



cobas

Life needs answers

Nr
36

ISSN 1644-8448

nakład: 1000 egz.

LabForum

Karty charakterystyk produktów
Roche Diagnostics
dostępne w internecie

Roche



Młodość! Sztuka! Nauka!



Szanowni Państwo,

Firma Roche ma długą tradycję we wspieraniu różnego rodzaju przedsięwzięć kulturalnych. „Roche Continents” jest wynikiem współpracy naszej firmy z Festiwałem Salzburskim, podczas którego Roche sponsoruje serię koncertów kompozytorów muzyki współczesnej.

Program „Roche Continents” opracowano dla 100 studentów i młodych doktorantów w wieku od 20 do 29 lat, pochodzących z uczelni europejskich.

Uczestnicząc w tym przedsięwzięciu młodzi ludzie mają okazję do wymiany poglądów, zdobycia nowej wiedzy i zwiedzenia Salzburga. W tym roku „Roche Continents” odbył się na początku sierpnia. Więcej na ten temat można przeczytać w internecie na stronie <http://www.roche-continents.net>. Zachęcam wszystkich młodych diagnostów do wzięcia udziału w tym projekcie w przyszłym roku.

Wychodząc naprzeciw zapotrzebowaniu naszych klientów przygotowaliśmy płytę CD z kartami charakterystyk substancji niebezpiecznych. Planujemy załączać aktualizacje w miarę pojawiania się istotnych zmian przepisów prawnych w tym zakresie. Chciałbym także poinformować, że karty są również dostępne na naszej stronie internetowej www.rochediagnostics.pl

Spis treści:

Młodość! Sztuka! Nauka!	2
Karty Charakterystyki Produktów RDP	3–4
Znaczenie przeciwciał przeciw cyklicznym cytrulinowym peptydom (anty-CCP) w diagnostyce, rokowania i leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów	5–10
xCELLigence System: pomiar cytotoxyczności komórek NK w czasie rzeczywistym bez konieczności znakowania	11–13
Przewlekłe powikłania cukrzycy	14–16
Stężenie dimeru-D u pacjentów z zespołem rozsianego wykrzepiania śródnaczyniowego (DIC) lub podejrzeniem DIC oznaczane z zastosowaniem 3 różnych metod	16

W bieżącym numerze polecam lekturze artykuł poglądowy prof. Wiesława Piechoty o nowoczesnej diagnostyce reumatoidalnego zapalenia stawów, a także następny w tegorocznym cyklu artykuł o dimerach-D oraz tłumaczenie oryginalnego tekstu o metodach diagnozowania z wykorzystaniem pomiarów cytotoxyczności komórek.

Życzę miłej lektury,

Andrzej Banaszkiewicz
wraz z zespołem RDP

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

serwis: tel. 0-22/481 54 55, 56
faks 0-22/481 55 91

obsługa klienta: tel. 0-22/481 54 00–05
faks 0-22/481 55 96

e-mail: polska.diagnostics@roche.com
dia.callcenter@roche.com

internet: www.rochediagnostics.pl

Karty Charakterystyki Produktów RDP

Informacje ogólne

Dolączona płyta CD zawiera karty charakterystyki produktów Roche Diagnostics w formacie PDF, w języku polskim.

W niniejszej aplikacji istnieje możliwość wyszukania numeru i opisu produktu, obejrzenia jednej lub więcej kart charakterystyki produktu oraz wydrukowania ich lub skopiowania do innego folderu.

Rozpoczęcie pracy z programem

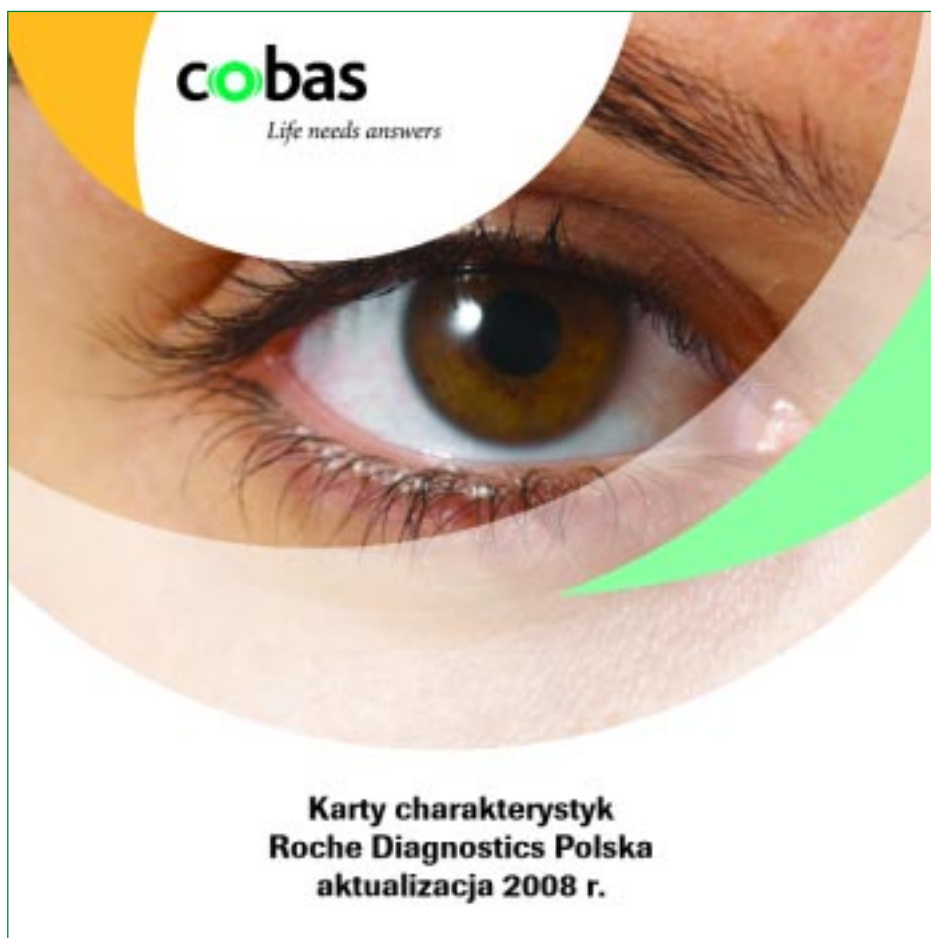
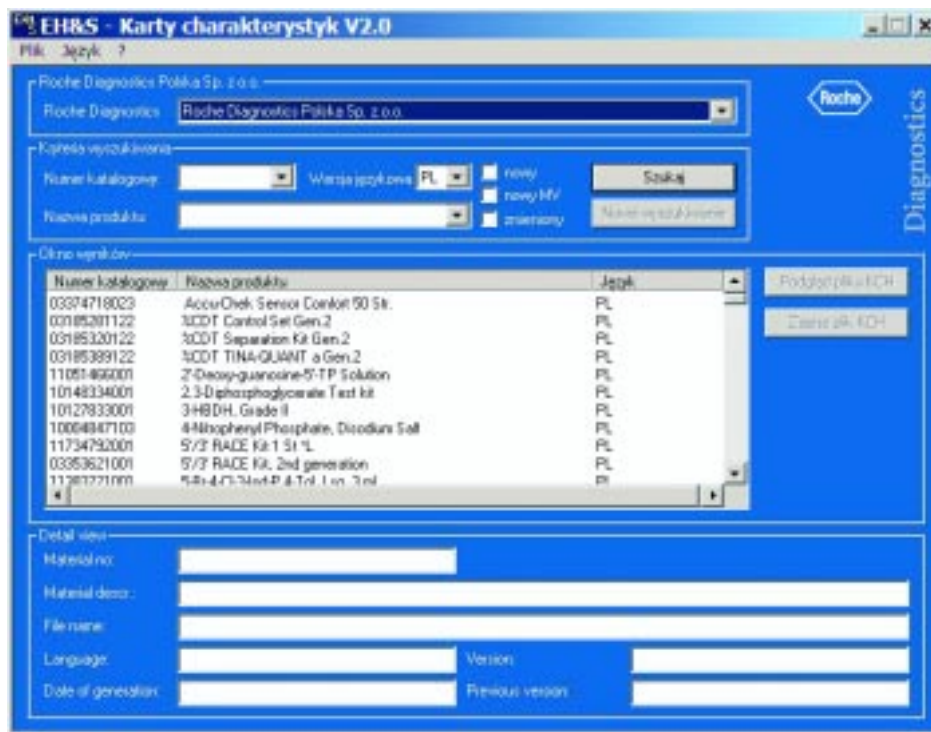
Aplikacja automatycznie rozpoczyna pracę po wprowadzeniu płyty CD do czytnika DVD-ROM. Jeśli nie dojdzie do automatycznego rozpoczęcia pracy, program można uruchomić poprzez dwukrotne kliknięcie pliku „SDS.exe” w wyszukiwarce plików. Instalacja aplikacji nie jest wymagana. Po jej uruchomieniu otworzy się okno aplikacji, jak na ilustracji.

Zmiana języka aplikacji na angielski, jest możliwa poprzez wybranie języka z pozycji menu „Język”.

- Okno aplikacji dzieli się na 4 pola:
- pole **Roche Diagnostics** (Affiliate).
 - pole **Kryteria wyszukiwania** (Search Criteria) służące do wybierania kryteriów wyszukiwania i jego przeprowadzenia.
 - pole **Okno wyników** (Search Results) karty charakterystyki produktu, gdzie wyświetlone są wyniki wyszukiwania. Aby zobaczyć lub zapisać w pamięci komputera więcej niż jedną kartę charakterystyki produktu, należy nacisnąć klawisz CTRL i nie zwalniając go jednocześnie klikać myszką na wybrane pozycje.
 - pole **Detail View** (szczegóły), gdzie wyświetlona zostanie informacja dotycząca bieżących wyników wyszukiwania. Linia **Material Description** (opis produktu) jest dłuższa od pola **Okno wyników** (Search Result). Ponadto wyświetlone zostaną linie dodatkowe, takie jak File Name (nazwa pliku), Date of Generation (data sporządzenia) i Version (wersja).

Kryteria wyszukiwania (Search Criteria):

Możliwe jest wyszukiwanie za pomocą funkcji **Numer katalogowy** (Material Number) lub funkcji **Nazwa Produktu** (Material De-



scription). Każde z tych pól zawiera podlistę zawartości pól, w których wpisy wypełniają się automatycznie. Listę można pokazać lub ukryć naciskając klawisz F4 lub za pomocą kombinacji klawiszy Alt + ↓. Na pasku narzędziowym **Język** (Language) można wybrać wersję językową aplikacji. Jeśli użytkownik potrzebuje karty charakterystyki produktu w kilku językach, można skorzystać z aplikacji internetowej znajdującej się pod adresem http://www.roche.de/datenblaetter/index.htm?sid=d05d5ff7c6ce959a1033ad1723341c98&nohead=true&allow_sel=true&country=PL&lang=PL lub zgłosić taką potrzebę do administratora aplikacji.

W następnych edycjach możliwe będzie obejrzenie zmian w porównaniu do ostatniej wersji programu; w tym celu należy aktywować pole odznaczenia ☐ „**nowy**”, „**nowy MV**” i/lub „**zmieniony**”.

- **nowy** (new) wyświetla wszystkie nowo dodane produkty.
- **nowy MV** (new Main Version) wyświetla tylko te produkty, dla których dokonano istotnych modyfikacji karty charakterystyki produktu, przez co zmodyfikowana została wersja główna.
- **zmieniony** (changed) wyświetla wszystkie produkty, dla których karty charakterystyki produktu zostały zmienione.

