 10%. Dla porównania model obecnie proponowany przez ACOG daje DR 90% przy FPR 67%.

W późniejszych okresach ciąży, począwszy od 20 tygodnia jej trwania największą wartość predykcyjną i diagnostyczną osiągnięto wykorzystując jednocześnie oznaczanie sFlt-1 i PlGF. Uzyskany dzięki temu wskaźnik sFlt-1/PlGF uznano za predykcyjny, jeśli wartość odcięcia wynosi 85 (cut-off point).

Zaburzenia inwazji trofoblastu doprowadzają do rozwoju objawów klinicznych najwcześniej po 20 tygodniu ciąży. Przeprowadzone badania wykazały, że w grupie kobiet ciężarnych z obecnymi czynnikami ryzyka rozwoju preeklampsji, takimi jak: nadciśnienie

przewlekłe, przewlekłe schorzenia nerek, cukrzyca, zespół antyfosfolipidowy lub z wywiadem obciążonym wystąpieniem preeklampsji, wykonanie testu sFlt-1/PlGF pozwala wyodrębnić grupę kobiet ciężarnych zagrożonych rozwojem ciężkiej patologii położniczej w danej chwili. Podobnie jeśli wykonamy test sFlt-1/PlGF, u kobiet ciężarnych, które zademonstrowały jeden z objawów klinicznych, bądź laboratoryjnych preeklampsji. Dodatkowo wartości testu sFlt-1/PlGF, powtarzane w pewnych odstępach czasu, pozwalają w takich sytuacjach rozwiązać wątpliwości.

W 2015 roku zostało zaprezentowane badanie PROGNOSIS przeprowadzone w 30 ośrodkach na świecie, do którego włączono 1050 kobiet ciężarnych z podejrzeniem preeklampsji pomiędzy 24, a 37 tygodniem ciąży. Badanie zostało zaprojektowane, aby ocenić wartość wskaźnika sFlt-1/PlGF w prognozowaniu krótkoterminowym, poniżej 1 tygodnia i powyżej 4 tygodni od wystąpienia preeklampsji. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że wartość wskaźnika poniżej 38 pozwala wykluczyć wystąpienie preeklampsji w przeciągu najbliższych 7 dni (NPV 99,3%). W grupie ciężarnych poniżej 34 tygodnia ciąży wartość wskaźnika powyżej 85, a po 34 tygodniu ciąży powyżej 110 pozwala z bardzo dużym prawdopodobieństwem przewidzieć wystąpienie preeklampsji lub innego zespołu wynikającego z niedokrwienia łożyska. Wskazane jest monitorowanie w tych przypadkach wartości wskaźnika celem oceny progresji zmian. Ciężkie przypadki wczesnej preeklampsji ze wskaźnikiem >655, a później >201 wiążą się silnie z koniecznością zakończenia ciąży w przeciągu 48 godzin. Wartości wskaźnika sFlt-1/PlGF pomiędzy 38, a 85 (110) nasuwają podejrzenie nieprawidłowej perfuzji łożyska, stąd autorzy sugerują monitorowanie wskaźnika u pacjentek przed 34 tygodniem ciąży, zaś po 34 tygodniu jego monitorowanie oraz rozważenie wcześniejszej indukcji porodu.



W oparciu między innymi o to badanie National Institute for Health and Care Excellence (NICE) w 2016 roku, uznał wykorzystanie testu sFlt-1/PIGF jako obiecującego narzędzia, u kobiet ciężarnych pomiędzy 20 i 35 tygodniem ciąży celem wykluczenia preeklampsji. Instytut orzekł jednak, że potrzebne są dalsze badania, a obecny stan wiedzy jest niewystarczający, aby wprowadzić rekomendacje rutynowego oznaczania testu sFlt-1/PIGF w praktyce NHS.

Rok 2016 i 2017 przyniósł kolejne doniesienia o możliwości zastosowania testu sFlt-1/PIGF celem wykluczenia preeklampsji. Zeisler i wsp. zaprezentowali wyniki wieloośrodkowego badania, w którym wykazali negatywną wartość predykcyjną rozwoju preeklampsji, u ciężarnych ze wskaźnikiem poniżej 38 na poziomie 99,3%. Sovio i wsp. w badaniu przeprowadzonym u 4099 kobiet ciężarnych z niskim ryzykiem rozwoju preeklampsji stwierdzili, że istnieje duża wartość zastosowania wskaźnika sFlt-1/PIGF i wykrycia preeklampsji, u ciężarnych po 36 tygodniu ciąży. Natomiast dodatnie wartości wskaźnika u kobiet w 28 tygodniu ciąży, wiążą się z bezpośrednim ryzykiem konieczności wcześniejszego jej zakończenia w wyniku wystąpienia objawów klinicznych preeklampsji. Dragan i wsp. zaprezentowali wyniki badania z udziałem ponad 12000 kobiet, u których wykonano test sFlt-1/PIGF. Wykazało ono, że wartość wskaźnika sFlt-1/PIGF mniejsza lub równa 38 zapewnia z dokładnością do 99,97%, że kobieta nie urodzi w przeciągu tygodnia z powodu preeklampsji. Ponadto negatywna wartość predykcyjna dla wartości wskaźnika >38 była bardzo wysoka i wyniosła 99,91%.

Jak wspomniano powyżej wysoka wartość wskaźnika sFlt-1/PIGF koreluje dodatnio z wystąpieniem poważnych objawów klinicznych zmuszających do zakończenia ciąży. Wykazano ponadto, że wyższe stężenia sFlt-1 i niższe PIGF są związane z wystąpieniem poważniejszych zespołów klinicznych. W preeklampsji wczesnej

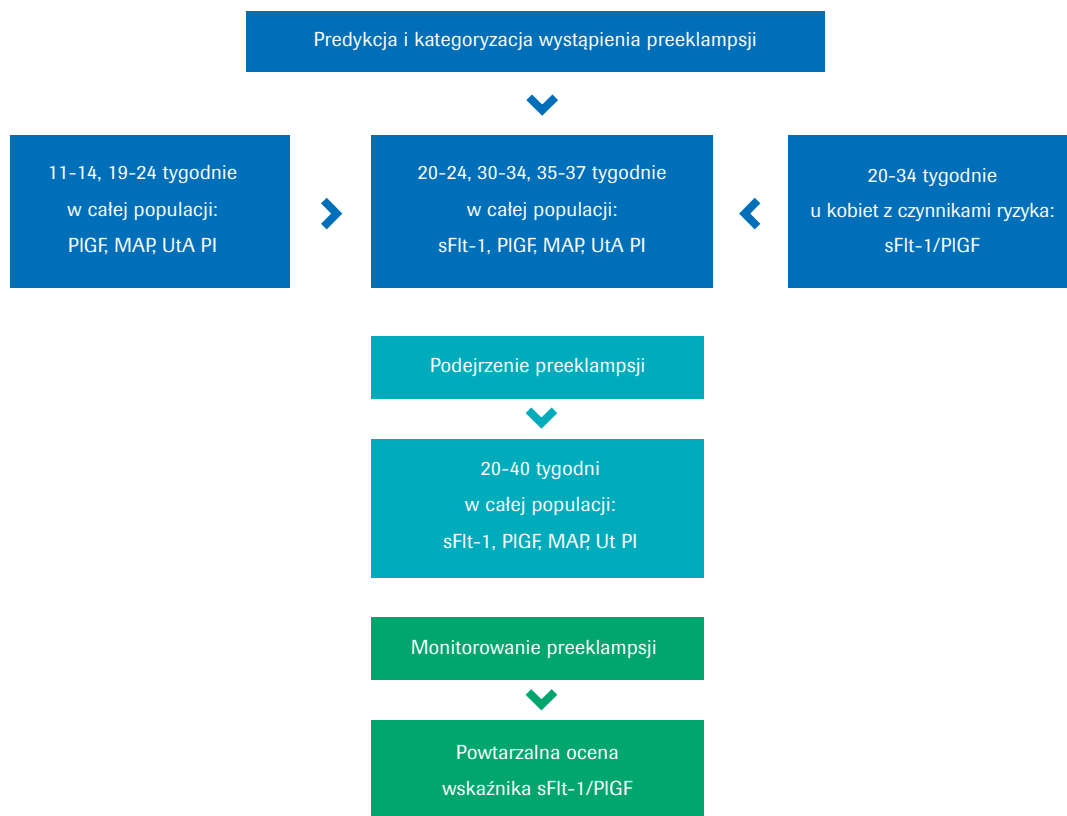
wartości indeksu są zdecydowanie wyższe niż w formie późnej. Stężenia sFlt-1 są wprost proporcjonalne do nasilenia białkomoczu i odwrotnie proporcjonalne do liczby płytek krwi.

