

cobas

Life needs answers



Nr
34

ISSN 1644-8448

nakład: 1000 egz.

LabForum

Nowe systemy do diagnostyki
przy łóżku pacjenta
i w samokontroli

Roche



Accutrend Plus



Accu-Chek Go

Accutrend Plus i Accu-Chek Go nowe systemy na polskim rynku



Szanowni Państwo,

Miło mi poinformować, że bieżący rok rozpoczęliśmy wprowadzeniem na polski rynek dwóch nowych systemów przeznaczonych do diagnostyki przy łóżku pacjenta i samokontroli.

Accutrend Plus jest użyteczny również w badaniach przesiewowych układu krążenia. Można przy jego pomocy oznaczać profil lipidowy, a także poziom kwasu mlekowego. Wszystkie oznaczenia wykonuje się na poczekaniu za pomocą pasków testowych.

Go to nowy glukometr ze znanej już Państwu rodziny produktów Accu-Chek. Wy różnia się nowoczesnymi parametrami, funkcjonalną i higieniczną obsługą, oferując dodatkowe możliwości dla osób wymagających. Więcej informacji jest dostępnych na <http://www.accu-chek.pl>.

Proszę o śledzenie artykułów w następnych numerach LabForum, gdyż będziemy szczegółowo prezentować te systemy. W bieżącym numerze polecam uwadze artykuły o autoprzeciwciałach przeciwko receptorowi TSH, diagnostyce zaburzeń biochemicznych w zespole metabolicznym, a także ciekawą relację o dokonaniach laureatów nagrody Nobla 2007 za badania specyficznych modyfikacji genów u myszy.

Jednocześnie chciałbym również zachęcić do zapoznania się z wynikami naszej firmy w skali światowej, osiągniętymi w ubiegłym roku. Dane dostępne są na stronach internetowych, pod adresem <http://www.roche.com/home/media/med-cor/med-cor-2008/med-cor-2008-01-30.htm>.

Spis treści:

Accutrend Plus i Accu-Chek Go nowe systemy na polskim rynku	2
Autoprzeciwciała przeciwko receptorowi TSH – charakterystyka i zastosowanie w rozpoznawaniu i leczeniu chorób tarczycy	3-7
Diagnostyka zaburzeń biochemicznych w zespole metabolicznym	8-9
Wartość diagnostyczna testu STA-Liatest D-dimer u pacjentów ambulatoryjnych z podejrzeniem zatorowości płucnej	10-14
Capecchi, Evans i Smithies, laureaci nagrody Nobla 2007 za badania specyficznych modyfikacji genów u myszy wprowadzanych za pomocą zarodkowych komórek macierzystych	15-16

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 95

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

Autoprzeciwciała przeciwko receptorowi TSH – charakterystyka i zastosowanie w rozpoznawaniu i leczeniu chorób tarczycy

Zbigniew Bartoszewicz^{1,2)} i Agnieszka Kondracka¹⁾

¹⁾ Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych i Endokrynologii AM oraz ²⁾ Zakład Badawczo-Leczniczy Endokrynologii IMDiK, Warszawa

Choroby tarczycy lub zaburzenia jej czynności są bardzo częste, stwierdza się je u kilkunastu procent populacji polskiej. Nierozpoznanie choroby tarczycy i jej etiologii, szczególnie takiej choroby, która przebiega z zaburzeniami funkcji tarczycy opóźnia podjęcie właściwego leczenia. Choroby tarczycy o podłożu autoimmunologicznym (AITD – *autoimmune thyroid diseases*) występują kilkakrotnie częściej u kobiet niż u mężczyzn. Choroba Gravesa-Basedowa (GD – *Graves disease*) dotyczy ok. 1% populacji (do 2% kobiet), natomiast autoimmunologiczne zapalenie tarczycy ujawnia się głównie u kobiet starszych (10% kobiet powyżej 60 lat, 15% powyżej 75 lat). Rozpoznanie przyczyn zaburzenia funkcji tarczycy jak i weryfikowanie skuteczności podjętej terapii ma więc duże znaczenie dla stanu zdrowia społeczeństwa.

Autoprzeciwciała skierowane przeciwko autoantygenom tarczycowym takim jak: peroksydaza tarczycowa (TPO), tyreoglobulina oraz receptor TSH (TSH-R) są od lat wykorzystywane w diagnozowaniu schorzeń tarczycy. Do niedawna za najistotniejsze badanie w diagnozowaniu AITD, a szczególnie GD uważano oznaczenie przeciwciał przeciwperoksydazowych (TPOAb). Od kiedy jednoznacznie wykazano, że głównym czynnikiem etiopatogenetycznym nadczynności tarczycy w GD są autoprzeciwciała stymulujące tarczycowy receptor TSH, a przez to wytwarzanie hormonów tarczycy, oznaczanie przeciwciał przeciwireceptorowych staje się coraz ważniejszym i powszechnie wykorzystywanym badaniem w diagnostyce tej choroby. W zapaleniu tarczycy ty-

pu Hashimoto duże znaczenie, jako jedna z przyczyn niedoczynności gruczołu tarczowego, mogą mieć autoprzeciwciała blokujące aktywność TSH-R.