Okno wyników (Search Result):

Możliwa jest zmiana szerokości kolumny wyników wyszukiwania poprzez odznaczenie kursorem linii dzielącej kolumny (szary pasek w głowce tabeli) i przeciągnięcie jej aż do uzyskania pożądanego rozmiaru, cały czas trzymając jednocześnie naciśnięty lewy przycisk myszy.

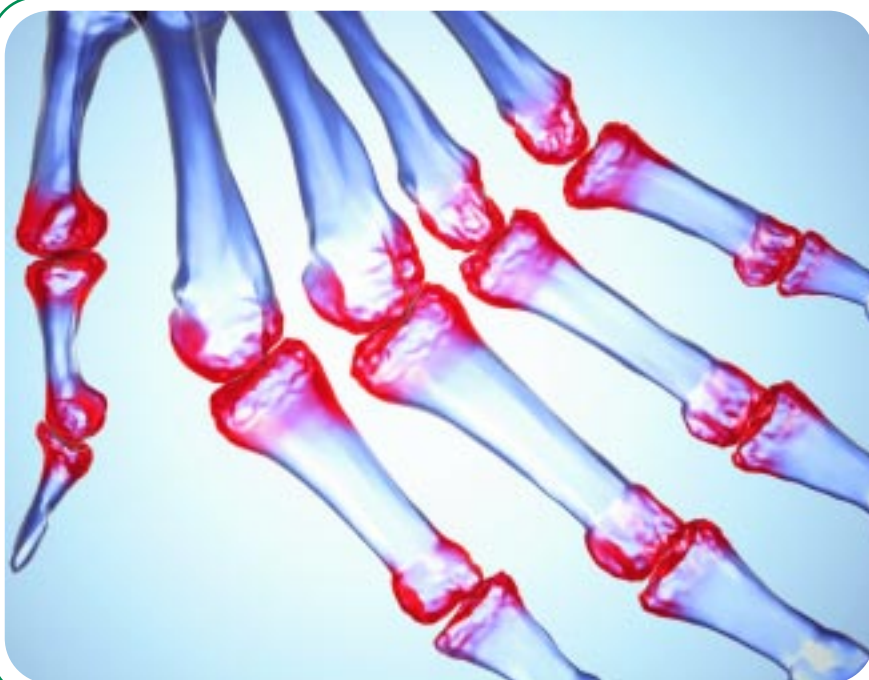
Uwaga: Aby wybrać więcej niż jeden zestaw danych (jedna linia w oknie wyników), należy przytrzymać naciśnięty klawisz CLTR, jednocześnie klikając na odpowiednie wyniki wyszukiwania.

Funkcje:

Wybór pomiędzy podanymi poniżej funkcjami możliwy jest za pomocą przycisków lub trybu paska menu:

Szukaj (Search)	Wyszukiwanie za pomocą wprowadzonych kryteriów
Nowe wyszukiwanie (reset search)	Odświeżanie kryteriów wyszukiwania za pomocą wartości domyślnych. Wartością domyślną dla języka jest język aplikacji.
Podgląd pliku KCH (view SDS file)	Gdy już wybrano produkty za pomocą kryteriów wyszukiwania, karty charakterystyk dla tych produktów przedstawione zostaną w formacie pliku Acrobat Reader (pdf).
Zapisz plik KCH (export SDS file)	Gdy już wybrano produkty za pomocą kryteriów wyszukiwania, karty charakterystyki dla tych produktów zostaną skopiowane. Najpierw otworzy się okno dialogowe z poleceniem wyboru ścieżki, pod którą użytkownik zapisze plik. Karty charakterystyki produktu są przechowywane pod następującymi nazwami plików: numer katalogowy+kod państwa+„.pdf”.
? (Pomoc)	Wyświetla dokumentację użytkownika dla danej aplikacji.

W celu uzyskania dodatkowych informacji dotyczących zawartości płyty CD lub zagadnień technicznych prosimy o kontakt z administratorem aplikacji, p. Kingą Kowalską, nr tel.: +48 22 481 54 22, faks: +48 22 481 55 99, adres e-mail: diagnostics.polska@roche.com



Elecsys anti-CCP

Automatyczne oznaczanie przeciwciał skierowanych przeciwko cytrulinowanym peptydom

materiał: surowica lub osocze krwi

czas oznaczania: 18 min.

Czułość kliniczna testu: 67,7%

Swoistość kliniczna testu: 97,0%

Aplikacje do oznaczania na analizatorach:

Elecsys 2010, Modular PE, Modular E170, cobas® 6000, cobas e601, cobas e411

Odczynnik + kalibrator:

Elecsys anti-CCP, Nr kat.: 05031656190 (100 oznaczeń)

Materiał kontrolny:

PreciControl anti-CCP, Nr kat.: 05031664190 (2 x 2,0 ml)

Test już dostępny w sprzedaży !!!

Znaczenie przeciwciał przeciw cyklicznemu cytrulinowanemu peptydowi (anty-CCP) w diagnostyce, rokowaniu i leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów

Wiesław Piechota, Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej Wojskowego Instytutu Medycznego w Warszawie

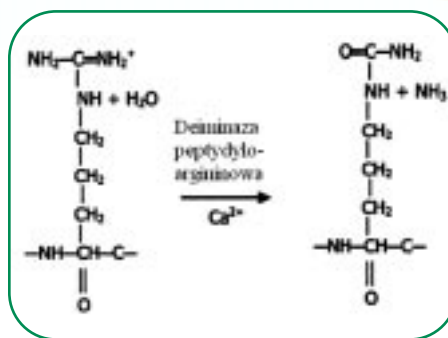
Wstęp

Występowanie przeciwciał skierowanych przeciw własnym antygenom jest bardzo częstym zjawiskiem w układowych chorobach tkanki łącznej. Do takich chorób należy reumatoidalne zapalenie stawów (RZS), które jest przewlekłą zapalną chorobą układową z głównym objawem – zapaleniem stawów obwodowych. Nie wiele jednak autoprzeciwciał wykazuje przydatność w diagnozowaniu i określaniu rokowania w RZS. W kryteriach rozpoznania tej choroby (*American College of Rheumatology* 1987, tabela 1.)¹ występuje tylko jedno autoprzeciwciało – czynnik reumatoidalny – skierowane przeciw fragmentowi Fc immunoglobuliny G. Czynnik reumatoidalny (RF – *Rheumatoid Factor*), jest immunoglobuliną w klasie M (RF-IgM). Jego miano wykazuje także pewną korelację z ciężkością objawów stawowych i pozastawowych. Czynnik reumatoidalny nie jest jednak całkiem swoisty dla RZS i może występować u pacjentów z innymi chorobami (w tym stawów), a nawet u zdrowych ludzi, szczególnie w podeszłym wieku². Dlatego też poszukiwano innych autoprzeciwciał, które odznaczałyby się większą swoistością i wyższą czułością diagnostyczną w odniesieniu do RZS. Pośród nich najbardziej obiecujące wyniki uzyskano dla przeciwciał przeciw cyklicznemu cytrulinowanemu peptydowi (anty-CCP). W obecnym artykule zawarto najistotniejsze informacje o tych przeciwciałach i ich znaczeniu dla diagnozy RZS (w tym różnicowej) jego leczenia i rokowania.

Przeciwciała przeciw cyklicznemu cytrulinowanemu peptydowi (anty-CCP)

Przeciwciała przeciw cyklicznemu cytrulinowanemu peptydowi (anty-CCP) rozpoznają antygeny, w których reszty argininy uległy, potranslacyjnie, przemianie do cytruliny. Reakcja taka, zwana cytrulinowaniem, zachodzi pod wpływem deziminazy peptydylo-argininowej (PAD) w obecności jonów wapnia (ryc. 1.). Białko cytrulinowane różni się od swych wyjściowych właściwości mobilnością elektroforetyczną (zmiana ładunku), budową przestrzenną i immunogennością.³ Nie jest rozpoznawane przez układ odpornościowy jako własne i wytwarzane są przeciwko niemu przeciwciała.

Rycina 1. Cytrulinowanie białek



Anty-CCP nie są zatem skierowane przeciwko określonemu białku czy peptydowi, reagują natomiast z nimi pod warunkiem posiadania cytrulinowanego epi-

Tabela 1. Kryteria diagnostyczne reumatoidalnego zapalenia stawów

Kryterium	Określenie
1. Poranna sztywność	Poranna sztywność w stawach i wokół stawów trwająca co najmniej 1 godzinę zanim nastąpi maksymalna poprawa
2. Zapalenie trzech lub więcej stawów	Zapalenie co najmniej trzech stawów z jednocześnie występującym w nich obrzękiem lub wysiękiem (nie tylko przerostem kostnym) stwierdzonym przez lekarza
3. Zapalenie stawów ręki	Zapalenie co najmniej jednego stawu (nadgarstkowego, stawów śródręczowo-paliczkowych lub międzypaliczkowych bliższych)
4. Symetryczne zapalenie stawów	Występowanie zmian zapalnych jednocześnie w tych samych stawach po obu stronach ciała
5. Guzki reumatoidalne	Podskórne guzki, ponad wyniosłościami kostnymi, po stronie wyprostnej w okolicach stawów stwierdzone przez lekarza
6. Obecność czynnika reumatoidalnego w surowicy krwi	Wykazanie nieprawidłowych ilości czynnika reumatoidalnego w surowicy za pomocą dowolnej metody, której wyniki są pozytywne dla < 5% zdrowych ludzi
7. Zmiany radiologiczne	Obecność nadżerek i osteoporozy okołostawowej zajętych stawów w przednio-tylnym radiogramie ręki lub nadgarstka. Obecność tylko osteoporozy nie jest spełnieniem kryterium.

topu. Cytrulinowanie obejmuje zatem rozmaite białka. Do dobrze poznanych antygenów zawierających takie epitopy należą m.in. filagryna (naskórek), keratyna (śluzówka żołądka), tichohialina (śluzówka jamy ustnej) i in. Przeciwciała przeciw epitopom na tych białkach, mimo wysokiej swoistości dla RZS miały bardzo niską czułość diagnostyczną (około 30%) i dlatego nie znalazły szerszego zastosowania.

Fizjologiczna rola cytrulinowania nie jest jasna. Nasilenie tej reakcji związane jest z zapaleniem, apoptozą, urazami i starzeniem się. Deziminaza peptydyl-argininowa (izoenzym PAD IV) występuje w neutrofilach i makrofagach, a jej aktywność rośnie przy zwiększeniu stężenia jonów wapniowych w środowisku, co ma miejsce w efekcie dezintegracji błon komórkowych. Procesy takie, poprzedzone zwiększoną rekrutacją granulocytów i makrofagów, mogą zachodzić w zmienionej zapalnie błonie maziowej stawów.

Do wykrywania i oznaczania przeciwciał anti-CCP wykorzystuje się najczęściej syntetyczne oligopeptydy wzorowane na immunoreaktywnych sekwencjach filagryny (z wysoką zawartością cytruliny). W tych sztucznie wytworzonych cząsteczkach dwie reszty seryny, głównego peptydowego epitopu filagryny, przekształcone zostały do cysteiny i powstała cykliczna postać (poprzez wiązanie dwusiarczkowe). Doskonalenie peptydów zawierających cytrulinowane reszty argininy odbywało się poprzez testowanie ich reakcji z przeciwciałami pochodzącymi od chorych na RZS, w którym wykazano, że zdolność rozpoznawania była tym większa im bardziej ekspozowane były cytrulinowane reszty argininy. Największą ekspozycję zapewniały cykliczne postaci peptydów. Ulepszanie cytrulinowanych peptydów spowodowało poprawę czułości testów anti-CCP, co znajduje odzwierciedlenie w ich oznakowaniu jako testy pierwszej, drugiej (anti-CCP2) a ostatnio trzeciej generacji (anti-CCP3).