Jak wynika z dotychczasowych badań, ocena markerów zaburzonej angiogenezy może okazać się cennym wsparciem i uzupełnieniem dotychczasowych metod diagnozowania oraz monitorowania kobiet z preeklampsją. Przytoczone badania wykazują jasno, że wartość wskaźnika sFlt-1/PIGF koreluje również z nasileniem objawów klinicznych. Jego bardzo wysokie wartości poprzedzają bezpośrednio objawy zmuszające do zakończenia ciąży. Mimo to, samodzielne zastosowania wskaźnika sFlt-1/PIGF wymaga dalszych badań. Obecny rok przyniósł szereg publikacji włączających opisywany wskaźnik do algorytmów przewidujących wystąpienie wczesnych i późnych form preeklampsji. Wykazano, że istnieje możliwość dokonywania kategoryzacji pacjentek w zależności od ryzyka wystąpienia stanu przedrzucawkowego już od 19-24 tygodnia ciąży, a następnie jej uzupełnienie w 30-34 oraz 35-37 tygodniu ciąży. Tak jak dotychczas największą czułość i swoistość uzyskano po zastosowaniu połączenia badań fizykalnych (MAP), obrazowych (UtA PI) z biochemicznymi (sFlt-1/PIGF ratio). Możliwe zastosowanie kliniczne oznaczania PIGF lub wskaźnika sFlt-1/PIGF prezentuje schemat 2.

Przedmiotem tej publikacji była preeklampsja, gdyż ukazało się najwięcej doniesień, dotyczących przydatności zastosowania wskaźnika sFlt-1/PIGF w tym zespole klinicznym. Warto jednak zaznaczyć, że markery zaburzonej angiogenezy sFlt-1 i PIGF wykazują nieprawidłowości również w innych zespołach związanych z hipoperfuzją i niedokrwieniem łożyska. Podobny profil zmian markery te wykazują w zespołach zahamowania wzrastania płodów (IUGR), czy niektórych przypadkach przedwczesnego oddzielenia łożyska.

Schemat 2.

Możliwe zastosowania sFlt-1 i PIGF w predykcji, diagnostyce i monitorowaniu preeklampsji.



Biomarkery w diagnostyce raka płuca

Nowe perspektywy

Dr n. med. Adam Szpechciński, Zakład Genetyki i Immunologii Klinicznej Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, Warszawa.

Rak płuca jest główną przyczyną zgonów na choroby nowotworowe na świecie (1,59 mln przypadków śmiertelnych w 2012). W Polsce jest najczęściej występującym nowotworem u mężczyzn i drugim, po raku piersi u kobiet. W 2013 roku w Polsce liczba zachorowań na nowotwory złośliwe płuc wynosiła blisko 21 tys. przypadków, a zgonów nieco ponad 22 tys. (16 tys. mężczyzn i 6,5 tys. kobiet). Tak wysoka śmiertelność wynika z faktu, że większość chorych jest diagnozowana w zaawansowanym stadium choroby, kiedy możliwość zastosowania skutecznego leczenia chirurgicznego jest ograniczona.

Brak jest również satysfakcjonującej efektywności standardowej chemioterapii i radioterapii. Obecnie prowadzone są intensywne poszukiwania i próby wdrożenia nowych, skuteczniejszych metod diagnozowania i leczenia raka płuca. Badania te opierają się głównie na rozwoju nieinwazyjnych metod wczesnego wykrywania choroby opartych na specyficznych biomarkerach nowotworowych, krążących we krwi chorego oraz identyfikacji wiarygodnych biomarkerów predykcyjnych, pozwalających na indywidualny dobór optymalnej strategii leczenia dla każdego chorego (rozwój terapii personalizowanej).

Biomarker nowotworowy (od słowa: biologiczny marker) najczęściej definiuje się jako biologiczny lub fizjologiczny wskaźnik toczącego się procesu nowotworowego w organizmie. Za biomarker nowotworowy może być zatem uważana określona molekula uwalniana specyficznie przez komórki nowotworu do krwiobiegu lub obecna w innym płynie ustrojowym czy tkance guza, której obiektywny pomiar jakościowy i/lub ilościowy metodami laboratoryjnymi sygnalizuje zachodzenie określonych procesów patologicznych albo odpowiedź na interwencję terapeutyczną, ekspozycję na działanie czynnika szkodliwego. Biomarkery możemy podzielić ze względu na ich naturę fizyko-chemiczną lub biologiczną (np. biochemiczne, immunologiczne, molekularne) oraz możliwości wykorzystania w praktyce onkologicznej (np. diagnostyczne, prognostyczne, predykcyjne, pomocne w monitorowaniu skuteczności terapii).

Diagnostyczne i prognostyczne biomarkery raka płuca

1. Biochemiczne biomarkery serologiczne

Biochemiczne biomarkery nowotworowe we krwi dowiodły swojej przydatności w diagnozowaniu i prognozowaniu przeżycia chorych na różne typy nowotworów w ciągu kilku ostatnich dekad. Pomimo identyfikacji szeregu bardzo obiecujących pod względem przydatności klinicznej biomarkerów serologicznych dla raka płuca, ich faktyczna wartość diagnostyczna i prognostyczna nadal pozostaje tematem wielu kontrowersji. Biomarkery te można podzielić na kilka kategorii w zależności od ich właściwości biologicznych [Tabela 1]. Chociaż analiza tych markerów jest często włączana w schemat rutynowej diagnostyki laboratoryjnej pacjentów z podejrzeniem raka płuca to nadal brak jest wyraźnych zaleceń i standardów ich zastosowania klinicznego.

Wynika to między innymi z niewłaściwego planowania pewnych badań walidujących kliniczne aplikacje tych markerów, w których kohorty chorych dobierano według typu histologicznego raka płuca (rak drobnokomórkowy, DRP *versus* niedrobnokomórkowy, NDRP), pomijając właściwe zbalansowanie grup różniących się podtypem histologicznym (rak płaskonabłonkowy, gruczołowy, wielkokomórkowy). Ponadto, ocena wartości diagnostycznej pojedynczych biomarkerów w raku płuca przynosiła rozczarujące rezultaty z uwagi na możliwość występowania podwyższonych poziomów tych antygenów w szeregu innych chorób nienowotworowych. Brakowało również konsensusu wobec optymalnych wartości granicznych (punktu odcięcia, *cutoff*) stężeń tych markerów w surowicy krwi.

Największy postęp w badaniach nad diagnostycznym wykorzystaniem tych biomarkerów w klinice raka płuca dotyczy doboru optymalnego panelu antygenów, prezentujących wspólnie najlepsze parametry diagnostyczne. Serologiczne antygeny CEA, CYFRA 21-1, SCC-Ag, NSE i ProGRP, oznaczane ilościowo we krwi za pomocą technik immunologicznych (dostępne są zautomatyzowane systemy laboratoryjne), oferują obecnie największą przydatność kliniczną jako badanie uzupełniające dane uzyskane z technik obrazowych i biopsji w toku postępowania diagnostycznego w przypadkach z podejrzeniem raka płuca [Schemat 1]. W badaniu Molina R. i wsp. z 2016 roku z udziałem ponad 3 tysięcy chorych na DRP (n=265) i NDRP (n=1653) oraz różne patologie niezłośliwe (n=1316), u których mierzono poziomy CEA, CYFRA 21-1, CA 15-3, SCC-Ag, NSE i ProGRP, wykazano znaczącą poprawę parametrów diagnostycznych: czułości (88,5%), specyficzności (82%), dodatniej (87,3%) i ujemnej (83,7%) wartości predykcyjnej w identyfikacji przypadków raka płuca w oparciu o jednoczesną analizę całego panelu 6 antygenów, aniżeli pomiar indywidualnych biomarkerów. Około połowy przypadków raka płuca (bez różnicowania typu histopatologicznego) prezentowało podwyższone poziomy CEA i CYFRA 21-1 w stosunku do kohort kontrolnych. Z kolei największą przydatność we wstępnym różnicowaniu DRP od NDRP wykazywały NSE i ProGRP (blisko 80% chorych na DRP). Obecnie prowadzone są badania weryfikujące przydatność diagnostyczną kombinacji konwencjonalnych biomarkerów biochemicznych z markerami molekularnymi lub immunologicznymi we wczesnym wykrywaniu raka płuca w grupie podwyższonego ryzyka.