Przeciwciała przeciwko receptorowi TSH – charakterystyka i oddziaływanie na tarczycę

TSH-R jest receptorem błon tyreocytów podlegającym złożonej obróbce posttranslacyjnej. Zewnątrz błonowa podjednostka α zawierająca miejsce wiążące dla TSH jest w procesie tzw. „złuszczenia” łatwo uwalniana do krwioobiegu, co może sprzyjać procesowi autoimmunologicznemu. Podobnie jak w przypadku wielu innych autoprzeciwciał powstawanie auto-przeciwciał skierowanych przeciwko receptorowi TSH (TRAb – *TSH receptor antibodies*) związane jest ze wzmożoną odpowiedzią układu immunologicznego, który rozpoznaje autoantygen własny jako antygen obcy. Wytwarzane TRAb stanowią heterogenną grupę autoprzeciwciał, które wiążąc się z różnymi częściami zewnątrz błonowej podjednostki TSH-R mogą działać jako agoniści lub antagoniści TSH, co prowadzi do pobudzenia aktywności gruczołu tarczowego (TSI – *thyroid stimulating immunoglobulins*) i/lub jego rozrostu (TGI – *thyroid growth stimulating immunoglobulins*), bądź też do zahamowania jego funkcji (TBAb – *thyroid blocking antibodies*). Nazewnictwo TRAb nie jest jednoznacznie określone i często stosowane skróty pochodzą od różnych nazw określających tę samą grupę auto-przeciwciał. W tabeli 1 przedstawiono różne grupy TRAb, metody ich wykrywania oraz wywoływane efekty biologiczne.

Należy zwrócić uwagę, że najistotniejsze znaczenie w etiopatologii chorób tarczycy mają przeciwciała stymulujące lub hamujące jej aktywność, natomiast powszechnie stosowane, rutynowe metody immunochemiczne pozwalają jedynie na ilościowe oznaczenie przeciwciał blokujących wiązanie TSH do receptora, bez rozróżnienia ich funkcji biologicznych.

Przeciwciała stymulujące mogą wiązać się z receptorem w miejscu przyłączenia TSH, gdzie zastępują działanie ligandu, lub w innym miejscu, gdzie pobudzają aktywność TSH-R samodzielnie lub zwiększają działanie przyłączonego TSH. Skutkiem jest aktywacja cykazy adenylowej i pobudzenie aktywności tyreocytów. Zwykle przeciwciała stymulujące TRAb obecne są w surowicy w małych ilościach, rzędu ng/ml (tzn. trzy rzędy wielkości mniejszych niż ilości TPOAb). Ich przyłączenie wydłuża czas życia receptora przedłużając jednocześnie czas stymulacji, podczas gdy przyłączenie TSH przyspiesza proteolityczny rozkład TSH-R. Przeciwciała stymulujące powodują też rozrost tarczycy, lecz nie ma pewności, czy jest to wyłącznie następstwo ogólnego pobudzenia (analogicznie do wysokiego poziomu TSH), czy też skutek działania odrębnych przeciwciał stymulujących wzrost gruczołu (TGI).

Przeciwciała przeciwko receptorowi TSH blokujące pobudzenie tarczycy sprawiają, że kompleks powstały po ich przyłączeniu nie inicjuje efektów biologicznych, natomiast zablokowane jest wiązanie zarówno TSH jak i przeciwciał stymulujących. Przeciwciała blokujące mogą także hamować aktywację mimo przyłą-

Tabela 1. Klasyfikacja, nazewnictwo i charakterystyka przeciwciał przeciwko TSH-R (TRAb).

Grupa przeciwciał	Mechanizm działania	Występowanie i skutki kliniczne	Metody oznaczania
Stymulujące tarczycę TSI (<i>thyroid stimulating immunoglobulins</i>) TSAb (<i>thyroid stimulating antibodies</i>)	Pobudzają TSH-R w zastępstwie TSH lub zwiększają efektywność działania TSH; przedłużają czas życia receptora.	Powodują przerost tarczycy, nadczynność tarczycy w GD oraz przejściową nadczynność tarczycy u noworodków	Testy biologiczne, cytochemiczne, cytometria przepływowa, mikromacierze.
Blokujące stymulację tarczycy TBAb (<i>thyroid blocking antibodies</i>) TSBAb (<i>thyroid stimulation-blocking antibodies</i>) TSI-block (<i>TSI-blocking</i>)	Blokują aktywację TSH-R przez TSH i przeciwciała stymulujące, zwykle blokują też wiązanie TSH i innych przeciwciał do receptora.	Występują w autoimmunologicznym zapaleniu tarczycy, mogą powodować przejściową niedoczynność lub agenezję tarczycy u noworodków, obecne u większości chorych z GD, a ich występowanie może poprzedzać pojawienie się objawów klinicznych nadczynności tarczycy; są przyczyną ok. 1/3 przypadków niedoczynności tarczycy po leczeniu farmakologicznym GD.	Testy biologiczne, cytochemiczne, cytometria przepływowa, mikromacierze.
Blokujące wiązanie TSH do receptora TSH TBII (<i>TSH binding inhibitory immunoglobulins</i>) TBIAb (<i>TSH binding inhibitory antibodies</i>)	Blokują wiązanie TSH do receptora, mogą zarówno stymulować aktywność receptora jak i blokować jego pobudzanie przez ligand.	Wykrywane w GD i innych autoimmunologicznych chorobach tarczycy oraz w przejściowej nadczynności i niedoczynności tarczycy u noworodków.	Testy immunochemiczne.
Stymulujące wzrost tarczycy TGI (<i>thyroid growth immunoglobulin, thyroid growth stimulating immunoglobulins</i>)	Nie wiadomo, czy jedynym antygenem jest TSH-R, przekaźnikiem pobudzenia nie jest cAMP; ich występowanie bywa kwestionowane.	Mogą występować w GD i wolu obojętnym.	Pomiar indeksu mitotycznego, wiązanie ^3H -tymidyny.
Hamujące wzrost tarczycy TGI-block (<i>thyroid growth immunoglobulin, blocking</i>)	Nie wiadomo, czy antygenem jest TSH-R.	Obecne w niedoczynności tarczycy.	Pomiar indeksu mitotycznego, wiązanie ^3H -tymidyny.
Przeciwciała obojętne	Wiążą się z TSH-R nie wpływając na jego funkcje.	Występują w GD, nie występują u ludzi zdrowych.	Cytometria przepływowa, mikromacierze.
Przeciwciała wielofunkcyjne	Wiążą się z TSH-R.	Nieznane.	Możliwe interferencje podczas oznaczeń.