Diagnostyczne i predykcyjne znaczenie przeciwciał anti-CCP

Diagnostyka reumatoidalnego zapalenia stawów opiera się na 7 kryteriach, z któ-

rych pierwsze 4 winny utrzymywać się przez co najmniej 6 tygodni.

Dla rozpoznania choroby konieczne jest spełnienie co najmniej czterech z powyższych kryteriów. Wynika z tego, w uproszczeniu, iż waga (udział w rozpoznaniu) kryterium serologicznego (dodatni RF) może sięgać nawet 25%.

Ważność tego kryterium ogranicza niezbyt wysoka czułość diagnostyczna, szczególnie we wczesnym okresie RZS, kiedy może nie przekraczać 30%, a na początku choroby może wynosić tylko 15–20%. Biorąc pod uwagę całe spektrum wiekowe pacjentów z RZS (i różny czas jego trwania) czułość czynnika reumatoidalnego (RF-IgM) jest porównywalna z czułością diagnostyczną przeciwciał anti-CCP. Wskazuje na to obszerna meta-analiza Nishimury i wsp.⁴, która wykazała podobną czułość diagnostyczną przeciwciał anti-CCP i czynnika reumatoidalnego – odpowiednio 67% i 69%. Natomiast oszacowana zbiorczo swoistość przeciwciał anti-CCP (95%, przedział ufności (PU) 94%–97%) była wyraźnie wyższa niż czynnika reumatoidalnego (85%, PU: 82%–88%). Dokładność diagnostyczna przeciwciał anti-CCP była wyraźnie wyższa niż RF głównie dzięki wyższej swoistości anti-CCP. Powyższa meta-analiza obejmowała testy pierwszej i drugiej generacji. Czułość niektórych testów drugiej i trzeciej generacji sięga 74–75%^{5,6} przy bardzo dobrej (praktycznie absolutnej) swoistości wynoszącej 97–98,8%. Testy drugiej generacji, dominujące na rynku i posiadające aplikacje na analizatory automatyczne, nie różnią się istotnie od testów trzeciej generacji.

Przeciwciała anti-CCP mogą być użyteczne w diagnostyce różnicowej wczesnego zapalenia stawów, na ogół nieodróżnianego, o różnym początku (dotyczącego jednego, dwóch lub wielu stawów) trwającego nie dłużej niż 3 miesiące oraz wczesnego RZS (o takim samym czasie trwania). Pojęcie wczesnego RZS wprowadzono w ostatnich latach, kiedy okazało się, że wczesne wdrożenie leczenia gwarantuje dobre wyniki, głównie w postaci remisji. Ustalenie rozpoznania w tym okresie może być jednak bardzo trudne, gdyż część chorych spełnia kryteria ACR (symetrycz-

ność zmian, nadżerki w stawach, guzki reumatoidalne) dopiero po 2–3 latach od wystąpienia pierwszych objawów.⁷ Oczekiwania co do przydatności przeciwciał anti-CCP do wspomagania diagnostyki RZS w najwcześniejszym okresie wynikają pośrednio m.in. z badania Nielena i wsp.⁸ Przeanalizowali oni archiwalne próbki krwi chorych na RZS, którzy w przeszłości, jako zdrowi ludzie, byli krwiodawcami. Okazało się, że obecność przeciwciał anti-CCP (anti-CCP2) przewidywała z 29% czułością i 99,5% swoistością wystąpienie objawów reumatoidalnego zapalenia stawów 5 lat później. W podobnym badaniu na krwiodawcach Rantapaa-Dahlqvista i wsp.⁹ wykazali, że obecność anti-CCP przewidywała rozwój RZS 1,5 roku przed wystąpieniem objawów z czułością 52% i swoistością 98% podczas gdy czułość RF-IgM wynosiła 30%. Powyższe badania wskazują na to, iż obecność przeciwciał anti-CCP u ponad połowy osób poprzedza RZS lub może towarzyszyć wczesnej, przedobjawowej fazie rozwoju reumatoidalnego zapalenia stawów i jest czynnikiem predykcyjnym rozwoju tej choroby.

Jeszcze większą moc predykcyjną obecności przeciwciał anti-CCP zaobserwowano wśród chorych z wczesnym, nieodróżnionym zapaleniem stawów. Van Gallen badając takich chorych wykazał, że aż u 93% z dodatnimi przeciwciałami anti-CCP rozwinęły się objawy RZS w ciągu 3 lat.¹⁰ Ustalenia te zostały niedawno potwierdzone przez Vittecoq i wsp.¹¹ badaniem 314 pacjentów z wczesnym zapaleniem stawów: w ciągu rocznej obserwacji 90% pacjentów z wyjściowo dodatnimi przeciwciałami anti-CCP2 (tj. drugiej generacji) zostało sklasyfikowanych jako chorzy z potwierdzonym RZS. Oznacza to, że chorzy z nieodróżnionym zapaleniem stawów i dodatnim wynikiem przeciwciał anti-CCP są wysoce zagrożeni rozwojem RZS w ciągu 1,5–3 lat.

W świetle powyższych danych uzasadnione wydaje się stwierdzenie, że naturalnymi kandydatami do oznaczania przeciwciał anti-CCP są właśnie pacjenci z wczesnymi postaciami nieodróżnionego zapalenia stawów oraz chorzy z podejrzeniem wczesnego RZS, dla których

nie jest spełniona wystarczająca liczba kryteriów ACR (szczególnie RF-ujemnych). Pojawia się tendencja do uznawania zapalenia wielostawowego trwającego dłużej niż 3 miesiące za RZS jeśli wykazuje się obecność czynnika reumatoidalnego lub przeciwciał anti-CCP. Natomiast w przypadku ujemnych wyników oznaczania zarówno RF jak i przeciwciał anti-CCP u chorych z zapaleniem wielostawowym trwającym > 3 miesięcy może okazać się konieczne zdefiniowanie go jako zapalenia niesklasyfikowanego.

Prace dotyczące najwcześniejszego okresu definitywnie rozpoznanego RZS i częstości występowania w tym okresie przeciwciał anti-CCP są, ze zrozumiałych względów, nieliczne. Ateş i wsp.¹² wykazał w nielicznej grupie chorujących na RZS nie dłużej niż 4 miesiące częstość dodatnich wyników przeciwciał anti-CCP wynoszącą 44,4%. Caro-Oleas i wsp.¹³ objęli badaniami grupę 234 pacjentów ze świeżo rozpoznany zapaleniem wielostawowym (czas ewolucji zapalenia ≥ 4 tygodni i ≤ 1 roku, zapalenie obejmujące 2 lub więcej stawów, bez leczenia farmakologicznego). Po roku u 124 pacjentów postawiono diagnozę reumatoidalnego zapalenia stawów zgodnie z kryteriami ACR. Przeciwciała anti-CCP oznaczane testami drugiej i trzeciej generacji obecne były u nieco ponad połowy pacjentów (czułość odpowiednio 51,5% i 54,8%, przy swoistości 96,2% i 98,1%). Panchagnula i wsp.¹⁴ oznaczali przeciwciała anti-CCP u 143 pacjentów z wczesnym zapaleniem stawów i ujemnym czynnikiem reumatoidalnym. Po 3–6 miesiącach dalszej obserwacji u 41 pacjentów zdiagnozowano RZS według kryteriów ACR. Analiza tej niedużej grupy pacjentów wykazała czułość diagnostyczną anti-CCP 63,4% przy swoistości 96,1%.

Należy podkreślić, że przeciwciała anti-CCP występują średnio u 40% chorych na RZS z ujemnym czynnikiem reumatoidalnym. Przemawia to za dodatkową wartością diagnostyczną testu anti-CCP.³ W badaniu przeprowadzonym przez Quinn i wsp.¹⁵ obejmującym grupę 182 pacjentów ze średnim trwaniem objawów RZS 7 miesięcy (odchylenie standardowe 4,9 miesięcy) wykazano częstość występo-

wania przeciwciał anti-CCP 81%, a dodatni RF tylko u 61% pacjentów. W podgrupie pacjentów z RZS i ujemnym czynnikiem reumatoidalnym stwierdzono aż 60% dodatnich wyników przeciwciał anti-CCP.

W obliczu istnienia testu do oznaczania przeciwciał anti-CCP mniej uzasadniony wydaje się podział na serododatnie i seroujemne RZS w tradycyjnym tego rozumieniu, opartym tylko o RF. Jeśli ten podział będzie utrzymywany, wówczas, aby był sensowny, powinien obejmować także przeciwciała anti-CCP.

Przeciwciała anti-CCP mogą być wykorzystywane do wykluczania RZS u chorych z wczesnym (pierwsze objawy w ciągu ostatnich 2 lat) nieodróżnionym zapaleniem stawów – ich negatywna wartość predykcyjna wyniosła 97,2% w badaniu Kudo-Tanaka i wsp.¹⁶

Przeciwciała te pomocne są w efektywnym różnicowaniu RZS z chorobami o podobnych objawach. Jedną z takich chorób jest toczeń rumieniowaty układowy, który jest czasem trudny do różnicowania z RZS, szczególnie w przypadkach występowania zapalenia wielostawowego, a jeszcze bardziej w przypadkach z erozyjną jego postacią. Mediawake i wsp.¹⁷ wykazali, że przeciwciała anti-CCP mogą być zastosowane jako test pomocniczy do różnicowania RZS z erozyjną postacią tocznia rumieniowatego układowego, któremu często towarzyszy RF a znacznie rzadziej anti-CCP. W nieerozyjnej postaci tocznia tylko 0,5% chorych miało przeciwciała anti-CCP (test pierwszej generacji) w porównaniu z 18% z dodatnim wynikiem testu na RF. Na podstawie analizy różnych badań można stwierdzić, że dodatnie wyniki przeciwciał anti-CCP (mierzone testami drugiej generacji) wynoszą u chorych na tocznia około 9%.¹⁸

Potrzeba diagnostyki różnicowej pojawia się w przypadku chorych z przewlekłym zakażeniem wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV), któremu dość często towarzyszy symetryczne zapalenie wielostawowe, czasem z objawami bardzo podobnymi do występujących w RZS. Na dodatek zakażeniu temu często towarzyszy RF. Wener i wsp.¹⁹ ustalili w losowo wybranej grupie pacjentów z zakażeniem

HCV częstość występowania dodatnich wyników testu na RF wynoszącą aż 44% i ani jednego dodatniego wyniku badania przeciwciał anti-CCP2. Pomiary anti-CCP mogą zatem pomóc w diagnostyce RZS (głównie wykluczaniu) u chorych na przewlekłe zapalenie wątroby wywołane przez HCV. Powyższe spostrzeżenia potwierdził Bombardieri i wsp.²⁰ wykazując 37% częstość dodatnich wyników RF u chorych bez RZS, ale z zapaleniem wątroby wywołanym HCV, z towarzyszącym zapaleniem stawów, przy zupełnym braku przeciwciał anti-CCP w tej grupie. Natomiast u chorych na RZS z jednoczesnym zakażeniem HCV obecność przeciwciał anti-CCP występowała u 60% chorych. Mimo, że badane grupy były niewielkie powyższe ustalenia przemawiają za znaczną wartością anti-CCP w odróżnianiu pacjentów z RZS od chorych z zakażeniem HCV i towarzyszącym zapaleniem wielostawowym.