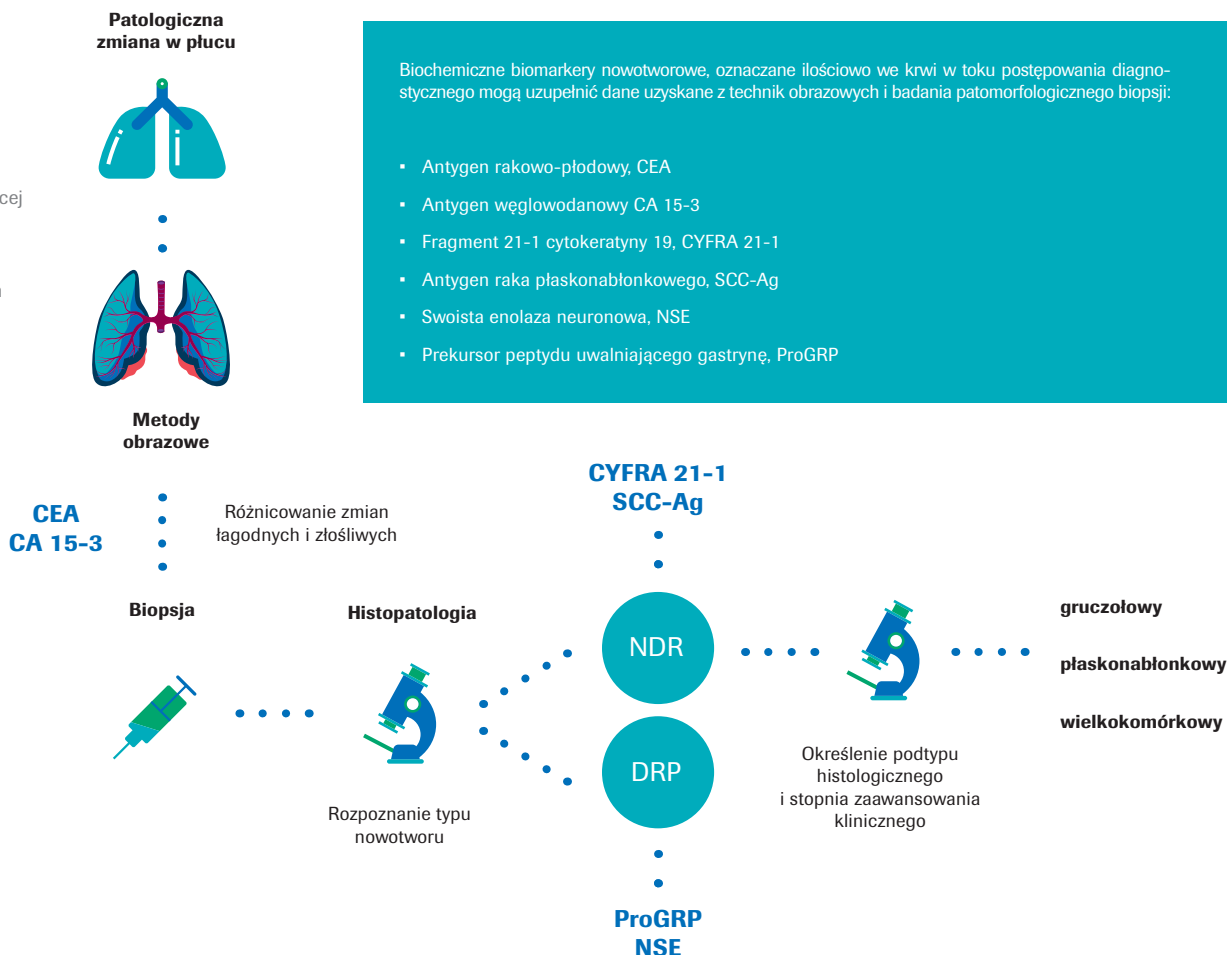
Tabela 1.

Konwencjonalne biomarkery biochemiczne we krwi wykorzystywane w diagnozowaniu i prognozowaniu chorych na raka płuca.

Grupa	Marker serologiczny	Wartość diagnostyczna i prognostyczna
Białka płodowe	Antygen rakowo-płodowy, CEA	Negatywny marker prognostyczny (mierzony przed leczeniem) u chorych na wczesne postaci NDRP, zwłaszcza gruczołowego. Dobrym wskaźnik obecności odległych przerzutów w organizmie chorego na NDRP. Przydatny w monitorowaniu skuteczności leczenia zarówno DRP i NDRP.
Białka strukturalne komórek	Fragment 21-1 cytokeratyny 19, CYFRA 21-1	Silny marker prognostyczny dla oceny czasu przeżycia chorych na NDRP, zwłaszcza podtypu płaskonabłonkowego, przed leczeniem operacyjnym.
	Tkankowy antygen polipeptydowy, TPA	Skuteczność TPA jako markera prognostycznego jest bardzo zbliżona do CYFRA21-1 ponieważ obydwa antygeny dzielą ten sam cytoszkieletowy komponent.
Enzymy	Swoista enolaza neuronowa, NSE	Marker pomocny w diagnostyce, monitorowaniu oraz ocenie efektywności terapii u chorych na DRP. Niska swoistość diagnostyczna. Częstość podwyższonych wyników oraz stężenie NSE wykazują wyraźną zależność od stadium zaawansowania choroby. Udokumentowana istotna zależność pomiędzy czasem przeżycia chorych a wyjściowym stężeniem NSE.
Glikoproteina	Antygen nowotworowy CA 15-3	Nieswoisty marker pomocy w diagnostyce szeregu nowotworów złośliwych, w tym raka niedrobnokomórkowego płuca.
Antygeny powierzchniowe komórek	Antygen węglowodanowy CA 19-9	Nieswoisty marker pomocy w diagnostyce szeregu nowotworów złośliwych, w tym raka niedrobnokomórkowego płuca.
	Antygen węglowodanowy CA-125	Wysokie poziomy antygenu obserwuje się u chorych na gruczołowy podtyp NDRP, często w korelacji ze stadium zaawansowania.
	Antygen raka płaskonabłonkowego, SCC-Ag	Dodatnie wyniki częste u chorych na zaawansowane postaci NDRP. Brak jednoznacznie potwierdzonej wartości prognostycznej dla chorych we wczesnych stadiach leczonych operacyjnie.
	Siałowany antygen Lewisa, sLeX	Wysoka specyficzność wobec płaskonabłonkowego podtypu NDRP (około 85%). Marker pomocny w diagnostyce biochemicznej przypadków bez potwierdzonego podtypu histologicznego. Brak jednoznacznego potwierdzenia wartości prognostycznej. Nadekspresja markera częsta w tkance nowotworowej i surowicy chorych na NDRP, w szczególności podtyp gruczołowy. Brak potwierdzonej wartości prognostycznej.
Hormony	Prekursor peptydu uwalniającego gastrynę, ProGRP	Wysoka czułość diagnostyczna ProGRP u chorych na DRP (od 65 do 86%) przy specyficzności powyżej 90%. Znacząco poprawia efektywność diagnostyki biochemicznej chorych we wczesnym stadium zaawansowania.

Schemat 1.

Schemat obrazujący możliwości wykorzystania panelu biomarkerów biochemicznych we krwi we wstępnej diagnostyce różnicującej jako uzupełnienie konwencjonalnych metod obrazowych i patomorfologicznych w toku postępowania diagnostycznego u chorych z podejrzeniem raka płuca.