czenia TSH, w oznaczeniach mogą maskować obecność przeciwciał stymulujących. Skutkiem działania przeciwciał blokujących jest zahamowanie wzrostu tarczycy i hormonogenezy. Przypuszcza się, że istnieją również odrębne przeciwciała wybiórczo hamujące wzrost gruczołu tarczowego (TGI-block), działające bez udziału receptora TSH.

W surowicy pacjentów chorych na GD stwierdzono występowanie nieobecnych u ludzi zdrowych **przeciwciał obojętnych**, rozpoznających fragmenty TSH-R nie związane z jakąkolwiek funkcją i nie wpływających na aktywność tarczycy.

W AITD dochodzi do intensywnego nacieczenia gruczołu tarczowego przez antygenowo-specyficzne limfocyty T i B, a TRAb wytwarzane są przede wszystkim przez komórki osiadłe w tarczycy. Skutek kliniczny zależy przede wszystkim od lokalnego działania wytwarzanych przeciwciał może więc odbiegać od przewidywanego na podstawie zmierzonej aktywności biologicznej przeciwciał w surowicy pacjenta. W chorobie GD lokalne oddziaływanie przeciwciał stymulujących jest często silniejsze, niż by to wynikało ze zmierzonej wypadkowej aktywności biologicznej, brak jest też liniowej korelacji nasile-

nia choroby ze stężeniem TSI w surowicy. Lokalizacja wytwarzania przeciwciał w tarczycy wyjaśnia, dlaczego po leczeniu radiojodem lub po zabiegu chirurgicznym następuje szybki spadek ich stężenia w krążeniu. Także u pacjentów, u których leczenie tyreostatykami jest skuteczne, osiąganiu poprawy towarzyszy szybki i znaczący spadek stężenia przeciwciał, będący dobrym wskaźnikiem progностycznym długotrwałej remisji.

Z receptorem TSH mogą wiązać się i prawdopodobnie zmieniać jego aktywność także przeciwciała skierowane przeciwko bakteriom *Yersinia enterocolica*,

E. coli i innym bakteriom Gram-ujemnym, na których powierzchni znajdują się białka podobne strukturalnie do TSH-R. Stąd możliwa jest reakcja krzyżowa w następstwie infekcji bakteryjnych, chociaż większość chorych po infekcji *Yersinia* nie rozwija choroby GD. Z kolei niszczenie komórek tarczycy związane z infekcją wirusową (nagminne zapalenie przyusznic, wirusowe zapalenie tarczycy) lub z podostym zapaleniem tarczycy często prowadzi do okresowego wzrostu miana TRAb, zwykle jednak nie dochodzi do trwałego uszkodzenia tarczycy i długotrwałego zaburzenia jej funkcji. Choroby wirusowe uważane są za czynnik etiologiczny wielu chorób autoimmunologicznych, jednak w przypadku AITD u ludzi nie ma na to przekonujących dowodów. Udokumentowano natomiast, że nadaktywność układu immunologicznego w okresach silnych zmian równowagi hormonalnej u kobiet (okres poporodowy, okres pokwitania i przekwitania), a także po stresie i interwencjach chirurgicznych może doprowadzić do rozwinięcia AITD.

Identyfikację przeciwciał przeciwtarczycowych w surowicy utrudnia fakt, że w obrębie jednego rodzaju aktywności występują subpopulacje skierowane przeciwko różnym częściom białka receptora lub fragmentom kompleksu TSH-R-TSH. Ponadto w przebiegu choroby proporcje pomiędzy różnymi aktywnościami przeciwciał zmieniają się. Często w surowicy stwierdza się jednocześnie obecność przeciwciał o przeciwstawnej aktywności biologicznej, ujawniających się przy różnych rozcieńczeniach surowicy. I tak u 1/3 pacjentów z GD obecność przeciwciał stymulujących można wykazać jedynie po rozcieńczeniu surowicy, ponieważ ich aktywność jest maskowana przez przeciwciała blokujące. Znaczenie kliniczne niskiego miana przeciwciał stymulujących maskowanych przez przeciwciała blokujące może być bardzo istotne w przypadku przenoszenia ich przez łożysko i oddziaływanie na tarczycę płodu. We krwi noworodków przekazane przez łożysko przeciwciała matki występują w niższym stężeniu, co pozwala ujawnić się głównie aktywności stymulującej. Skutkiem może być inna manifestacja kliniczna obserwowana u dziecka niż u matki.