Przeciwciała anti-CCP występują u nielicznych pacjentów (5%) z pierwotnym zespołem Sjögrena*, w którym dodatni RF występuje u 50–70% chorych.³ W chorobie tej może występować niewielkiego stopnia symetryczne zapalenie stawów. Różnicowanie z RZS może zatem być niekiedy potrzebne. Zespół Sjögrena może być wtórny, spowodowany inną chorobą autoimmunologiczną np. toczniem rumieniowatym układowym, reumatoidalnym zapaleniem stawów i in. Chociaż pacjenci z pierwotnym zespołem Sjögrena anti-CCP pozytywni są nieliczni ale zdają się oni być podatni na rozwój RZS i wymagają bacznej obserwacji klinicznej i okresowych badań radiologicznych.²¹

Przeciwciała anti-CCP występują w niewielkim odsetku (7%) chorych na łuszczycowe zapalenie stawów.²² Większość pacjentów z łuszczycowym zapaleniem stawów i dodatnim testem anti-CCP spełniła kryteria ACR dla RZS w ciągu 4 lat dalszej obserwacji. Inną przewlekłą chorobą reumatyczną z zapaleniem jednego lub więcej stawów jest młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów. Częstość występowania przeciwciał anti-CCP wśród tych pacjentów wynosi około 5–10%.³ Jednakże w podgrupie

chorych dzieci z zapaleniem wielostawowym i dodatnim RF-IgM częstość występowania przeciwciał anti-CCP była wysoka – wynosiła 73–77%. W tej podgrupie pacjentów przeciwciała anti-CCP mogą okazać się bardzo przydatnym serologicznym testem predykcyjnym późniejszych stawowych zmian erozyjnych.

Przeciwciała anti-CCP mogą być wykorzystane w diagnostyce różnicowej polimialgii reumatycznej z RZS we wczesnej fazie rozwoju u chorych w starszym wieku. Lopez-Hoyos i wsp. nie stwierdzili obecności przeciwciał anti-CCP u żadnego z 49 pacjentów z polimialgią reumatyczną, natomiast wykazali ich obecność u 65% chorych (spośród 57 badanych) na wczesny RZS.²³ Jeszcze jednym możliwym zastosowaniem przeciwciał anti-CCP jest różnicowanie RZS z chorobą zwyrodnieniową stawów, zwłaszcza rąk, w której, z reguły, tych przeciwciał się nie wykrywa.

Diagnostyczne znaczenie przeciwciał anti-CCP znajduje odzwierciedlenie w następującym określeniu RZS przez EULAR (Europejską Ligę do Walki z Chorobami Reumatycznymi): „Definicja reumatoidalnego zapalenia stawów jest niekiedy nieprecyzyjna, lecz termin ten stosowany jest zwykle do opisu symetrycznego, przewlekłego i destrukcyjnego zapalenia wielostawowego często związanego z występowaniem czynnika reumatoidalnego lub dodatnimi wynikami testu wykrywającego przeciwciała przeciw cyklicznemu cytrulinowanemu peptydowi (anti-CCP)”.²⁴ W dalszej części tego dokumentu sprecyzowanych jest 12 zaleceń postępowania we wczesnym zapaleniu stawów, opartych na dowodach oraz opinii ekspertów. Jedno z nich (zalecenie 4.) uwzględnia oznaczanie m.in. przeciwciał anti-CCP i posiada następujące brzmienie: „U każdego pacjenta zgłaszającego się z wczesnym zapaleniem stawów do reumatologa należy określić następujące czynniki predykcyjne przewlekłej i nadżerkowej postaci choroby: liczbę obrzękniętych i bolesnych stawów, OB lub CRP, poziom czynnika reumatoidalnego i przeciwciał anti-CCP oraz występowanie nadżerek w badaniu radiologicznym.”

Prognostyczne znaczenie przeciwciał anti-CCP

W rozpoznanym reumatoidalnym zapaleniu stawów we wczesnym okresie nie stwierdza się z reguły zmian nadżerkowych. W czasie do 3 miesięcy trwania choroby nadżerki stawowe występują u 13% pacjentów. W ciągu 2 lat trwania choroby odsetek ten rośnie do 50–70%. W wyniku szeregu dobrze udokumentowanych badań nad przebiegiem i rozwojem RZS okazało się, że obecność przeciwciał anti-CCP oznacza gorsze rokowanie w tej chorobie niż ich brak. Dotyczy to szczególnie rozwoju postępującej nadżerkowej postaci tej choroby prowadzącej do destrukcji stawów. W roku 2000 Kroot i wsp.²⁵ po 6 latach obserwacji 273 pacjentów ze wczesnie rozpoznanym RZS wykazali, że pacjenci z dodatnim wynikiem przeciwciał anti-CCP (pierwsza generacja) mieli znacznie bardziej zaawansowane zmiany radiograficzne rąk i stóp (zwiększenie szpar stawowych i liczba nadżerek) niż chorzy na RZS anti-CCP negatywni. Stosując również testy anti-CCP pierwszej generacji Meyer i wsp. w podobnej grupie 191 pacjentów z rozpoznaniem RZS (w ciągu ostatniego roku) stwierdzili po 5 latach obserwacji, że czułość przewidywania zmian radiologicznych przez przeciwciała anti-CCP wynosiła 67%, swoistość 56%, pozytywna wartość predykcyjna 64% i negatywna wartość predykcyjna 58%. Wartość prognostyczna przeciwciał anti-CCP w odniesieniu do zmian radiologicznych była większa niż dla RF.

Forslind i wsp.²⁶ określali wyjściowe stężenie anti-CCP2 u 379 pacjentów i oceniali radiologicznie stopień uszkodzenia stawów i jego progresję po dwóch latach obserwacji. Wykazali oni, że obecność przeciwciał anti-CCP2 związana była znacznie mocniej z erozją stawową niż obecność RF i innych parametrów laboratoryjnych tj. OB, CRP.

Najnowsze badanie opublikowane w 2008 roku potwierdza jeszcze bardziej dobitnie wartość prognostyczną przeciwciał anti-CCP. Syversen i wsp.²⁷ zbadali grupę 125 pacjentów z RZS, u których dostępne były radiogramy rąk w momencie postawienia rozpoznania i po 10 latach.

U pacjentów tych uzyskano również początkowe wyniki oznaczeń przeciwciał anti-CCP, OB, RF-IgM i RF-IgA. Przeciwciała anti-CCP okazały się najsilniejszym predykatorem progresji zmian radiologicznych [iloraz szans (*odds ratio*, OR) 4,0; 95% przedział ufności 1,6–10,0]; potem następowały płęć żeńska (OR=3,3), podwyższone OB (OR=3,2) i dodatni RF-IgM (OR=3,1). Zauważono także, że prawdopodobieństwo progresji zmian radiologicznych jest największe u chorych z wysokim mianem przeciwciał anti-CCP (OR= 9,9 w porównaniu z pacjentami anti-CCP ujemnymi). Autorzy tego doniesienia proponują algorytm predykcyjny zmian radiologicznych w RZS opierający się na następujących parametrach: przeciwciała anti-CCP, RF-IgM, OB i płęć żeńska. Wszystkie powyższe badania wskazują, że obecność przeciwciał anti-CCP koreluje z progresją erozyjnej postaci RZS. Parametr ten ma zatem znaczący potencjał kliniczny w wyborze pacjentów do agresywnych strategii leczenia.

Implikacje terapeutyczne oznaczania przeciwciał anti-CCP

Skuteczne leczenie RZS polega na wczesnym zastosowaniu leków modyfikujących przebieg choroby (LMPCh, ang. *Disease-Modifying Anti-Rheumatic Drugs*, DMARDs) w celu osiągnięcia remisji (i jej utrzymania), zapobiegania zmianom strukturalnym stawów, niesprawności i ewentualnym innym powikłaniom. Podstawowym lekiem tej grupy jest metotreksat, skuteczny w spowalnianiu nadżerkowych zmian stawowych. Lekiem o podobnej skuteczności jest leflunomid. W przypadku małej skuteczności monoterapii stosuje się terapię skojarzoną wykorzystując różne kombinacje LMPCh (np. metotreksat z sulfasalazyną, hydroksychlorochiną)²⁸. Do najnowszych leków o dużej efektywności terapeutycznej należą tzw. leki biologiczne o szybkim i silnym działaniu przeciwwzapalnym. Należą do nich m.in. leki hamujące działanie czynnika martwicy nowotworów alfa (TNF- α) – infliksymab, etanercept oraz hamujące interleukinę 1 (anakinra).²⁹ Najbardziej skuteczne w osiąganiu remisji w RZS jest kojarzenie metotreksatu z lekami biologicznymi.

nymi.³⁰ Nie zawsze jednak stosowanie określonego leku biologicznego np. inhibitora TNF jest skuteczne w dłuższej terapii lub dobrze tolerowane. Wówczas można włączyć leki biologiczne o innym mechanizmie działania. Przykładem takiego leku jest rituksymab, przeciwciało swoiście skierowane przeciw limfocytom B, a dokładniej przeciw antygenowi CD20 na ich powierzchni.³¹ Lek ten ma rejestrację FDA do leczenia dorosłych pacjentów z umiarkowanym do ciężkiego RZS, w terapii skojarzonej z metotreksatem, w przypadkach niedostatecznej odpowiedzi na leczenie antagonistami TNF. Podobna rekomendacja aprobowana przez *Committee for Medicinal Products for Human Use* (CHMP) dotyczy Europy. Wcześniejsza rejestracja tego leku przez FDA (1997 rok) dotyczyła jego zastosowania w leczeniu chłoniaków nieziarniczych wywodzących się z limfocytów B. Nowym lekiem o podobnym mechanizmie działania jest okrelizumab (w trakcie badań klinicznych). Także kolejny badany – tokilizumab – jest przeciwciałem przeciw receptorowi IL-6.

W ciągu ostatnich kilku lat pojawiła się tendencja do szybkiego wdrażania terapii LMPCh, najlepiej przed radiologicznym wykryciem pierwszych zmian nadżerkowych. Niezwłoczne leczenie oznacza jego wdrożenie nie później niż w czasie 3 miesięcy od rozpoznania. Rekomendacja EULAR – *European League Against Rheumatism* – (zalecenie 5.) stwierdza: „U chorych zagrożonych rozwojem przewlekłego lub nadżerkowego zapalenia stawów powinno się jak najwcześniej zastosować leki modyfikujące przebieg choroby (LMPCh), nawet jeśli jeszcze nie są spełnione ustalone kryteria klasyfikacyjne zapalnej choroby reumatycznej”.²⁴ Dlatego też występuje skłonność do uznawania zapalenia wielostawowego trwającego powyżej 3 miesięcy za wczesne RZS i wdrażania leczenia jeśli wykryte zostaną przeciwciała anty-CCP lub czynnik reumatoidalny w klasie IgM. Tendencja ta rozciąga się także na przypadki niesklasyfikowanego zapalenia stawów o analogicznym czasie trwania z ujemnym RF a dodatnim testem na przeciwciała anty-CCP (z uwagi na większą swoistość tych ostatnich).

Przeciwciała anty-CCP mają zatem niebagatelne znaczenie w decyzjach terapeutycznych ze względu zarówno na swe znaczenie diagnostyczne wczesnego RZS jak i predykcyjne w tej chorobie. Oznaczanie przeciwciał anty-CCP ma w terapii potencjalny wymiar ekonomiczny: ich nieobecność może, oprócz innych czynników, skłaniać do bardziej konserwatywnego leczenia z pominięciem drogich leków biologicznych (i odwrotnie).