2. Nowe markery immunologiczne i molekularne oznaczane w osoczu/surowicy krwi

Badania nad identyfikacją i charakterystyką klinicznej wartości markerów immunologicznych i proteomicznych krążących we krwi obwodowej nabrały szczególnego tempa w ostatniej dekadzie, przede wszystkim dzięki rozwojowi takich technik jak spektrometria mas i mikromacierze białkowe (*protein microarray*). Dalsza walidacja konkretnych kandydatów białko-

wych wyselekcjonowanych przez metody przesiewowe wymaga rozwoju specyficznych przeciwciał monoklonalnych, dzięki którym możliwe jest opracowanie, standaryzacja i praktyczne wdrożenie testu diagnostycznego opartego na jednej z metod powszechnie wykorzystywanych w analizie medycznej, jak ELISA, turbidymetria, chemiluminescencja itd. Nie mniej intensywne są prace nad rozwojem testów diagnostycznych opartych na unikalnych sygnałach genetycznych (mutacje DNA) i epigenetycznych (ekspresja mikroRNA, metylacja genów) raka płuca [Tabela 2].

Tabela 2.

Innowacyjne testy diagnostyczne rozwijane w oparciu o markery molekularne, przeznaczone do wczesnego, nieinwazyjnego wykrywania raka płuca.

Komercyjna nazwa testu (Producent)	Biomarker	Metoda detekcji	Czułość (%)	Specyficzność (%)	Walidacja testu	Zastosowanie
microRNA Signature Classifier (Gensignia)	Profil ekspresji mikroRNA w osoczu krwi	Mikromacierze użyciem sond typu TaqMan	87	81	939 osób z grupy ryzyka poddanych badaniu CT płuca; w tym 60 przypadków raka płuca (badanie MILD)	Screening populacji podwyższonego ryzyka raka płuca w połączeniu z badaniem CT
EarlyCDT-Lung (Oncimmune)	Panel 7 autoprzeciwciał przeciwko TAA we krwi	ELISA	41	93	1691 osób z grupy podwyższonego ryzyka raka płuca; w tym 61 przypadków raka płuca	Screening populacji podwyższonego ryzyka raka płuca w połączeniu z badaniem CT
PAULA's Test (Genesys Biolabs)	Panel 3 antygenów nowotworowych (CEA, CA-125 i CYFRA 21-1)+1 TAA we krwi	Automatyczny analizator immunoenzymatyczny xMAP	74	80	230 osób z łagodnymi SNP lub innymi typami nowotworów; w tym 115 przypadków raka płuca	Identyfikacja kandydatów do pogłębionej diagnostyki wśród chorych dodatnim wynikiem CT płuca
Xpresys Lung (INDI DX)	Profil krążących białek we krwi	Spektrometria mas (analiza proteomiczna)	70-92	48-20	141 chorych z guzkiem o średnicy 8-30 mm w obrazie radiologicznym; w tym 78 przypadków raka płuca	Identyfikacja kandydatów do pogłębionej diagnostyki wśród chorych z dodatnim wynikiem CT płuca (SNP o średnicy 8-30 mm)
EarlyTect Lung Cancer (Genomictree)	Status metylacji genu PCDHGA12 w cfDNA, materiale bronchoskopowym lub płwocinie indukowanej	Real-time PCR	85	84	270 osób z grupy podwyższonego ryzyka raka płuca; w tym 137 przypadków raka płuca	Screening w populacji podwyższonego ryzyka raka płuca
Percepta Bronchial Genomic Classifier (Veracyte)	Profil ekspresji mRNA 23 genów w materiale bronchoskopowym	Mikromacierze	88	47	341 osób z grupy ryzyka poddanych bronchoskopii; w tym 266 przypadków raka płuca	Wczesne wykrywanie raka płuca wśród chorych z dodatnim wynikiem CT płuca poddanych bronchoskopii

2.1. Autoprzeciwciała

Odkrycie i identyfikacja we krwi autoprzeciwciał skierowanych przeciwko antygenom na powierzchni komórek nowotworowych (*tumor-associated antigens*, TAAs) otworzyły nowy obszar dla poszukiwań biomarkerów diagnostycznych raka płuca. Wykazano, że wykrycie przeciwciał anti-TAAs we krwi jest możliwe na długo (1-5 lat) przed pierwszymi objawami raka płuca, co czyni je idealnymi kandydatami na biomarkery pomocne w badaniach przesiewowych grup ryzyka i wczesnym wykrywaniu choroby. Pierwszy komercyjnie dostępny test diagnostyczny, mierzący poziom autoprzeciwciał przeciwko 7 różnym TAAs we krwi wykazuje czułość na poziomie 40% przy ponad 90% specyficzności w identyfikacji chorych na raka płuca już we wczesnych stadiach zaawansowania pośród osób z grupy podwyższonego ryzyka. W innym teście, połączenie detekcji konwencjonalnych markerów serologicznych

(CEA, CA-125, CYFRA 21-1) i TAA pozwoliło uzyskać 74% czułość i 80% specyficzność detekcji raka płuca wśród pacjentów z dodatnim badaniem radiologicznym płuca. Obecnie prowadzone są intensywne badania naukowe mające na celu optymalizację panelu wykrywanych TAAs i poprawę parametrów diagnostycznych testów.

2.2. Profile proteomiczne surowicy

Chromatograficzna analiza proteomu surowicy krwi ujawniła ponad 3700 różnych wariantów białkowych, pochodzących z różnych tkanek organizmu, uwalnianych do krwiobiegu w sposób aktywny lub pochodzących z rozpadu komórek. Badania proteomiczne surowicy chorych na raka płuca z użyciem metod o dużej przepustowości pozwoliły zidentyfikować unikalne dla tej choroby profile białkowe (sygnatury proteomiczne), które z dużą mocą

diagnostyczną (czułość 94,3%; specyficzność 85,9%) różnicując zmiany złośliwe od łagodnych, wykryte w badaniu radiologicznym osób z grupy ryzyka. Rozwijane są pierwsze komercyjne testy diagnostyczne oparte na analizie panelu wyselekcjonowanych białek surowicy [Tabela 2]. Wydaje się, że takie testy mogłyby uzupełnić konwencjonalne metody diagnostyki obrazowej (CT, PET), charakteryzujące się wysoką czułością, lecz dość niską specyficznością badania.

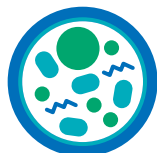
2.3. Pozakomórkowe mikroRNA

Drugim, równie obiecującym kierunkiem rozwoju krążących biomarkerów molekularnych, pomocnych w wykrywaniu raka płuca we wczesnych stadiach zaawansowania jest badanie pozakomórkowego materiału genetycznego we krwi obwodowej, a zwłaszcza profilowanie pozakomórkowych mikroRNA (miRNA). miRNA

to klasa niekodujących, endogennych i jednoniciowych RNA o stosunkowo małych cząsteczkach o długości 19-22 nukleotydów, które funkcjonują w komórkach jako regulatory ekspresji genów. U człowieka zidentyfikowano ponad 2500 różnych sekwencji miRNA. Badania naukowe wielu grup potwierdziły występowanie miRNA w różnych płynach ustrojowych człowieka, m.in. surowicy i osoczu krwi. Obecność i profil miRNA w płynach ustrojowych może bezpośrednio odzwierciedlać stan fizjologiczny organizmu, a przede wszystkim różne procesy chorobowe. Istotnie zwiększone lub zmniejszone uwalnianie pewnych miRNA do krwiobiegu jest charakterystyczne dla poszczególnych typów nowotworów, również raka płuca. Obecnie próbkę krwi obwodowej, pobieranej od chorego na nowotwór złośliwy w celu nieinwazyjnego badania molekularnego statusu szeregu biomarkerów epi-/genetycznych najczęściej określa się mianem płynnej biopsji [*liquid biops*; Schemat 2].

Schemat 2.

Schemat przedstawia możliwości wykorzystania krwi obwodowej chorego na raka płuca jako płynnej biopsji w nieinwazyjnej diagnostyce molekularnej choroby, opartej na analizie specyficznych biomarkerów genetycznych i epigenetycznych w pozakomórkowych kwasach nukleinowych oraz krążących komórkach nowotworowych (Circulating Tumor Cells, CTCs).