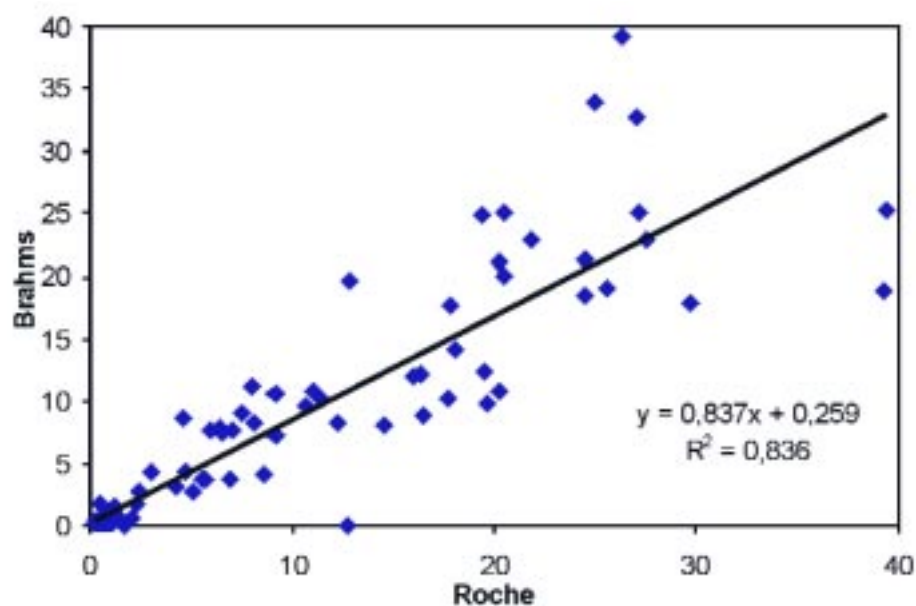
Metody oznaczania przeciwciał przeciwko receptorowi TSH

Ponieważ TRAb mogą wywoływać przeciwstawne efekty (nadczynność tarczycy w GD lub niedoczynność tarczycy w autoimmunologicznym atroficznym zapaleniu gruczołu tarczowego) oznaczenie ich aktywności biologicznej mogłoby wydawać się szczególnie korzystne dla celów klinicznych. Nie jest to jednak badanie dostępne w rutynowej diagnostyce, a interpretacja wyniku często stwarza problemy. Natomiast łatwe do wykonania testy immunochemiczne w powiązaniu z badaniem funkcji tarczycy są ważnym elementem badania klinicznego, umożliwiającym ocenę stanu pacjenta i podjęcie skutecznego leczenia. Poniżej omówiono wybrane metody stosowane do oznaczania poziomu różnych grup TRAb.

Testy immunochemiczne wykrywają wszystkie przeciwciała, które łączą się z receptorem w okolicy miejsca wiązania TSH: hamujące i stymulujące TSH-R oraz obojętne. Testy konstruowane są tak, że obecne w surowicy pacjenta autoprzeciwciała konkurują o miejsce wiązania do receptora TSH ze znakowanym TSH lub ludzkim, monoklonalnym przeciwciałem stymulującym tarczycę (M22). Z większości danych literaturowych wynika, że czułość i wartość prognostyczna oznaczenia TRAb w chorobie GD nie zależy od tego,

czy metoda wykorzystuje rekombinowany, ludzki receptor TSH, czy też receptor wieprzowy. Dane uzyskane w naszym laboratorium (ryc.1) również wskazują na dużą zgodność wyników oznaczeń wykonanych za pomocą powszechnie stosowanego testu firmy Brahms (rekombinowany ludzki TSH-R, znakowany TSH) z nowo wprowadzanym testem firmy Roche (TSH-R wieprzowy, znakowane przeciwciała M22). Komercyjne testy immunochemiczne mają 98% czułość diagnostyczną w wykrywaniu GD, a ich specyficzność wynosi 99%. Mogą być więc znaczącą pomocą przy diagnozowaniu AITD.

Testy biologiczne mierzą aktywność przeciwciał stymulujących lub blokujących TSH-R wykorzystując linie komórkowe stabilnie transfekowane rekombinowanym ludzkim receptorem TSH. Po dodaniu badanej surowicy (w nieobecności lub wraz z TSH) mierzy się stężenie cAMP w pożywce lub zależną od cAMP bioluminescencję. Niestety u większości pacjentów metoda ta nie spełnia warunku liniowej zależności odpowiedzi od rozcieńczenia surowicy, co jest spowodowane heterogennością puli przeciwciał i maskowaniem obecności TSI przez przeciwciała blokujące aktywność TSH-R. Dlatego dla pełnej wiarygodności wyniku wymagane jest zastosowanie szeregu rozcieńczeń badanej próbki surowicy, w przeciwnym wy-



Ryc. 1. Korelacja między wynikami oznaczeń przeciwciał przeciweceptorowych (wyrażonych w IU/L) wykonanych testami firm Roche i Brahms.

padku mierzona jest jedynie wypadkowa aktywność przeciwciał, która nie zawsze prawidłowo koreluje ze stanem klinicznym pacjenta.