Podsumowanie

Chociaż rozpoznanie reumatoidalnego zapalenia stawów opiera się głównie o kryteria kliniczne to badania laboratoryjne, w tym oznaczanie autoprzeciwciał, stanowią cenne uzupełnienie diagnostyki oraz rokowania w tej chorobie. Przeciwciała anty-CCP to nowy serologiczny marker RZS, który przybył po 50 latach niepodzielnego królowania czynnika reumatoidalnego. Niekiedy uznaje się to za rewolucyjną zmianę w reumatologii. Czułość diagnostyczna tego nowego markera jest porównywalna lub nawet lepsza (dla testów 2 generacji około 70%) niż czynnika reumatoidalnego. Przewaga czułości przeciwciał anty-CCP nad RF jest szczególnie zaznaczona we wczesnym okresie RZS. Często pojawienie się przeciwciał anty-CCP poprzedza wystąpienie objawów klinicznych. Swoistość przeciwciał anty-CCP w odniesieniu do RZS jest praktycznie absolutna, o kilkanaście procent wyższa niż RF, i osiąga wartości 97–98%. Przeciwciała anty-CCP przydatne są także w diagnostyce różnicowej RZS i innych zapalnych oraz niezapalnych chorób z objawami stawowymi. Predykcyjne znaczenie obecności przeciwciał anty-CCP polega przede wszystkim na przewidywaniu szybkiej progresji nadżerkowych zmian stawowych. Uzyskanie i utrzymanie remisji w RZS oraz spowolnienie takich zmian w znacznej mierze zależy od wczesnego wdrożenia terapii lekami modyfikującymi przebieg choroby. Za wczesnym wdrożeniem takiego leczenia, oprócz kryteriów klinicznych, z których część występuje późno, przemawia seropozytywność zapalenia wielostawowego – rozumiana jako obecność przeciwciał anty-CCP lub czynnika reumatoidalnego. Oznaczanie obu

tych serologicznych markerów zapewnia wysoką czułość diagnostyczną w odniesieniu do wczesnego RZS (około 80%) przy nieznacznie zmniejszonej swoistości. Wymienianie testu anty-CCP w zaleceniach EULAR jest zapewne wstępem do formalnego i nieodległego uznania tego badania jako serologicznego kryterium RZS, co najmniej na równi z czynnikiem reumatoidalnym. Sprzyja temu coraz większa dostępność oznaczania przeciwciał anty-CCP za pomocą automatycznych analizatorów immunochemicznych. Oznaczanie przeciwciał anty-CCP wraz z diagnostyką wczesnego zapalenia błony maziowej metodami ultrasonografii i rezonansu magnetycznego znacznie wzbogacają możliwości wykrywania RZS w najwcześniejszym okresie.

* Zespół Sjögrena jest chorobą autoimmunologiczną, w której uszkodzeniu ulegają komórki gruczołów ślinowych i łzowych. Do głównych objawów należą suchota w jamie ustnej i upośledzenie wytwarzania łez.

Piśmiennictwo

1. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, i wsp.: *The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*. 1988, 31:315–324.
2. Dörner T, Egerer K, Feist E, i wsp.: *Rheumatoid factor revisited*. *Curr Opin Rheumatol*. 2004, 16:246–253.
3. Raptopoulou A, Sidiropoulos P, Katsouraki M, i wsp.: *Anti-citrulline antibodies in the diagnosis and prognosis of rheumatoid arthritis*. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2007, 44: 339–363.
4. Nishimura K, Sugiyama D, Kogata Y, i wsp.: *Meta-analysis: Diagnostic Accuracy of Anti-Cyclic Citrullinated Peptide Antibody and Rheumatoid Factor for Rheumatoid Arthritis*. *Ann Intern Med*. 2007, 146:797–808.
5. Bizzaro N, Tonutti E, Tozzoli R, i wsp.: *Analytical and Diagnostic Characteristics of 11 2nd- and 3rd-Generation Immunoenzymatic Methods for the Detection of Antibodies to Citrullinated Proteins*. *Clin Chem* 2007, 53: 1527–1533.
6. Coenen D, Verschueren P, Westhovens R, i wsp.: *Technical and Diagnostic Performance*

- of 6 Assays for the Measurement of Citrullinated Protein/Peptide Antibodies in the Diagnosis of Rheumatoid Arthritis. *Clin Chem* 2007, 53: 498–504.
7. Chan KW, Felson DT, Yood RA, i wsp.: The lag time between onset of symptoms and diagnosis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1994, 37: 814–20.
8. Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, i wsp.: Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum* 2004, 50:380–386.
9. Rantapaa-Dahlqvist S, de Jong BA, Berglin E, i wsp.: Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003, 48: 2741–2749.
10. van Gaalen FA, Linn-Rasker S, van Venrooij WJ, i wsp.: Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis. *Arthritis Rheum* 2004, 50: 709–715.
11. Vittecoq O, Incauragarat B, Joven-Beades F, i wsp.: Autoantibodies recognizing citrullinated rat filaggrin in an ELISA using citrullinated and non-citrullinated recombinant proteins as antigens are highly diagnostic for rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 2004, 135: 173–180.
12. Ateş A., Karaaslan Y, Aksaray S, i wsp.: Predictive value of antibodies to cyclic citrullinated peptide in patients with early arthritis. *Clin Rheumatol* 2007, 26: 499–504.
13. Caro-Oleas J S, Fernandez-Suarez A, Cesteros, SR, i wsp.: Diagnostic usefulness of a third-generation anti-cyclic citrulline antibody test in patients with recent-onset polyarthritis. *Clin Chem Lab Med* 2007, 45: 1396–1401.
14. Panchagnula R, Rajiv S R, Prakash J, i wsp.: Role of Anticyclic Citrullinated Peptide in the Diagnosis of Early Rheumatoid Factor-Negative Suspected Rheumatoid Arthritis: Is It Worthwhile to Order the Test? *JCR* 2006, 12:172–175.
15. Quinn MA, Gough AK, Green MJ, i wsp.: Anti-CCP antibodies measured at disease onset help identify seronegative rheumatoid arthritis and predict radiological and functional outcome. *Rheumatology* 2005, 45:478–480.
16. Kudo-Tanaka E, Ohshima S, Ishii M, i wsp.: Autoantibodies to cyclic citrullinated peptide 2 (CCP2) are superior to other potential diagnostic biomarkers for predicting rheumatoid arthritis in early undifferentiated arthritis. *Clin Rheumatol*. 2007, 26:1627–1633.
17. Mediawake R, Isenberg DA, Schellekens GA, i wsp.: Use of anti-citrullinated peptide and anti-RA33 antibodies in distinguishing erosive arthritis in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2001, 60:67–68.
18. Avouac J, Gossec L, Dougados M: Diagnostic and predictive value of anti-CCP (cyclic citrullinated protein) antibodies in rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Ann Rheum Dis* 2006, 65, 845–885.
19. Wener M H, Hutchinson K, Morishima C, i wsp.: Absence of antibodies to cyclic citrullinated peptide in sera of patients with hepatitis C virus infection and cryoglobulinemia. *Arthritis Rheum* 2004, 50:2305–2308.
20. Bombardieri M, Alessandri C, Labbadia G, i wsp.: Role of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in discriminating patients with rheumatoid arthritis from patients with chronic hepatitis C infection-associated polyarticular involvement. *Arthritis Res Ther* 2004, 6: R137–141.
21. Gottenberg JE, Mignot S, Nicaise-Rolland P, i wsp.: Prevalence of anti-cyclic citrullinated peptide and anti-keratin antibodies in patients with primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2005, 64: 114–117.
22. Alenius GM, Berglin ES, Dahlqvist SR: Antibodies against cyclic citrullinated peptide (CCP) in psoriatic patients with or without joint inflammation *Ann Rheum Dis* 2006, 65:398–400.
23. Lopez-Hoyos M, Ruiz DA, Blanco R, i wsp.: Clinical utility of anti- CCP antibodies in the differential diagnosis of elderly-onset rheumatoid arthritis and polymyalgia rheumatica. *Rheumatology* 2004, 43:655–657.
24. Combe B, Landewe R, Lukas C, i wsp.: EULAR recommendations for the management of early arthritis: report of a task force of the European Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCISIT). *Ann Rheum Dis* 2007, 66:34–45.
25. Kroot EJ, de Jong BA, van Leeuwen MA, i wsp.: The prognostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000, 43: 1831–1835.
26. Forslind K, Ahlmen M, Eberhardt K, i wsp.: BARFOT Study Group. Prediction of radiological outcome in early RA in clinical practice: role of antibodies to citrullinated peptides (anti-CCP). *Ann Rheum Dis* 2004, 63: 1090–1095.
27. Syversen SW, Gaarder PI, Goll GL, i wsp.: High anti-cyclic citrullinated peptide levels and an algorithm of four variables predict radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis: results from a 10-year longitudinal study. *Ann Rheum Dis* 2008, 67:212–217.
28. Proudman SM, Keen HI, Stamp LK, i wsp.: Response-Driven Combination Therapy with Conventional Disease-Modifying Antirheumatic Drugs Can Achieve High Response Rates in Early Rheumatoid Arthritis with Minimal Glucocorticoid and Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug Use. *Semin Arthritis Rheum* 2007, 37:99–111.
29. Akil M., Veerapen K.: Reumatoidalne zapalenie stawów: leczenie. *W: ABC reumatologii, PZWL* 2007, 80–85.
30. van der Heijde D, Klareskog L, Landewé R, i wsp.: Disease remission and sustained halting of radiographic progression with combination etanercept and methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2007, 56:3928–3939.
31. Emery P, Fleischmann R, Filipowicz-Sosnowska A, i wsp.: The efficacy and safety of rituximab in patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate treatment. *Arthritis Rheum* 2006, 54:1390–1400.

xCELLigence System: pomiar cytotoksyczności komórek NK w czasie rzeczywistym bez konieczności znakowania



Yama Abassi, ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA

Wstęp

Komórki NK (ang. *Natural Killer*, naturalny zabójca) są zaangażowane w roz-

poznawanie i niszczenie komórek nowotworowych. Oszacowanie aktywności cytotoksycznej komórek NK jest ważne nie tylko dla monitorowania immunokompetencji w chorobie nowotworowej, chorobach zakaźnych i autoimmunologicznych, ale również wykrywaniu białek pośredniczących w uzyskaniu efektu cytolitycznego.

Standardowe metody oznaczania aktywności cytolitycznej komórek są oparte na pomiarze uwalnianej radioaktywności: docelowe komórki są znakowane radioaktywnie i mieszane z komórkami efektorowymi, takimi jak komórki NK^[1,2]. Aktywność komórek NK określa się na podstawie uwolnionej radioaktywności, przez docelowe komórki, spowodowanej cytolizą. Metody te są kłopotliwe – ze względu na zastosowanie radioaktywnych materiałów, ale również z powodu występowania wysokiego tła.

xCELLigence System stworzony, jako RT-CES System przez ACEA Biosciences, San Diego, USA, oferuje alternatywne pozbawione konieczności znakowania rozwiązanie, do pomiaru aktywności cytotoksycznej komórek NK – ze znaczącym zwiększeniem łatwości stosowania, jak i jakości uzyskanych danych. Ta nowatorska technologia pozwala również na bardziej dokładne szacowanie aktywności cytotoxicznej poprzez dynamiczne monitorowanie całego przebiegu reakcji.

Trzon systemu stanowi układ czujnika oporu elektrycznego pozornego (impedancja) komórek zintegrowanych z dnem mikropłytki, co pozwala na ciągłe, ilościowe oznaczenie biologicznego stanu komórek adherentnych. Zmiany w liczbie,

wielkości, morfologii lub zdolności do adhezji mogą być wykrywane w czasie rzeczywistym bez użycia dodatkowych odczynników. Zintegrowane oprogramowanie pozwala na zbieranie danych nawet co minutę, przez dowolny czas^[3,4].

W prezentowanych badaniach system pomiaru impedancji posłużył do dynamicznej i ilościowej analizy cytotoksyczności komórek NK skierowanej przeciwko komórkom NIH 3T3 oraz dziewięciu innym liniom komórkowym, włączając ludzkie linie nowotworowe.