Pozakomórkowe
DNA



Pozakomórkowe
mikroRNA



Krążące komórki
nowotworowe CTC

- | | | |
|--|---|----------------------|
| • Stężenie cfDNA | • | real-time PCR |
| • Integralność cfDNA | • | droplet-digital PCR |
| • Mutacje somatyczne | • | BEAMing |
| • Metylacja promotora | • | sekwencjonowanie NGS |
| • Rearanżacje genów | • | |
| • Profile ekspresji miRNA | • | real-time PCR |
| • Bioinformatyka: selekcja potencjalnych celów terapeutycznych | • | mikromacierze |
| | • | NanoString |
| | • | sekwencjonowanie NGS |
| • Liczba CTCs | • | real-time PCR |
| • Zmiany genetyczne | • | droplet-digital PCR |
| • Ekspresja mRNA genów | • | sekwencjonowanie NGS |
| • Białka/fosforylacja | • | FISH |
| • Hodowla <i>in vitro</i> | • | immunofluorescencja |

Pobranie krwi od
chorego na raka płuca



Separacja osocza
od frakcji komórkowej



Biomarkery w krążącym
nowotworowym materiale
genetycznym i komórkowym



Analiza molekularna

Wysoką moc diagnostyczną testów opartych na unikalnych wobec NDRP profilach ekspresji różnych sekwencji miRNA (sygnaturach epigenetycznych) wykazano w kilku badaniach przesiewowych z udziałem osób z grup wysokiego ryzyka raka płuca. W badaniu MILD oceniano diagnostyczną przydatność panelu pozakomórkowych miRNA jako biomarkerów uzupełniających badanie tomograficzne klatki piersiowej w grupie 939 palaczy tytoniu w wieku powyżej 50 lat [Tabela 2]. Ocena ekspresji miRNA w osoczu pozwoliła wykryć przypadki raka płuca z 87% czułością i 81% specyficznością oraz 99% ujemną wartością predykcyjną (NPV). Co ważne, połączona analiza wyników ekspresji miRNA i badania tomograficznego skutkowała pięciokrotnym zmniejszeniem odsetka wyników fałszywie dodatnich w metodzie obrazowej. Bardzo zbliżone wyniki uzyskano w badaniu COSMOS (1115 palaczy tytoniu powyżej 50 r. życia), gdzie analizowano panel 13 unikalnych miRNA (czułość 79,2%, specyficzność 75,9%, NPV 99%). Prognostyczna wartość pozakomórkowych miRNA w raku płuca nie została jednoznacznie potwierdzona z uwagi na brak wystandaryzowanego protokołu badawczego, a przez to niską powtarzalność i odtwarzalność wyników badań różnych autorów.

Biomarkery predykcyjne w leczeniu NDRP

Podczas, gdy zastosowanie metod molekularnych w nieinwazyjnej diagnostyce wczesnych postaci choroby i ocenie rokowania u chorych na raka płuca nadal pozostaje w sferze badań, molekularne markery predykcyjne znajdują już zastosowanie w personalizowanej terapii NDRP. Koncepcja personalizowanej terapii NDRP zakłada dobór optymalnego leczenia dla konkretnych grup pacjentów w oparciu o zrozumienie różnic w przebiegu procesu nowotworowego na poziomie molekularnym pomiędzy osobami chorującymi na tę samą chorobę.

1. Biomarkery predykcyjne w leczeniu ukierunkowanym molekularnie

Aktualnie najpowszechniej stosowaną formą personalizowanej terapii zaawansowanych postaci NDRP jest leczenie ukierunkowane molekularnie (*targeted therapy*, terapia celowana) z zastosowaniem inhibitorów kinazy tyrozynowej receptora naskórkowego czynnika wzrostu (IKT EGFR). W leczeniu NDRP korzystna

odpowiedź na leki z grupy IKT EGFR (erlotynib, gefitynib, afatynib, ozymertynib) warunkowana jest obecnością somatycznych mutacji w genie *EGFR* (mutacji punktowych i małych delecji w eksonach 18-21 genu), które dotyczą około 10% chorych (dla rasy kaukaskiej), głównie tych z podtypem raka gruczołowego płuca, niepalących, nieznacznie częściej kobiet i osób po 65. roku życia. Zidentyfikowano ponad 188 różnych mutacji *EGFR*, lecz u 85% chorych na NDRP, którzy odpowiadają na leczenie IKT EGFR wykrywa się dwa najczęstsze typy mutacji: niewielkie delecje w obrębie eksonu 19 (45-50%) oraz mutację punktową L858R w eksonie 21 (40-45%).

1.1. Analiza zmian molekularnych warunkujących skuteczność leczenia IKT EGFR

Największym ograniczeniem stosowania IKT EGFR jest oporność na te leki. Może ona mieć charakter pierwotny, warunkowany głównie przez tzw. mutacje oporności, od początku obecne w komórkach guza, równoległe do mutacji aktywujących, albo charakter nabyty, kiedy mutacje oporności i inne zmiany epi-/genetyczne rozwijają się w trakcie terapii IKT EGFR. Niemal wszyscy chorzy na niedrobnokomórkowego raka płuca, którzy początkowo wykazują korzystną odpowiedź na IKT EGFR, z czasem nabywają oporność na te leki, zwykle między 9 a 12 miesiącem leczenia. Zrozumienie mechanizmów oporności nabywanej przez chorych w trakcie pierwszej linii leczenia IKT EGFR (erlotynib, gefitynib, afatynib) ma szczególne znaczenie dla wyboru późniejszej strategii terapeutycznej (leczenie II linii). Do najczęstszych mechanizmów pierwotnej i nabytej oporności na leczenie IKT EGFR zalicza się mutacje oporności w genie *EGFR* (T790M, D761Y, L747S, T854A, C797S), zmiany w szlaku sygnałowym MAPK/ERK (muta-

cje genów *KRAS* i *BRAF*), aktywację obocznych ścieżek sygnałowych (amplifikacja *MET*, nadekspresja *HGF*, mutacje w genie *PIK3CA*, utrata *PTEN*, fuzja genów *EML4-ALK*). Szacuje się, że u 30% chorych mechanizmy nabytej oporności na IKT EGFR są wciąż nieznane.

Wraz z pogłębianiem naszej wiedzy w zakresie mechanizmów molekularnych, warunkujących skuteczność leczenia inhibitorami kinazy tyrozynowej EGFR rośnie również potrzeba poszerzenia listy zaburzeń genetycznych analizowanych w ramach rutynowej diagnostyki molekularnej raka płuca. Już dziś wydaje się oczywistym fakt, że najpowszechniej wykorzystywane metody diagnostyki molekularnej, real-time PCR, FISH, sekwencjonowanie sangerowskie, nie będą w stanie same zapewnić wystarczającej mocy przerobowej dla większej liczby badanych genów i nowych terapii celowanych. Sekwencjonowanie nowej generacji (NGS) już dziś oferuje rozwiązania komercyjne dedykowane do pogłębionej diagnostyki punktowych mutacji somatycznych, insercji i delecji w obrębie kilkudziesięciu genów tworzących główne szlaki sygnałowe, zaangażowane w odpowiedź na leczenie IKT EGFR.