Mikromacierze molekularne są konstruowane z wykorzystaniem peptydów odpowiadających poznanym epitopom TSH-R. Można przypuszczać, że w miarę rozwoju tej metody możliwe będzie równoczesne wykrywanie w surowicy grup przeciwciał odpowiadających różnej aktywności biologicznej.

Interpretując wyniki oznaczeń stężenia TRAb, można się liczyć z wynikami fałszywie ujemnymi u pacjentów w początkowym stadium choroby autoimmunologicznej, gdy przeciwciała wytwarzane są wyłącznie w obrębie tarczycy, a w krwi obwodowej pojawiają się nieco później lub przy nawrocie choroby. Także duża ilość podjednostki α TSH-R uwalnianej do krwioobiegu może wiązać część przeciwciał, powodując zaniżenie wyniku. Wysokie stężenie przeciwciał IgG może utrudniać oznaczenie TRAb, podobnie jak przeciwciała o krzyżowym powinowactwie (np. przeciwko *Yersinia*). Przy oznaczaniu aktywności biologicznej TRAb wyniki fałszywie dodatnie może spowodować wysokie stężenie hCG wydzielanej przez nowotwory wywodzące się z trofoblastu, natomiast w ciąży mimo dużej ilości hCG wyników fałszywie dodatnich nie stwierdza się.

Kliniczne zastosowanie oznaczeń autoprzeciwciał przeciw receptorowi TSH

W chorobach tarczycy często powstają narządowo specyficzne przeciwciała, które mogą być jedynie wskaźnikiem uszkodzenia gruczołu tarczowego przez czynniki zewnętrzne, ale mogą także prowadzić do zmian czynnościowych tarczycy albo do jej uszkodzenia, m.in. w wyniku efektu cytotoksycznego. Jednak swoistość diagnostyczna najczęściej oznaczanych przeciwciał przeciwtarczycowych – TPOAb nie jest duża, nawet 10–20% zdrowej populacji może mieć podwyższone miano tych przeciwciał. Znacznie większą swoistość mają oznaczenia obecności w surowicy chorych na AITD przeciwciał przeciwireceptorowych, zarówno blokujących jak

i stymulujących, będących przyczyną zmian aktywności tarczycy. Zwykle obserwowany u pacjenta obraz kliniczny zależy od wypadkowej działania heterogennej puli przeciwciał (przeciwko różnym autoantypom) i uwarunkowany jest rodzajem aktywności dominującej u danego pacjenta na danym etapie choroby. I tak przeważający efekt cytotoksyczny prowadzić będzie do uszkodzenia tarczycy, niezależnie od poprzedzających objawów. Z kolei trudne do przewidzenia przesunięcie równowagi pomiędzy aktywnością przeciwciał przeciwireceptorowych stymulujących i blokujących może tłumaczyć spontaniczną remisję GD np. w czasie ciąży, czy jedynie przejściową hipotyreozę po podaniu radiojodu.

Za podstawową przyczynę występowania objawów GD uważane są przeciwciała przeciwireceptorowe stymulujące tarczycę. Oznaczanie stężenia tych przeciwciał ma więc zastosowanie w diagnostyce różnicowej nadczynności tarczycy. W przypadkach, gdy obraz kliniczny jest niejasny, badanie stężenia TRAb pozwala zróżnicować nadczynność tarczycy o podłożu autoimmunologicznym z nadczynnością uwarunkowaną np. guzkami autonomicznymi lub wieloogniskowymi zmianami guzkowymi. Badanie stężenia TRAb pozwala też na odróżnienie od GD tzw. rozsianej autonomii tarczycy – choroby będącej skutkiem aktywującej tarczycę mutacji receptora TSH. Oznaczanie TRAb jest również użyteczne w przewidywaniu skuteczności leczenia nadczynności o podłożu autoimmunologicznym. Wyraźny spadek stężenia przeciwciał w wyniku leczenia tyreostatykiem pozwala z dużym prawdopodobieństwem prognozować dobry efekt terapeutyczny. Z badań klinicznych wynika, że jeżeli stężenie TRAb obniży się w trakcie leczenia do wartości kontroli, to prawdopodobieństwo długotrwałej remisji wynosi ok. 70%. Jeżeli natomiast utrzymuje się podwyższone stężenie przeciwciał, wskazane jest leczenie radykalne (radiojodem lub operacyjne). Mimo że teoretycznie TSI (mierzone testem biologicznym) powinny być najbardziej swoistym wskaźnikiem