Materiały i metody

Hodowla komórek

Linie komórkowe NK92, NIH 3T3 oraz wszystkie linie nowotworowe pozyskano z ATTC. Mysie komórki linii NK (mNK) otrzymano od Hui Shao, Uniwersytet Louisville, USA. Komórki hodowano w inkubatorze utrzymującym 37°C i 5% CO₂. Komórki NK92 i mNK hodowano w pożywce Alpha MEM z 2 mM L-glutaminą, 1,5 g/l wodorowęglanu sodu, uzupełnionej o 0,2 mM inozytolu, 0,1 mM 2-merkaptetanolu, 0,02 mM kwasu foliowego, 12,5% surowicy końskiej, 12,5% FBS oraz 100–200 U/ml rekombinowanej IL-2. Inne linie komórkowe hodowano w pożywce RPMI zawierającej 5% FBS, 1% penicylinę i 1% streptomycynę (GIBCO). Komórki linii NIH 3T3 hodowano w pożywce DMEM zawierającej 10% FBS, 1% penicylinę i 1% streptomycynę.

Analiza cytotoxiczna

Komórki docelowe wysiewano na płytce E 96 po 5000 komórek na dołek w 100 µl pożywki. Wzrost komórek monitorowano dynamicznie z zastosowaniem systemu opartego o pomiar impedancji, aż do osiągnięcia przez komórki docelowe (ang. *Target cells (T)*) fazy logarytmicznego wzrostu

i utworzenia w dołku zlewniej warstwy komórek (*monolayer*). Komórki efektorowe (ang. *Effector cells (E)*) w różnych stężeniach dodawano do wybranych dołków na płytce do uzyskania różnych proporcji E/T. Kontrolę tła stanowiły komórki efektorowe dodane do dołka bez komórek docelowych. Po dodaniu komórek efektorowych system kontynuował pomiary co 15 minut przez kolejne 20 godzin.

Mikroskopowa analiza morfologii komórek

Efekt cytotoxiczny wywoływany poprzez komórki NK wobec komórek efektorowych analizowano za pomocą mikroskopu odwróconego (Nikon). Kiedy indeks komórek (ang. *Cell Index, (CI)*) spadł do 50% (w stosunku do kontroli) 8 godzin po dodaniu komórek mysich NK (mNK), komórki były usuwane z systemu, utrwalane w 80% metanolu przez 5 minut i barwione odczynnikiem Giemsa (*Giemsa blue*). Morfologia komórek była analizowana mikroskopowo, a obrazy dokumentowano z zastosowaniem dołączonej kamery CCD.

Analiza uzyskanych danych

Zintegrowane z systemem oprogramowanie uwidacznia cały przebieg eksperymentu. Krzywe czasu i wskazujące proporcję E/T mogą być wyświetlane w czasie rzeczywistym, więc aktywność komórek NK może być monitorowana dynamicznie. System wyraża impedancję w umownych jednostkach **CI**. CI w każdym punkcie czasowym, w umownych jednostkach jest definiowany, jako (Rn-Rb)/15, gdzie Rn jest impedancją mierzoną na linii elektroda-komórki, w dołku zawierającym komórki, a Rb to tło – impedancja mierzona w dołku zawierającym tylko pożywkę. Aby określić ilościowo liżę w wybranych punktach czasu-

wych, procent cytolizy w wybranych punktach był określany przez porównanie z kontrolą dla określonych proporcji E/T.

Wyniki i dyskusja

Dodanie komórek mNK w proporcji E/T 15 do 1 spowodowało znaczący spadek CI w hodowli komórek NIH 3T3 (Ryc. 1a.). Nie zaobserwowano znaczącego spadku CI w dołkach kontroli komórek efektorowych, gdzie dodawano komórki YAC i linii limfocytów T bez zdolności do cytolizy. Oznacza to, iż spadek CI jest związany z aktywnością cytolityczną komórek mNK. Obserwowano również zwiększenie cytolizy komórek NIH 3T3 w czasie, w obecności komórek mNK. Takiego efektu nie powodowało dodanie komórek YAC (Ryc. 1b.).

Morfologiczna analiza komórek docelowych wykazała zmniejszenie liczby komórek pod wpływem działania komórek mNK, podczas gdy dodanie komórek YAC (kontrola) nie powodowało takiego efektu (Ryc. 1c.).

Analiza kinetyczna wykazała, że cytoliza wywołana obecnością komórek mNK przebiega powoli: dopiero po 2 godzinach od dodania mNK zaobserwowano spadek liczby komórek. W ciągu 2 godzin od dodania

komórek mNK zaobserwowano mniej niż 30% aktywności cytolitycznej, co jest standardowym czasem inkubacji przy analizach radioizotopowych. Dane otrzymane z systemu opartego na pomiarze impedancji wykazały, że aktywność cytolityczna rośnie do 70% w ciągu 12 godz. od dodania komórek mNK. Największe nasilenie cytolizy przypada na czas, który przekracza standardową inkubację w analizach radioizotopowych, w związku z tym analizy oparte na znakowaniu komórek mogą zaniżać aktywność cytolityczną. System oparty na pomiarze impedancji dynamicznie monitoruje cały przebieg cytolizy i dzięki temu można dokonywać bardziej dokładnych analiz aktywności cytolitycznej.

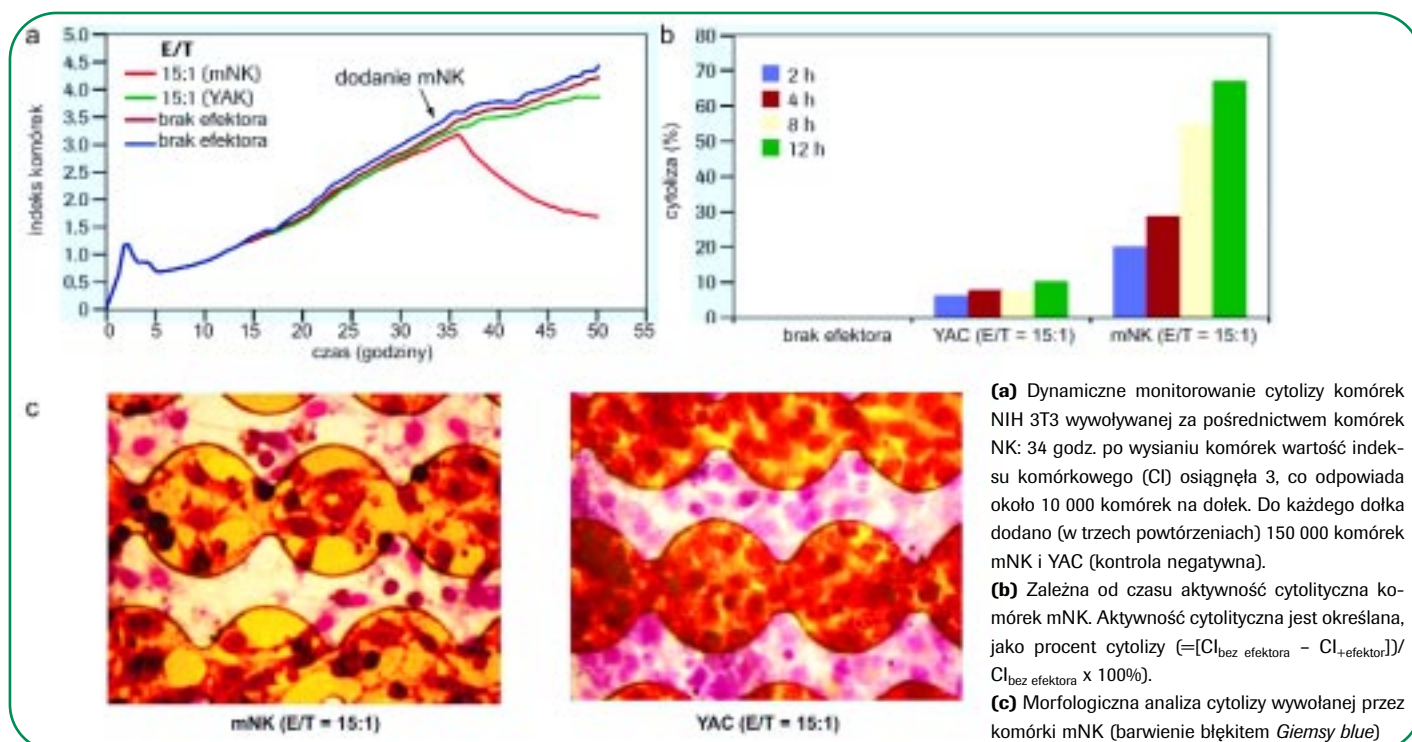
Ilościowy pomiar cytolizy wywołanej aktywnością komórek NK

Współczynnik CI wykazuje zależność od liczby komórek^[4] i jest stosowany do ilościowego monitorowania cytotoxyczności indukowanej przez czynniki chemiczne, takie jak leki przeciwnowotworowe. Aby przetestować zdolność systemu do analizy ilościowej aktywności komórek mNK, cytoliza była monitorowana dla różnych proporcji komórek efektorowych do docelowych (E/T). Mysie i ludzkie linie komórkowe (mNK

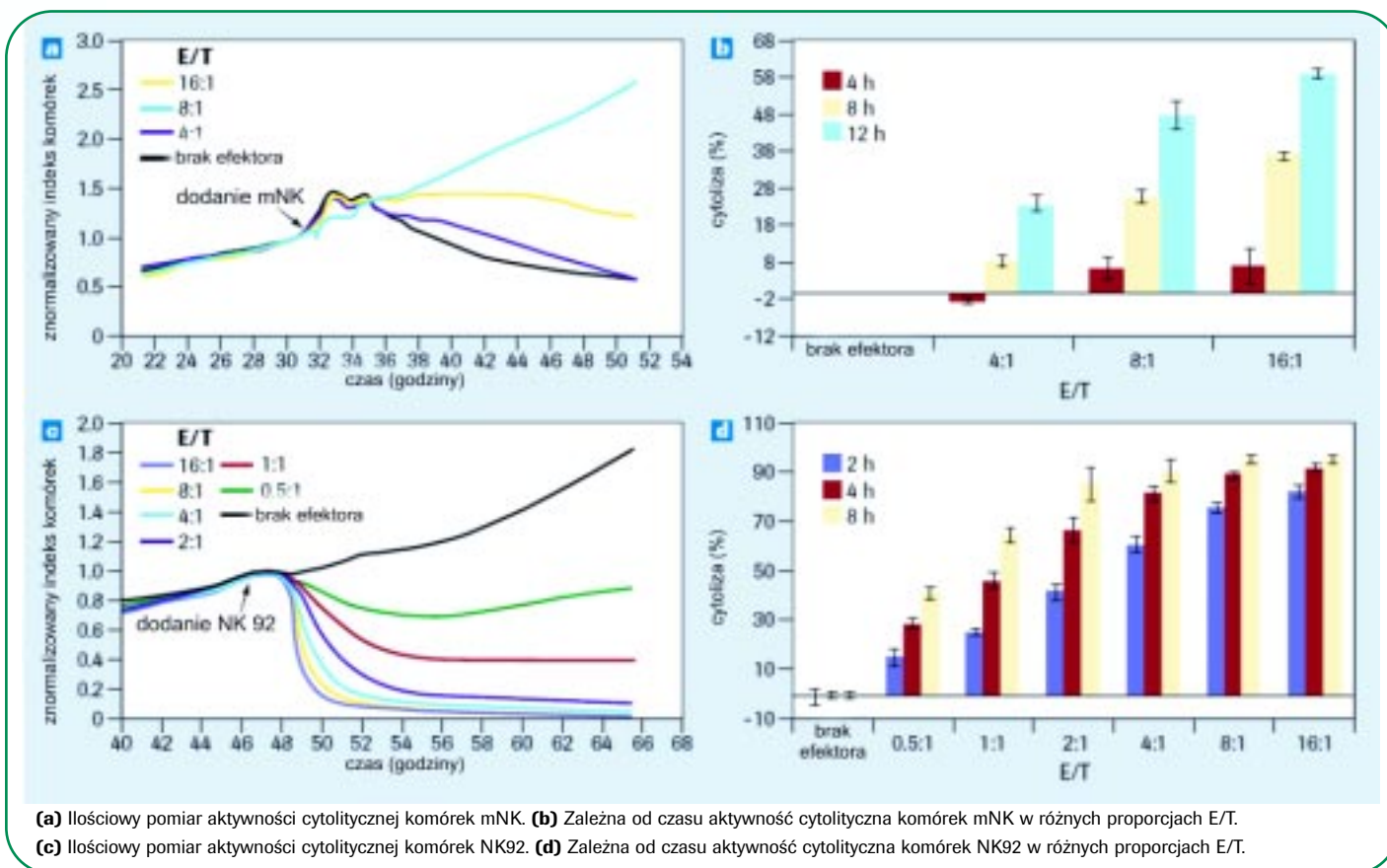
i NK92) zastosowano jako komórki efektorowe, komórki linii NIH 3T3 i MCF7 (linia komórek raka sutka) zastosowano jako odpowiadające im komórki docelowe. W następstwie dodawania komórek mNK lub NK92 do odpowiednich komórek docelowych wartości CI spadały w stosunku do kontroli (brak komórek efektorowych w hodowli) (Ryc. 2a. i 2c.). Spadek wartości CI jest zależny od proporcji E/T. Jest powodowany zmniejszeniem interakcji komórka-elektroda wywołanych cytolizą. Im wyższa była proporcja E/T, tym niższą uzyskano wartość CI. Świadczy to o tym, iż system oparty o pomiar impedancji zapewnia specyficzny i ilościowy pomiar aktywności cytolitycznej wywołanej przez komórki NK.