1.2. Pozakomórkowe DNA we krwi obwodowej

Analiza pozakomórkowego DNA krążącego w krwiobiegu (*cell-free DNA*, *cfDNA*) chorego na nowotwór jest obecnie wdrażana w diagnostykę molekularną zaawansowanego raka płuca jako alternatywa dla badania tkanki nowotworowej, przede wszystkim w tych przypadkach, gdy tradycyjna biopsja nie jest możliwa lub pozyskany tą drogą materiał tkankowy jest z różnych przyczyn nieadekwatny do badania. Krew obwodowa jako płynna

Roche Diagnostics Lung Oncology Portfolio

Od diagnozy do monitorowania

Diagnoza				Prognoza	Monitoring
IHC C-MET Calretinin Cam 5.2 Caveolin -1 CD56 CEA Chromogranin A CK5 CK5/6 CK5/14 CK7	IHC CK17 CK20 Desmoglein 3 E-cadherin EGFR EMA Epithelial -Related Antigen Epithelial -Specific Antigen HBME -1 IGF-1R KI-67	IHC MUC1 Napsin A NSE p40 p63 Pan Keratin SOX -2 Synaptophysin TAG -72 TTF -1 WT1	H&E VENTANA HE 600	IHC ALK PD - L1	IC CEA CYFRA 21 -1 NSE Pro GRP PCR (Osocze) EGFR
			IC (Pomoc w diagnozie) CYFRA 21 -1 ProGRP SCC	PCR (Tkanka) EGFR KRAS	
			IC (Diagnostyka różnicująca) ProGRP (SCLC vs. NSCLC)	PCR (Osocze) EGFR	

Badania Kliniczne

PCR (Osocze) KRASv2 (LSR) EGFR (RUO)	NGS (Osocze/Płynna Biopsja) AVENIO ctDNA Targeted Kit (RUO) AVENIO ctDNA Expanded Kit (RUO) AVENIO ctDNA Surveillance Kit (RUO)
---	---

Legenda

- Hematoxylin & Eosin Stain (H&E)
- Immunohistochemistry (IHC)
- Immunochemistry (IC)
- Next Generation Sequencing (NGS)
- Polymerase Chain Reaction (PCR)

RUO = Research Use Only. Not for diagnostic use

LSR = Life Science Research Only. Not for diagnostic use

biopsja dostarcza pozakomórkowe DNA pochodzące z różnych lokalizacji ognisk nowotworowych (z guza pierwotnego, z odległych przerzutów, z krążących we krwi mikroprzerzutów) oraz różnych klonów komórek rakowych, pomijając do pewnego stopnia problem heterogenności tkanki nowotworowej. Należy także podkreślić, że cfDNA uwalniane jest przez komórki nowotworowe (opisano szereg mechanizmów tego zjawiska) w sposób ciągły, zapewniając dostateczną ilość materiału genetycznego do analiz molekularnych przez cały okres rozwoju choroby nowotworowej. W przypadku diagnostyki mutacji genu *EGFR*, chorzy na NDRP z dodatnim wynikiem badania płynnej biopsji odnoszą podobne korzyści kliniczne z leczenia inhibitorami, jak ci kwalifikowani na podstawie badania tkanki, co wykazano między innymi w międzynarodowych badaniach klinicznych EURTAC i AURA3. Zalecane jest stosowanie specjalnych próbek hematologicznych, przedłużających trwałość pozakomórkowego DNA w płynnej biopsji oraz odczynników i metod walidowanych do analizy tego unikalnego materiału biologicznego.

1.3. Monitorowanie leczenia ukierunkowanego molekularnie

Wdrożenie analizy płynnej biopsji do diagnostyki mutacji *EGFR* oferuje także możliwość ciągłego monitorowania statusu zmian molekularnych warunkujących skuteczność działania leków z grupy IKT *EGFR* w trakcie trwania leczenia. Aktualne badania dotyczą przede wszystkim perspektywy nieinwazyjnego śledzenia poziomu cfDNA zawierającego mutację oporności T790M genu *EGFR* w celu wczesnego wykrywania progresji choroby, zanim będzie to widoczne w badaniu obrazowym płuc. Pierwsze opublikowane prace dowodzą, że u chorych leczonych IKT *EGFR* I linii (erlotynib, gefitynib) wzrost poziomu cfDNA z mutacją T790M we krwi poprzedza kliniczną diagnozę progresji nawet o kilka miesięcy. Szybkie wdrożenie leczenia II linii z zastosowaniem inhibitorów znoszących hamujące działanie mutacji T790M (ozymertynib) znacząco zwiększałoby skuteczność terapii i wydłużyło przeżycie chorych.

2. Biomarkery predykcyjne w immunoterapii NDRP

Postęp badań naukowych nad lepszym zrozumieniem mechanizmów odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko komórkom nowotworu zaowocował w ostatnich latach rozwojem nowej strategii leczenia zaawansowanego NDRP, immunoterapii opartej na inhibitorach immunologicznych punktów kontrolnych (*ang. immune checkpoint inhibitors*). Leki te specyficznie blokują szlaki sygnałowe pozostające pod kontrolą białka receptorowego PD-1 (programmed cell death protein-1) i jego ligandu PD-L1 (programmed cell death ligand-1). Badanie kliniczne inhibitorów PD-1/PD-L1 wykazały skuteczność tych leków u chorych na zaawansowane postaci NDRP. Obecnie w obrocie dostępne są trzy leki z grupy inhibitorów immunologicznych punktów kontrolnych: pembrolizumab (zatwierdzony do leczenia NDRP z potwierdzoną ekspresją PD-L1), nivolumab i atezolizumab (*leczenie niezależnie od ekspresji PD-L1 na komórkach NDRP*).

2.1. Immunohistochemiczna ocena ekspresji PD-L1

Ekspresja cząsteczki PD-L1 na powierzchni komórek nowotworowych wydaje się być najbardziej oczywistym czynnikiem predykcyjnym terapii przeciwciałami anti-PD-1 i anti-PD-L1.

Białko PD-L1 występuje na komórkach większości typów nowotworów, przy czym u około 32% raków gruczołowych i 30,5% raków płaskonabłonkowych płuca. Jednak PD-L1 obecne jest także na komórkach prezentujących antygen, które regulują odpowiedź immunologiczną ze strony limfocytów T efektorowych w węzłach chłonnych. Ekspresja PD-L1 jest oceniana za pomocą barwienia immunohistochemicznego (IHC) z wykorzystaniem różnych klonów przeciwciał oraz protokołów barwienia, zarówno w systemie detekcji manualnym, jak i automatycznym. Wobec kontrowersji związanych z efektywnością rokowania odpowiedzi chorych na immunoterapię jedynie w oparciu o badanie ekspresji PD-L1 na komórkach nowotworu, nadal poszukuje się dodatkowych biomarkerów predykcyjnych dla tej strategii leczenia raka płuca. Wśród badanych kandydatów są m.in. ekspresja PD-L1 na komórkach układu immunologicznego chorego (limfocytach T, komórkach dendrytycznych, makrofagach), markery aktywacji układu immunologicznego oraz ogólne obciążenie nowotworu mutacjami somatycznymi (total mutational load TML; total mutational burden TMB).

2.2. Obciążenie mutacjami somatycznymi

Badania kliniczne wykazały, że czerniak oraz niedrobnokomórkowy rak płuca należą do nowotworów o najwyższym wskaźniku obciążenia mutacjami somatycznymi, co z kolei istotnie koreluje z odsetkiem odpowiedzi na immunoterapię w tych typach nowotworów. Analiza materiału nowotworowego, najczęściej w postaci FFPE lub cytobloku, pod kątem obciążenia mutacjami somatycznymi wymaga zaprzęgnięcia jednej z techniki NGS, sekwencjonowania całego eksomu (WES). Sekwencjonowanie DNA metodą WES pozwala zidentyfikować te zaburzenia genetyczne (mutacje), które mają bezpośredni wpływ na strukturę i funkcjonowanie białek, stanowiących nową klasę neoantygenów nowotworowych. Pierwsze badania kliniczne z udziałem chorych leczonych inhibitorami PD-1/PD-L1 wykazały większe korzyści terapeutyczne u pacjentów z wysokim wskaźnikiem TMB w postaci istotnie dłuższej mediany czasu leczenia oraz dłuższego czasu przeżycia wolnego od progresji.

Podsumowanie

Od czasu zdefiniowania na nowo raka płuca, jako choroby genetycznej, zmieniło się również podejście do diagnozowania i leczenia tej patologii, skutkując rozwojem medycyny spersonalizowanej. Wyniki badań publikowanych na przestrzeni ostatnich lat wyraźnie wyznaczają kierunek dalszego rozwoju diagnostyki raka płuca w oparciu o nieinwazyjne techniki pozyskiwania materiału nowotworowego do badania i analizę szeregu specyficznych markerów molekularnych za pomocą bardzo czułych metod laboratoryjnych. Choć podstawę diagnostyki raka płuca stanowi materiał tkankowy, wykorzystanie krwi obwodowej w badaniach przesiewowych, wczesnym wykrywaniu choroby oraz różnicowaniu zmian złośliwych od łagodnych coraz bardziej zyskuje na znaczeniu; już dziś odnotowuje się pierwsze korzyści kliniczne wynikające z wdrożenia płynnej biopsji w schemat kwalifikacji chorych do terapii celowanych. Nie mniej ważny jest intensywny rozwój nowych technik diagnostycznych, zwłaszcza tych wysoko-przepustowych, z uwagi na fakt szybko rosnącej liczby nowych markerów molekularnych, których wartość kliniczna zostanie potwierdzona w ciągu kilku najbliższych lat.