GD i jej przebiegu, to w praktyce okazało się, że dynamika spadku stężenia TBII (mierzonego testem immunochemicznym) daje lepszą informację o prawdopodobieństwie remisji. Wynika to prawdopodobnie z tego, że badanie TBII najlepiej odzwierciedla wielkość całkowitej puli TRAb. Jeżeli wysokie stężenie TBII (>10 IU/l) utrzymuje się po 5–6 miesiącach leczenia farmakologicznego, istnieje duże prawdopodobieństwo wznowy choroby. Wartość predykcyjna oznaczeń TRAb może być jednak znacznie mniejsza dla populacji zamieszkujących regiony o zmniejszonej podaży jodu, gdzie przewlekły niedobór tego pierwiastka chroni przed wystąpieniem ostrej tyreotoksykozy. Należy pamiętać, że remisja może wystąpić również przy wysokim stężeniu TSI na skutek zniszczenia tkanki tarczycy w wyniku efektu cytotoksycznego. Pomiar stężenia TRAb pozwala też zweryfikować przyczynę zmian w tkankach oczodołu u tych chorych, u których nie ma innych typowych klinicznych objawów GD.

U około 1% kobiet w ciąży w I trymestrze może wystąpić tyreotoksykoza związana z ciążą. Jest ona spowodowana przejściową stymulacją tarczycy przez hCG. W trakcie ciąży zwykle stan kobiety polepsza się m.in. z powodu charakterystycznej dla ciąży immunosupresji oraz obniżania się stężenia hCG. Jeżeli jednak tej formie nadczynności towarzyszy podwyższenie stężenia TRAb, to występujące po porodzie pobudzenie układu immunologicznego może doprowadzić do poporodowego zapalenia tarczycy. Rozwija się ono u ok. 50% kobiet ze zwiększonym mianem przeciwciał przeciwtarczycowych, stwierdzanym w I trymestrze ciąży. Monitorowanie stężenia przeciwciał jest więc w tym przypadku wskazane zarówno ze względu na zdrowie matki jak i zagrożenie dla dziecka w przypadku kolejnej ciąży.

U ciężarnych kobiet z GD, także w fazie niedoczynności tarczycy, po jej operacyjnym usunięciu lub terapii radiojodem oznaczenie stężenia TRAb pozwala ocenić ryzyko rozwinięcia zaburzeń czynności tarczycy u dziecka. W III trymestrze ciąży, kiedy ma miejsce intensywne przenikanie

przeciwciał przez łożysko, wysokie stężenie przeciwciał przeciwcceptorowych we krwi matki wskazuje na ryzyko wystąpienia zaburzeń czynności tarczycy u płodu i noworodka. Należy przy tym pamiętać, że u części pacjentek z jawną nadczynnością tarczycy obok przeciwciał stymulujących TSH-R, występują także przeciwciała blokujące, a więc u dziecka może wystąpić zarówno nadczynność, jak i niedoczynność tarczycy. U noworodków urodzonych przez matki z niedoczynnością tarczycy w przebiegu AITD najczęściej występuje przejściowa niedoczynność tarczycy. W uzasadnionych przypadkach oznaczenie stężenia TRAb u kobiet ciężarnych jest wskazane, bo pomaga ustalić etiologię zaburzeń funkcji tarczycy u matki i przewidywać dalszy przebieg zaburzeń funkcji tarczycy w przebiegu ciąży i po rozwiązaniu, a ponadto pozwala na ocenę zagrożenia zaburzeniami funkcji tarczycy u dziecka. Zaleca się oznaczenie TRAb również we krwi noworodków, jeżeli stężenie przeciwciał u matki jest znacznie podwyższone, co może pomóc we wczesnym wykrywaniu zaburzeń tarczycy u dzieci.

TRAb jest również wskaźnikiem przewlekłego autoimmunologicznego zapalenia tarczycy typu Hashimoto, jednak przeciwciała te często pojawiają się w krążeniu dopiero po wystąpieniu klinicznych objawów niedoczynności. Przeciwciała blokujące TSH-R wykrywane są u mniej niż 60% chorych, a za postępujące upośle-

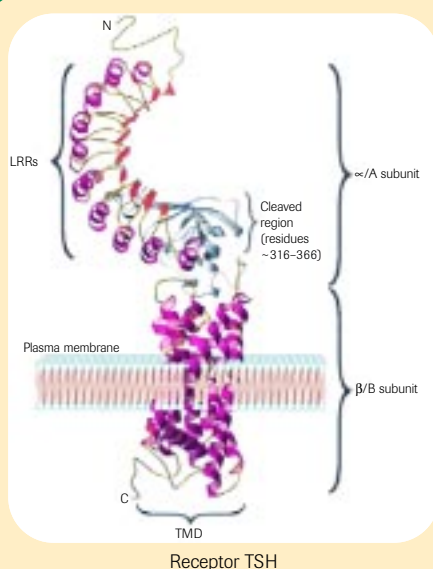
dzienie funkcji tarczycy są odpowiedzialne przede wszystkim liczne lokalne komórkowe i humoralne procesy immunologiczne powodujące niszczenie komórek tarczycy. Wiadomo też, że niedoczynność tarczycy z towarzyszącym jej podwyższonym stężeniem TPOAb występująca w czasie ciąży znacznie zwiększa niebezpieczeństwo samoistnego poronienia. Jeżeli u kobiety ciężarnej stwierdza się wzrost stężenia przeciwciał przeciwtarczycowych, przy prawidłowej funkcji tarczycy, to istnieje zwiększone prawdopodobieństwo, że w ciągu kilku lat rozwinie się u niej jawna niedoczynność tarczycy, istnieje także takie ryzyko w drugiej połowie ciąży. W przebiegu AITD może dochodzić do trudnych do przewidzenia zmian proporcji różnych aktywności przeciwciał przeciwireceptorowych (TSI i TBAb) w obrębie puli TRAb, co powoduje zmianę manifestacji klinicznej choroby. I tak przewlekłe zapalenie tarczycy przebiegające z niedoczynnością tarczycy może przekształcić się w GD. Natomiast u 10–20% pacjentów po okresie eutyrozy osiągniętej w wyniku leczenia farmakologicznego występuje niedoczynność tarczycy. Przeciwciała przeciwtarczycowe, podobnie jak TSH oddziałują na wszystkie tkanki, w których obecny jest TSH-R. W powikłaniach towarzyszących AITD, w oftalmopatii i dermopatiach TSH-R ulega wzmożonej ekspresji w preadipocytach i fibroblastach, które także stają się potencjalny-