Ponadto, dynamiczne monitorowanie cytolizy może doprowadzić do poznania mechanizmów leżących u podstaw działania komórek NK. Na przykład, analiza dynamiki cytolizy wykazała, że komórki MK92 mają większy potencjał, jako komórki efektorowe niż komórki mNK. Przy proporcji E/T 4:1 lub wyższej, komórki MCF7 uległy cytolizie w więcej niż 90% w ciągu 4 godz. od dodania komórek NK92 (Ryc. 2d.). Podczas, gdy dla komórek mNK tylko 30% komórek uległo cytolizie w ciągu tego czasu (Ryc. 2b.). Różnice w kinety-

Rycina 1. Dynamiczne monitorowanie cytolizy wywołanej przez komórki NK



Rycina 2. Ilościowy pomiar aktywności cytolitycznej komórek mNK i NK92 bez barwienia



ce cytolitycznej aktywności komórek NK oznaczają, iż oddziaływania pomiędzy komórkami efektorowymi i docelowymi są specyficzne dla określonych komórek i mogą być w nie zaangażowane czynniki takie jak ekspresja receptorów i ligandów NK lub inne mechanizmy oddziaływań.

Oznaczanie aktywności cytolitycznej komórek NK bez konieczności znakowania w wielu liniach komórkowych

Aktywność cytolityczna komórek mNK i NK92 była testowana z zastosowaniem 9 linii komórkowych, włączając 8 różnych ludzkich linii nowotworowych i linię NIH 3T3. Komórki NK92 wykazują szerokie spektrum aktywności cytolitycznej w stosunku do 7 linii komórkowych (dane niepublikowane). Ponad 90% cytolizy uzyskano dla komórek H460, HepG2, MCF7 i MDA-MB231. Cytoliza zachodziła szybko i osiągała maksimum aktywności w mniej niż osiem godz. od dodania komórek efektorowych.

Podsumowanie

Prezentowane doświadczenia dowodzą, że system wykorzystujący analizę impedancji może być stosowany do dynamicznego i ilościowego szacowania aktywności cytolitycznej wywołanej przez komórki NK w przypadku ludzkich jak i mysich linii komórek NK.

Ponadto, dane otrzymane z pomiaru impedancji pokazują, że aktywność cytolityczna wzrasta do 70% w ciągu 12 godz. od dodania komórek efektorowych. Taka aktywność cytolityczna – która pojawia się po standardowym czasie inkubacji – może pozostać niezauważona podczas wykonywania analiz z zastosowaniem istniejących, opartych o znakowanie ozna-

czeń. System xCELLigence oferuje nie tylko analizę bez konieczności znakowania, ale również pozwala na uzyskanie bardziej dokładnych oznaczeń aktywności cytolitycznej dzięki dynamicznemu monitorowaniu całego przebiegu reakcji.

Piśmiennictwo:

1. Brunner KT et al. (1968) *Immunology* 14:181-196
2. Geldhof AB et al. (1995) *Cancer Res.* 55:2730-2733
3. Abassi JA et al. (2005) *J Immunol Methods* 292:195-205
4. Solly K et al. *Assay Drug Dev Technol* 2:363-372

Produkt	opakowanie	nr katalogowy
Nowy!		
RTCA SP Instrument:		
RTCA Analyzer	1 szt.	05 228 972 001
RTCA SP Station	1 szt.	05 229 057 001
RTCA Control Unit	1 szt.	05 229 014 001

Przewlekłe powikłania cukrzycy

W życiu człowieka nie ma zazwyczaj czasu na zastanowienie, co będzie się działo w przyszłym tygodniu, nie wspominając już o rozmyślaniu, jakie skutki może przynieść cukrzyca. Lecz myślenie o cukrzycy już teraz oraz podjęcie kroków, aby uniknąć problemów, może ułatwić życie.

Wiele osób zastanawia się, czemu lekarze tak dużo mówią o utrzymywaniu dobrych poziomów cukru we krwi. Oto dlaczego: problemy wynikające z długotrwałej cukrzycy – czasami nazywane powikłaniami – są często powiązane z wysokimi poziomami cukru we krwi przez dłuższy czas. Powikłania te odnoszą się do wielu narządów i układów naszego organizmu.

Jednak kontrola cukru we krwi to nie jedyna rzecz, warunkująca ryzyko komplikacji cukrzycowych. Inne czynniki, jak na przykład geny, także odgrywają swoją rolę.

Wiele powikłań pojawia się dopiero po kilku latach, a nawet dziesiątkach lat, trwania cukrzycy. Rozwijają się one skrycie i stopniowo, więc nawet jeżeli osoba z cukrzycą nie zauważa objawów powikłań, możliwe jest, że one i tak się kiedyś ujawnią.

Mówienie czy myślenie o przewlekłych powikłaniach może być przerażające. I – bądźmy realistami – ciężko jest zmienić sposób życia, aby zmniejszyć ryzyko problemów zdrowotnych, które mogą się pojawić dopiero za kilkadziesiąt lat. Ale ważne jest, aby zacząć od razu. Właściwe odżywianie, regularne ćwiczenia fizyczne oraz przyjmowanie leków zgodnie z zaleceniem lekarza jest najlepszym sposobem, aby zredukować ryzyko pojawienia się powikłań.

W jakich narządach mogą pojawić się powikłania?

Oto jakie narządy i układy organizmu mogą być najbardziej narażone na powikłania wynikające z cukrzycy:

- oczy
- nerki
- nerwy
- serce oraz naczynia krwionośne
- dziąsła
- stopy

Problemy dotyczące wzroku

Osoby chore na cukrzycę są bardziej narażone na zmiany dotyczące wzroku, wśród których znajdują się:

● **Zaćma/Katarakta:** Zaćma to zgrubienie i zmętnienie soczewki oka. Soczewka jest częścią oka, odpowiedzialną za ostrość widzenia. Zaćma sprawia, że osoba widzi niewyraźnie lub następuje pogorszenie widzenia w ciemności. Lekarze są zdania, że osoby z cukrzycą są bardziej narażone na zaćmę, jeśli mają podwyższony poziom cukru we krwi przez dłuższy czas. Gdy pojawia się zaćma, usuwa się ją operacyjnie.

● **Retinopatia:** Kolejny problem, zwany retinopatią cukrzycową, dotyczy zmian w siatkówce, która jest wrażliwą na światło warstwą, umiejscowioną na tylnej powierzchni oka. Zmiany te pojawiają się w wyniku zniszczenia lub problemów ze wzrostem małych naczyń krwionośnych siatkówki. Zazwyczaj zmiany w naczyniach krwionośnych siatkówki pojawiają się po kilku, kilkunastu latach trwania cukrzycy i nie ujawniają się przed zakończeniem okresu dojrzewania. Retinopatia częściej dotyczy osoby z cukrzycą, które mają wysoki poziom cukru we krwi przez długi czas, wysokie ciśnienie, palą papierosy lub żują tytoń.

Jednym z powodów, dla którego młodzież z cukrzycą powinna poddawać się przynajmniej raz w roku badaniom okulistycznym, jest fakt, że retinopatia nie daje natychmiastowych objawów. Jednak jeżeli choroba się pogłębi, chory może stracić wzrok. Gdy problemy z siatkówką już się pojawiają, chory powinien częściej zasięgać konsultacji okulisty. Osoby chore na cukrzycę są w stanie spowolnić, a nawet zatrzymać zniszczenia spowodowane retinopatią, dzięki poprawie kontroli poziomów cukru. Jeśli retinopatia się pogłębi, zalecana jest laseroterapia, aby zapobiec utracie wzroku.

● **Jaskra:** Osoby cierpiące na cukrzycę są bardziej narażone na zachorowanie na

jaskrę. W chorobie tej następuje wzrost ciśnienia śródgałkowego, co może zmniejszyć przepływ krwi do siatkówki oraz nerwu wzrokowego, powodując ich uszkodzenie. Początkowo chory może nie odczuwać pogorszenia wzroku. Lecz jeśli nie podejmie leczenia, jaskra może doprowadzić do utraty wzroku. Ryzyko wzrasta wraz z wiekiem i czasem trwania cukrzycy. Chory na jaskrę przyjmuje lekarstwa obniżające ciśnienie wewnątrz gałki ocznej, a czasami wymagają operacji.

Lekarze podczas rutynowych badań kontrolnych sprawdzają zazwyczaj oczy pod kątem wczesnych objawów jaskry. Mogą także zlecić dalsze badania.

Kontrola poziomu cukru we krwi, ciśnienia krwi oraz unikanie tytoniu może również pomóc uniknąć problemów ze wzrokiem związanych z cukrzycą.

Problemy dotyczące nerek

Wysoki poziom cukru we krwi może powodować zniszczenie naczyń krwionośnych w nerkach, co prowadzi do niewydolności. Choroba ta nazywana jest **nefropatią cukrzycową**.

Niewydolność nerek częściej występuje u osób, które przez długi czas nie kontrolują poziomów cukru we krwi. Gdy uszkodzenie nerek już wystąpiło, stan chorego może ulec pogorszeniu, jeśli ma on wysokie ciśnienie krwi lub pali papierosy.

We wczesnym etapie, niewydolność nerek nie daje objawów. Po pewnym czasie może jednak uszkodzić nerki, które przestają normalnie funkcjonować. Tak więc jest to poważny problem zdrowotny.

Po kilku, kilkunastu latach trwania cukrzycy i po zakończeniu okresu dojrzewania, lekarz będzie prawdopodobnie zlecał badanie nerek raz do roku. Może to być badanie moczu na obecność białka zwanego albuminą. Jeżeli ilość białka przekracza dopuszczalny poziom lub występują inne objawy uszkodzenia nerek, lekarz może obejrzeć fragment nerki (pobrany w czasie jej biopsji) pod mikroskopem,

aby upewnić się czy rzeczywiście doszło do choroby nerek.