Ślina - nowe perspektywy oznaczeń biomarkerów w diagnostyce medycznej

Dr Zbigniew P. Bartoszewicz, Laboratorium Naukowe Katedry i Kliniki Chorób Wewnętrznych i Endokrynologii WUM, Warszawa.

Ślina jest złożonym płynem wydzielniczym produkowanym w ilości około 0,75-1,5 l w ciągu doby przez ślinianki (ślina właściwa). Materiałem biologicznym używanym najczęściej w diagnostyce medycznej jest ślina mieszana - płyn obecny w jamie ustnej, który poza śliną właściwą zawiera również płyn dziąsłowy, przesięk surowicy krwi, komórki, bakterie, wirusy, resztki pokarmowe oraz wydzieliny z gardła i nosa.

Głównym składnikiem śliny jest woda (ok. 99,5%), związki nieorganiczne stanowią ok. 0,2%, organiczne ok. 0,3%. Podstawowymi składnikami organicznymi śliny są białka peptydy, (między innymi — enzymy, białka osocza, mucyny, immunoglobuliny, substancje grupowe krwi, kalikreina, laktoferyna, czynniki wzrostu, histatyna, cystatyna, stateryna sialina), mocznik, kreatynina, cukry (glukoza), lipidy, hormony steroidowe i witaminy. Tylko niewielka część ponad 2000 scharakteryzowanych związków organicznych jest bezpośrednio syntetyzowana i wydzielana przez gruczoły ślinowe, zdecydowana większość występuje również w osoczu i w aktywnym bądź biernym mechanizmie jest do śliny transportowana. Ślina ze względu na łatwość nieinwazyjnego pobrania, które najczęściej nie wymaga obecności personelu medycznego, znajduje coraz szersze zastosowanie w diagnostyce laboratoryjnej na świecie. Jej przydatność w badaniach rutynowych w Polsce jest niedoceniana i ogranicza się głównie do badań DNA i RNA celu dalszej ich analizy w testach genetycznych, oznaczeń kortyzolu (rzadziej innych hor-

monów steroidowych) oraz testów kontrolujących stężenia używek (np. alkoholu oraz podstawowych narkotyków). Ślina ze względu na większe niż we krwi fluktuacje występujących w niej biomarkerów oraz zależność końcowego wyniku oznaczenia od wielu czynników dodatkowych (np. stanu jamy ustnej, zmiennej dobowo szybkości wydzielania, wpływu diety i wysiłku) nie jest uniwersalnym materiałem biologicznym do badań, ale wielu przypadkach stanowi obok moczu najlepszą alternatywę lub uzupełnienie dla osocza i surowicy.

Dotychczasowe zastosowanie

Poza oznaczeniami biomarkerów związanymi z chorobami jamy ustnej, DNA, RNA, przeciwciałami HIV-1/HIV-2 oraz narkotykami i alkoholem, ślina znalazła najszersze zastosowanie do oznaczenia stężeń lipofilnych, nieskonjugowanych hormonów steroidowych oraz amin cyklicznych [Tabela 1].

Tabela 1.

Oznaczenia stężenia hormonów steroidowych i amin cyklicznych.

Nazwa hormonu	Zastosowanie
Hormony steroidowe	
Testosteron (T)	Diagnostyka hirsutyзму u kobiet Diagnozowanie hipogonadyzmu i monitorowanie deficytu androgenów u mężczyzn Wykrywanie dopingu w sporcie Jako marker stopnia wytrenowania sportowców (iloraz stężenia T/kortyzolu)
Progesteron (P), 17-OH-progesteron (17OHP)	Ocena indeksu owulacji Monitorowanie uwalniania hormonu podczas hormonalnej terapii zastępczej (HTZ) Ocena funkcji łożyska (skrining wrodzonego przerostu nadnerczy z niedoborem 21-hydroksylazy i innych bloków metabolicznych u dzieci)
Estradiol, estron, estriol	Ocena funkcji jajników (wraz z P do kontroli cyklu u kobiet w diagnostyce niepłodności) Kontrola poziomu hormonów pacjentek podczas HTZ Jako testy predykcyjne przedwczesnego porodu
Androstendion AND, aldosteron	Marker wydzielania androgenów nadnerczowych Marker pierwotnego aldosteronizmu, w testach stymulacyjnych ACTH Marker wzmoczonego wydzielania androgenów nadnerczowych oraz monitorowania terapii we wrodzonym przerostie nadnerczy (obok 17-OHP)
Dehydroepiandrosteron (DHEA) i siarczan dehydroepiandrosteronu (DHAES)	W zaburzeniach rytmu dobowego Monitorowanie zmian podczas dojrzewania i spadku stężenia z wiekiem W psychologii jako hormon anty-stresu Potencjalnie użyteczny marker ciężkości depresji oraz monitorowaniu leczenia pacjentek z chronicznymi migrenami
Aminy cykliczne	
Melatonina oraz jej prekursorzy (serotonina)	W chronobiologii u pacjentów z zaburzeniami snu, odwróconym rytmem dobowym dzień-noc W badaniach funkcji szyszynki u noworodków

W rutynowej diagnostyce najczęściej oznaczane jest stężenia kortyzolu [Tabela 2]. Wynika to zarówno ze stosunkowo wysokie-

go stężenia tego hormonu w ślinie, jak i dużego zapotrzebowania na jego oznaczenia w wielu jednostkach chorobowych.

Tabela 2.

Wartości referencyjne oraz zastosowanie oznaczeń stężenia kortyzolu w ślinie w diagnostyce endokrynologicznej.

Źródło	Wartości referencyjne [ug/dl] ug/dl x 27,586 = nmol/l; nmol/l x 0,03625 = ug/dl
Roche Diagnostics	godz. 6-10 < 0,873 godz. 16-20 < 0,243 godz. 23-24 < 0,208
Laboratorium Naukowe Kliniki Endokrynologii WUM	godz. 7-9 0,112-1,29 godz. 22:30-23:30 0,034-0,374
Jednostka chorobowa	Zastosowanie
Hiperkortyzolemia	Ocena rytmu dobowego wydzielania Ocena nocnego stężenia Supresji wydzielania teście deksametazonem
Diagnostyka czynnościowa osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej	Ocena zmian stężeń po stymulacji kory nadnerczy syntetycznym ACTH
Zespół Cushinga	Monitorowanie
	Ocena poziomu kortyzolu jako hormonu stresu
	Kontrola suplementacji podczas leczenia hydrokortyzonem

Nowe perspektywy oznaczeń

Wprowadzenie do laboratoriów nowoczesnych metod takich jak wysokoczułe testy immunochemiczne, mikromacierze oraz techniki spektrometrii mas (MS) przyczyniły się do wy-

krycia w ślinie nowych biomarkerów, stwarzając perspektywy szerszych zastosowań śliny w rutynowej diagnostyce medycznej [Tabela 3].

Tabela 3.

Przykłady biomarkerów oznaczanych w ślinie potencjalnie przydatnych w diagnozowaniu, zapobieganiu i leczeniu chorób przewlekłych.