mi miejscami działania TRAb. Także przysadkowy TSH-R odpowiedzialny za zwrotne hamowanie sekrecji TSH może być rozpoznawany przez TRAb. Mechanizm powodujący z jednej strony nadczynność tarczycy (związany z pobudzeniem TSH-R przez TSI) może więc wpływać hamująco na sekrecję TSH przez przysadkę. Tłumaczy to, dlaczego pacjenci, którzy osiągnęli eutyreozę w trakcie leczenia GD często mają długotrwale obniżone stężenie TSH.

Podsumowanie

Oznaczanie stężenia autoprzeciwciał przeciw receptorowi TSH przy pomocy testów immunochemicznych jest coraz szerzej stosowane w diagnozowaniu przyczyn nadczynności tarczycy o nieznannej etiologii, monitorowaniu leczenia choroby Grevesa-Basedowa oraz przewidywaniu prawdopodobieństwa jej nawrotu. Jest szczególnie przydatne w ocenie ryzyka wystąpienia nadczynności lub, znacznie rzadziej, niedoczynności tarczycy u noworodków matek z GD spowodowanej przez przeciwciała matki przechodzące przez łożysko, a także w różnicowaniu poporodowego zapalenia tarczycy i GD w przypadkach tyreotoksikozy poporodowej.

Niniejszy artykuł opiera się w części na pracy autorów „Autoprzeciwiactwa przeciwko receptorowi TSH w etiologii i diagnozowaniu chorób tarczycy” Twój Mag. Med. 7/2004, str. 28–35. Piśmiennictwo dostępne u autorów.



Elecsys anti-TSHR

Pierwsze automatyczne ilościowe oznaczanie przeciwciał skierowanych przeciwko receptorowi TSH (TRAb)

material: surowica

czas oznaczania: 18 min.

zakres pomiarowy: 0,3–40,0 IU/L

Standaryzacja wg. międzynarodowego wzorca NIBSC 90/672

Aplikacje do oznaczania na analizatorach:

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

Odczynnik + kalibrator:

Elecsys anti-TSHR, Nr kat.: 04388780190 (100 oznaczeń)

Materiał kontrolny:

PreciControl ThyroAB, Nr kat.: 05042666190 (2 x 2,0 ml)

Test już dostępny w sprzedaży!!!

Diagnostyka zaburzeń biochemicznych w zespole metabolicznym

Grażyna Odrowąż-Sypniewska, Katedra i Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej, Collegium Medicum, Uniwersytet M. Kopernika, Bydgoszcz

Zespół metaboliczny cechuje się jednocześnie występowaniem ściśle ze sobą powiązanych zaburzeń klinicznych i biochemicznych: otyłości brzusznej, oporności na insulinę, hiperglikemii, dyslipidemii, oraz nadciśnienia tętniczego, które zwiększają ryzyko chorobowości i umieralności z powodu choroby niedokrwiennej serca. Patogeneza tego zespołu jest złożona a mechanizmy prowadzące do szeregu zaburzeń biochemicznych nie zostały do końca wyjaśnione. „Epidemia” otyłości centralnej (brzusznej) zwiększa ryzyko występowania zespołu metabolicznego u osób dorosłych w każdym zakątku świata. Częstość zespołu metabolicznego waha się od 10–15% w Finlandii do 22% w Stanach Zjednoczonych. Dane dla populacji polskiej różnią się w zależności od przyjętych dla zespołu metabolicznego kryteriów, ale są zbliżone do danych amerykańskich. Otyłość i zespół metaboliczny nasilają 5-krotnie ryzyko występowania cukrzycy typu 2.

Istnieje kilka definicji zespołu metabolicznego, w tym definicja ustalona przez Światową Organizację Zdrowia (1998 r.), według której otyłość definiowana jest wskaźnikiem masy ciała BMI > 30 kg/m² oraz przez NCEP-ATP III (2001 r.) – określająca otyłość miarą obwodu talii: dla kobiet >88 cm, dla mężczyzn >102 cm. Zgodnie z najnowszą definicją wypracowaną przez Międzynarodową Federację Cukrzycową – IDF (2005 r.) na otyłość brzuszna wskazuje obwód talii >80 cm u kobiet i >94 cm u mężczyzn. Podobnie, zmieniały się kryteria zaburzeń gospodarki węglowodanowej i podwyższonych wartości ciśnienia tętniczego. Bardziej zaostrome, w porównaniu do definicji WHO czy NCEP ATP, kryteria IDF podają wartość 100 mg/dl glikemii na czczo i ciśnienie 130/85 mm Hg.