Jeśli niewydolność nerek zostanie wykryta wystarczająco wcześnie, uszkodzenie może zostać zatrzymane za pomocą właściwego leczenia. W takim przypadku zaleca się spożywanie mniejszych ilości białka. Lekarze przepisują też odpowiednie leki.

Jeżeli stan nerek ulegnie pogorszeniu, może pojawić się całkowita ich niewydolność, co będzie wymagało dializ (przy użyciu specjalnego urządzenia, które oczyszcza krew w taki sposób, w jaki robią to nerki) lub przeszczepienia nerki. Dobra wiadomość jest taka, że w dzisiejszych czasach rzadko dochodzi do całkowitej niewydolności nerek, dzięki wczesnemu wykryciu pierwszych objawów oraz lepszemu leczeniu.

Najlepszym sposobem, aby zapobiec nefropatii cukrzycowej, jest kontrola ciśnienia tętniczego oraz poziomów cukru we krwi, co jest łatwiejsze przy przestrzeganiu planu leczenia cukrzycy. Istotne jest także regularne mierzenie ciśnienia krwi oraz robienie badań moczu na obecność albumin. Dodatkowo należy powstrzymać się od palenia tytoniu, ponieważ zwiększa ono ryzyko wystąpienia problemów z nerkami jak i innych komplikacji cukrzycowych oraz problemów zdrowotnych.

Uszkodzenia nerwów

Innym powikłaniem, wynikającym z długotrwałej cukrzycy jest uszkodzenie nerwów zwane **neuropatią cukrzycową**.

Neuropatia cukrzycowa może dotyczyć nerwów w różnych częściach ciała. Najczęstsze objawy to drętwienie, mrowienie czy ostry ból stóp lub łydek.

Nieleczone uszkodzenie nerwów może doprowadzić do wielu problemów. Na przykład: z powodu ich drętwienia, chory nie zauważy skaleczenia, a rana taka zostanie zakażona. Ponieważ uszkodzenie nerwów może dotknąć każdą część ciała, problem może rozwinąć się w zasadzie wszędzie, w tym w przewodzie pokarmowym, drogach moczowych, w oczach i sercu.

Lekarze zazwyczaj diagnozują uszkodzenie nerwów podczas zwykłego bada-

nia. Biopsja tkanki nerwowej lub inne badania mogą okazać się niezbędne, a lekarz kieruje pacjenta do neurologa.

Lekarze uważają, że uszkodzenie nerwów jest związane z wysokim poziomem cukru we krwi, utrzymującym się przez długi czas. Dlatego kontrola poziomów cukru i postępowanie według planu leczenia może pomóc zmniejszyć ryzyko rozwoju tego rodzaju komplikacji.

Problemy dotyczące serca i naczyń krwionośnych

Osoby chore na cukrzycę są bardziej narażone na wystąpienie pewnych problemów związanych z sercem i naczyniami krwionośnymi. Powikłania te noszą nazwę chorób sercowo-naczyniowych i do tej grupy należą między innymi:

- Zawał serca (spowodowany zatorami naczyń krwionośnych, które dostarczają krew do serca)
- Udar (spowodowany zatorami naczyń krwionośnych, które są odpowiedzialne za ukrwienie mózgu)
- Zator naczyń krwionośnych w nogach i stopach, prowadzący do owrzodzenia stóp, zakażenia, czasami wymagający amputacji palca, stopy lub części nogi.

Sposób, w jaki kontroluje się cukier we krwi, odgrywa niemałą rolę w przypadku problemów dotyczących serca oraz naczyń krwionośnych. Jeżeli pacjent pali, jest otyły, ma podwyższone poziomy lipidów we krwi (trójglicerydy, cholesterol), nadciśnienie tętnicze lub w rodzinie występowały przypadki zawału serca czy udaru przed 50-tym rokiem życia, osoba ta jest o wiele bardziej narażona na komplikacje tego rodzaju.

Inną rzeczą, jaką można zrobić, aby zmniejszyć ryzyko powikłań sercowo-naczyniowych jest utrzymanie odpowiedniej wagi. Osoby z nadwagą mogą zasięgnąć porady lekarskiej w zakresie odchudzania. Lekarz może regularnie sprawdzać poziom lipidów (cholesterol i trójglicerydy) oraz ciśnienie krwi, aby upewnić się, że mają one właściwe wartości. Postępowanie według zaleceń żywieniowych dla osób z cukrzycą, regularne ćwiczenia fizyczne oraz przyjmowanie leków przepisanych przez lekarza jest również pomocne przy zapobieganiu lub opóźnieniu rozwoju po-

wikłań związanych z sercem i naczyniami krwionośnymi. Należy pamiętać, że palenie zwiększa ryzyko wystąpienia tych problemów jak i innych powikłań cukrzycy.

Problemy dotyczące dziąseł

Osoby chore na cukrzycę są bardziej narażone na choroby dziąseł (zwane także chorobami przyzębia), ponieważ mogą mieć:

- Więcej kamienia nazębnego i mniej śliny (zbyt duża ilość kamienia na zębach i niewystarczająca ilość śliny może prowadzić do próchnicy)
- Wyższe poziomy cukru we krwi (osoba ma więcej cukru w ustach, co również może powodować próchnicę)
- Mniejszą ilość kolagenu, czyli białka w tkance włóknistej dziąseł
- Słabe krążenie krwi w dziąsłach

Wszystkie z powyższych czynników mogą przyczynić się do chorób dziąseł. Oznaki to: krwawienie, wrażliwe i bolesne dziąsła, które także mogą ulegać zanikowi (oznacza to, że dziąsła nie pokrywają powierzchni korzeni zębów) lub zmieniać kolor. Dentysta może wykryć tę chorobę w czasie wizyty kontrolnej.

Na szczęście możliwe jest zapobieganie chorobom dziąseł poprzez kontrolę poziomu cukru we krwi, odpowiednie mycie zębów, używanie nici dentystycznej oraz regularne wizyty u stomatologa.

Problemy dotyczące stóp

Po wielu latach trwania cukrzycy mogą pojawić się problemy ze stopami spowodowane słabym krążeniem krwi w stopach oraz uszkodzeniem nerwów (tzw. stopa cukrzycowa).

Po okresie dojrzewania lekarz powinien oglądać stopy pacjenta pod kątem oznak tych powikłań. Należy poinformować lekarza o wystąpieniu jakichkolwiek objawów typu: wrastający paznokieć, modzele czy sucha skóra, jak również o takich sprawach jak uczucie podrażnionej skóry z powodu noszenia określonego rodzaju obuwia lub drobnego urazu.

Aby zapobiec takim problemom, należy nosić wygodne obuwie, które jest dobrze dopasowane oraz przycinać paznokcie do kształtu palca. Ćwiczenia, które poprawiają krążenie krwi w stopach są również wskazane.

Palenie może zwiększyć ryzyko wystąpienia problemów ze stopami lub je pogłębić.

Jak pozostać w dobrej formie przez długie lata

Niektóre powikłania cukrzycowe pojawiają się po wielu, a nawet dziesiątkach

lat trwania choroby, pomimo że niektórzy chorzy nawet nie mają żadnych zauważalnych objawów. I dlatego tak istotne jest postępowanie według planu leczenia oraz troska o zdrowie poprzez regularne wizyty u lekarza i robienie zalecanych badań. Pomoże to wykryć problemy

wynikające z cukrzycy zanim zaczną dawać objawy, a dzięki temu możliwe będzie podjęcie niezbędnego leczenia.

Źródło: http://kidshealth.org/teen/diabetes_basics/what/complications.html

Tłumaczenie: M. Palonek

Stężenie dimeru D u pacjentów z zespołem rozsianego wykrzepiania śródnaczyniowego (DIC) lub podejrzeniem DIC oznaczane z zastosowaniem 3 różnych metod

WOODHAMS BJ¹, ESTEVE F¹, MIGAUD-FRESSART M², WOLF M³ i GRIMAUX M¹

¹Serbio (Diagnostica Stago), Gennevilliers, ²Diagnostica Stago, Asnieres i ³Béclère Hospital, Climart, Francja

Oznaczanie dimeru D okazało się przydatnym i bardzo szybkim wsparciem klinicysty w diagnozowaniu oraz leczeniu pacjentów z zakrzepicą żył głębokich (ZŻG). Istnieje zapotrzebowanie na równie szybką metodę ułatwiającą rozpoznania DIC. Obecnie rozpoznawanie to opiera się na połączeniu badań, z których żadne w rzeczywistości nie jest swoiste dla DIC.

Przeprowadziliśmy badanie celem oceny zmian stężenia dimeru D u pacjentów z podejrzeniem lub klinicznym potwierdzeniem DIC, a także porównania swoistości wyników oznaczeń dimeru D z rutynowymi testami laboratoryjnymi stosowanymi do wspomoczenia diagnozowania DIC. Próbkę uzyskano od 62 pacjentów z podejrzeniem lub potwierdzeniem DIC. W trakcie badania wykonywano rutynowe testy laboratoryjne. Próbkę analizowano retrospektywnie z zastosowaniem 3 różnych metod oznaczania dimeru D firmy Diagnostica Stago – zautomatyzowanego

testu lateksowego (STA Liatest D-Di), ELISA (Asserachrom D-Di) oraz półilościowego testu lateksowego (D-Di Test).

Analiza danych wykazała wynik nieprawidłowy oznaczenia dimeru D w większej liczbie przypadków niż w jakimkolwiek innym pojedynczym teście – Liatest D-Di – 94%, Asserachrom D-Di – 85% i D-Di Test – 77%. Zastosowanie rutynowych testów laboratoryjnych ujawniło znacznie niższy odsetek dodatnich próbek: liczba płytek – 57%, stężenie fibrynogeny – 32%, czas protrombinowy – 72%, FV – 70%, FVII+X – 74%, FII – 72%. Trzy używane testy do oznaczania dimeru D skalibrowano stosując podobną procedurę. Wszystkie testy do oznaczania dimeru D miały podobne zakresy wartości prawidłowych, jednakże w badanych próbkach klinicznych widoczne były pewne różnice pomiędzy nimi. Dla stężenia oznaczanego przy pomocy D-Di Test > Asserachrom D-Di > Liatest D-Di, średnia wartość wy-

niosła odpowiednio $2,9 \pm 2,6$ µg/ml, $4,03 \pm 5,30$ µg/ml i $5,33 \pm 5,74$ µg/ml (wyniki wyrażone w FEU, ekwiwalent fibrynogenu). Różnice te mogą wynikać z rodzaju użytych przeciwciał i/lub dostępności miejsc wiążących w różnych procedurach oznaczeń.

Badanie jasno wykazało, że oznaczenia dimeru D powinny zostać włączone do wszystkich rutynowych zestawów testów laboratoryjnych wspomagających diagnozowanie DIC. Oznaczenia dimeru D w ilościowym teście ELISA i testach lateksowych (Asserachrom D-Di i Liatest) mogą wykazywać większą czułość w odniesieniu do DIC niż powszechnie stosowany półilościowy test lateksowy.

Od redakcji: wyniki badania zostały przedstawione na XV Międzynarodowym Kongresie Fibrynolizy i Proteolizy w HAMAMATSU, Japonia, 25–29.06.2000; opublikowano w FIBRINOLYSIS & PROTEOLYSIS, vol. 14, Suppl.1, 2000



COBAS i LIFE NEEDS ANSWERS są znakami towarowymi należącymi do Roche
©2008 Roche Diagnostics

Roche Diagnostics Polska Sp. z o.o.
www.rochediagnostics.pl

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