Rodzaj schorzenie	Biomarker
Choroby powiązane z jamą ustną	
a) Nowotwory: rak płaskonabłonkowy jamy ustnej nowotwory przyzębia	M2BP, MRP14, CD59, profilina 1, katalaza, miR-125a, miR-200a anty P53, IL-1α, IL-6, IL-8, VEGF-αTNF-α
b) Inne: choroby przyzębia	adrenomodulina, prokalcytonina, osteoprotegeryna, receptor błonowy TLR4, białko zapalne makrofagów MIP1α, aminotransferaza asparaginianowa, dehydrogenaza mleczanowa, MM8, IL18, IL6
Choroby ogólnoustrojowe	
a) Nowotwory: rak płaskonabłonkowy głowy szyi nowotwory piersi rak jajnika rak trzustki rak płuc rak prostaty	IL8, mitochondrialne DNA, białko PLUNC Onkogen c-erb-2, CA15-3, CEA, EGF, VEGF CA-125 Markery transkryptyczne KRAS, MBD3L2, ACRV1 DPM1 Mutacje receptora EGF miR-141; miR-21
b) Choroby autoimmunologiczne: Zespół Sjorgena Sarkoidoza Stwardnienie rozsiane Choroba Crohna Choroba Parkinsona	Chemokinaza CXCL13, cystatyna C, laktoferyna, anhidraza węglanowa, α-2-microglobulina, katepsyna D, α-enolaza α-amylaza, kalikreina IgA IL1α, TNF-α α-synukleina
c) Infekcje: wirusowe, bakteryjne grzybicze	Przeciwciała HIV-1, HIV-2 Mucyny MUC-5B MUC7 immunoglobuliny, Hsp70, kalprotektyna
d) Inne: Zespół policystycznych jajników Przewlekła choroba nerek Otyłość Cukrzyca Choroby układu sercowo-naczyniowego Zawał serca Choroby kości Reumatoidalne zapalenie stawów Mukowiscydoza	IL6, TNF-α IgG, IgA, CRP CRP, leptyna, insulina, adiponektyna, metaloproteazy A1AT, cystatin C, α-2-macroglobulin, transtyretyna, melatonina plgR, Arp 3, CA VI, IL-1Ra PLS-2, LEI, IGJ MMP8 MMP9 CRP, mioglobulina, MMP9, ICAM-1, CD40 Markery obrotu kostnego: osteokalcyna, fosfataza alkaliczna HGF, osteonektyna, deoxy pirydynolina (D-PYR) IL1β Katepsyna D

Szczególnie technika MS ze względu na wysoką czułość i precyzję pomiaru masy sprzężona z innymi technikami jest predysponowana do oznaczeń niskich stężeń biomarkerów w ślinie. W tabeli 4 przedstawiono przykładowe zastosowanie szeregu wariantów MS połączonych z dwukierunkową elektroforezą żelową (2DE/MS), wysokosprawną chromatografią cieczo-

(LC-MS/MS) lub chromatografią gazową (GC-MS/MS), spektrometrii mas z desorpcją/ionizacją laserową wspomaganą matrycą z analizatorem czasu przelotu (MALDI-TOF/MS) oraz ich wariant z modyfikowaną powierzchnią chromatograficzną pozwalającą na związanie białek SELDI-TOF/MS.

Tabela 4.

Przykładowe zastosowanie technik MS do analizy biomarkerów w ślinie.

Technika MS	Biomarker	Schorzenie
LC-MS/MS	Czynnik B dopełniacza	Płaskonabłonkowy rak głowy i szyi (HNSC)
MALDI-TOF/MS	Białka 1472,78; 2936,49; 6556,81 7081,17 Da	Rak żołądka
SELDI-TOF/MS	c-erbB-2	Rak piersi
2DE/MS MALDI-TOF/MS	α -amylaza cystatyna; PIP	Cukrzyca typu 1
LC-MS/MS	A1AT, cystatyna C, α -2-makroglobulina, transthyretyna	Choroby płuc
2DE/MS	Lipokalina, apolipoproteina A	Choroby płuc
2DE/MS	Stateryna 5, cystatyna	Próchnica
MALDI-TOF/MS	Białko PLUNC	Liszaj płaski jamy ustnej

Najczęściej stężenia biomarkerów występujących w ślinie są wielokrotnie niższe niż we krwi, co może stwarzać trudności techniczne przy ich oznaczaniu związane z czułością stosowanej metody oraz zanieczyszczeniami pochodzącymi z krwi. Okazało się jednak że zawartość micrRNA (miRNA) – istotnego regulacji wielu genów czynnika biorącego udział w powstawaniu nowotworów innych chorób, jest we krwi i ślinie bardzo podobna. Być może jest to efekt ochronny tzw. kulistego DNA, którego wiele form występuje w ślinie. W konsekwencji analiza pochodzącego ze śliny niekodującego RNA (miRNA piRNA), może się przyczynić do wczesnego rozpoznania wielu chorób, stanów przedcukrzycowych lub wczesnych stadiów raka jamy ustnej i trzustki oraz monitorowania stanu zdrowia. Ze względu na łatwość nieinwazyj-

nego pobrania ślina jest częściej używana niż krew w badaniach DNA (np. dochodzenie ojcostwa, poszukiwanie niespokrewnionych dawców szpiku). Stosuje się ją również jako materiał biologiczny w badaniach metylacji DNA, potencjalnie przydatnych do wczesnego diagnozowania chorób. Należy jednak pamiętać, że na skutek częstych zanieczyszczeń śliny bakteryjnym DNA uzyskane wyniki mogą się różnić od tych uzyskanych z krwi.

Podsumowując, ślina choć na skutek opisanych ograniczeń nie jest idealnym materiałem biologicznym do badań diagnostycznych, ma znacznie większy niż wskazuje na to dotychczasowe zastosowanie potencjał, który powinien być wykorzystywany w rutynowych oznaczeniach.



*Z dumą dzielimy się informacją, że jeszcze w tym roku zostanie zainstalowany 25.000 **cobas e 411**.*

*Od momentu wprowadzenia na rynek w 2007 roku **cobas e 411** jest nadal jednym z kluczowych analizatorów w naszej ofercie.*



Nowoczesne rozwiązania w diagnostyce przy łóżku pacjenta

- systemy diagnostyczne przydatne w wielu sytuacjach klinicznych na oddziałach szpitalnych
- pomiar parametrów równowagi kwasowo-zasadowej, elektrolitów i kooksymetrii
- ilościowe oznaczanie Troponiny T, CK-MB, Mioglobiny, NT-proBNP, dimerów D, INR oraz APTT w czasie od kilku do kilkunastu minut
- profesjonalne systemy do monitorowania glukozy na oddziałach szpitalnych
- zdalna kontrola pracy analizatorów na oddziałach

Gazometria i elektrolity

cobas b 123



Parametry kardiologiczne

cobas h 232



cobas IT 1000



**zdalne zarządzanie
analizatorami POC**

Accu-Chek Inform II

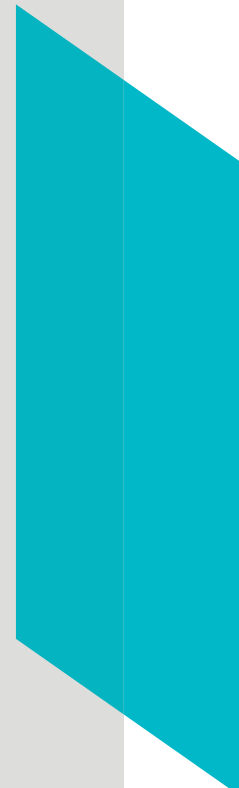
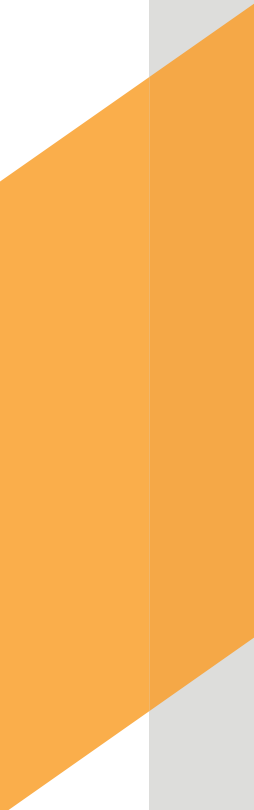
**Glukometr połączony
bezprowadowo z siecią**



CoaguChek® Pro II

Parametry koagulologiczne





@2018 Roche Diagnostics

Roche Diagnostics Polska Sp. z o.o.
ul. Wybrzeże Gdynskie 6B
01-531 Warszawa

www.roche.pl

+48 22 481 54 00-05
polska.diagnostics@roche.com

Przygotowanie do druku:
EDC Expert Direct Communication Sp. z o.o.

ISSN 1644-8448, nakład: 1000 egz.