W zespole metabolicznym charakterystycznymi cechami dyslipidemii są hiper-

triglicerydemia (>150 mg/dl lub >1,7 mmol/L) i obniżone stężenie HDL-cholesterolu (<50 mg/dl lub <1,29 mmol/L dla kobiet; <40 mg/dl lub 1,03 mmol/L dla mężczyzn). Przyjmuje się także, iż optymalne stężenie cholesterolu całkowitego powinno wynosić <200 mg/dl (<5,1 mmol/L) a LDL-cholesterolu <100 mg/dl (2,6 mmol/L). Wykazano, że u osób z otyłością brzuszną i cukrzycą, dyslipidemię charakteryzuje występowanie zwiększonej liczby tzw. małych gęstych LDL. Biochemicznym odzwierciedleniem liczby i wielkości cząsteczek LDL jest stężenie apolipoproteiny B (apoB). Im więcej klinicznych objawów zespołu metabolicznego tym wyższe są stężenia apoB i niższe apo A-I, głównego białka frakcji HDL, czemu towarzyszą wyższe wartości apoB : apoA-I. W 3-letniej obserwacji mężczyzn z objawami zespołu metabolicznego, osoby, u których wskaźnik apoB: apoA-I wynosił >0,74 (umiarkowane ryzyko), wykazywały istotną progresję zmian miażdżycowych ocenianych poprzez pomiar grubości kompleksu błony wewnętrznej i środkowej tętnic szyjnych.

W otyłości tkanka tłuszczowa wykazuje cechy oporności na insulinę co wiąże się z zaburzeniem metabolizmu glukozy w mięśniach i wątrobie. Oznaczenie stężenia glukozy w osoczu na czczo i po doustnym obciążeniu glukozą (DTTG) umożliwiają rozpoznanie nieprawidłowej tolerancji glukozy i cukrzycy. Zgodnie z wytycznymi IDF stężenie glukozy w osoczu w zakresie 100–126 mg/dl (5,6–7,0 mmol/L), a w DTTG po 2 godz. w granicach 140–200 mg/dl (7,8–11,2 mmol/L) wskazują na upośledzenie tolerancji glukozy natomiast stężenie powyżej 126 mg/dl oraz w DTTG po 2 godz. >200 mg/dl wskazują na obecność cukrzycy typu 2. Dla oceny oporności tkanki

na insulinę konieczne jest oznaczenie stężenia insuliny lub C-peptydu, natomiast zależność między glikemią i insulinemią najprościej określa się poprzez wyliczenie wskaźnika homeostazy HOMA (insulinemia x glikemia /22,5).

Ostatnio wskazuje się na rolę γ -glutamylotranspeptydazy (GGTP) jako czynnika ryzyka cukrzycy typu 2 i choroby niedokrwiennej. Wykazano związek pomiędzy aktywnością tego enzymu a cukrzycą typu 2 i nadciśnieniem. Sugeruje się, że GGTP jest nie tylko wskaźnikiem stresu oksydacyjnego, ale także zwiększa powstawanie wolnych rodników tlenowych. Ryzyko względne rozwoju cukrzycy typu 2 jest tym większe im wyższa jest aktywność GGTP. U osób z cukrzycą typu 2 związek między BMI a GGTP zależy istotnie od aktywności enzymu. Czym wyższe wartości GGTP tym obserwowano silniejszą zależność między BMI a dyslipidemią i glikemią.

U osób z zespołem metabolicznym często wykrywa się mikroalbuminurię. Zwiększone wydalenie albumin koreluje zaburzeniem czynności śródbłonna, otyłością, insulinoopornością, hiperlipidemią oraz zwiększonym ryzykiem wystąpienia choroby niedokrwiennej.

Także hiperurykemia może stanowić element zespołu metabolicznego stwierdzono bowiem, iż stężenie kwasu moczowego obniża się wraz ze spadkiem masy ciała i zmniejszeniem ciśnienia krwi, jednak nadal dyskutuje się czy jest to wskaźnik, czy czynnik ryzyka. Mechanizmy prowadzące do wzrostu stężenia kwasu moczowego w zespole metabolicznym są różne: zaburzenie funkcji śródbłonna naczyniowego, hiperinsulinemia obniżająca wydalenie kwasu moczowego przez nerki oraz nieprawidłowa przemiana wolnych kwasów tłuszczowych (WKT), których nadmierne stężenie we krwi jest cechą

charakterystyczną w otyłości, stanowiącą przyczynę retencji kwasu moczowego.

Otyłość, a szczególnie nadmiar tkanki tłuszczowej trzewnej stanowi kluczowy element w zespole metabolicznym. Nasiloną lipolizę w tkance tłuszczowej, stymulowaną przez syntetyzowany w nadmiarze przez komórki tłuszczowe $\text{TNF-}\alpha$, prowadzi do zwiększonego stężenia WKT i hamowania działania insuliny na komórki. W otyłości tkanka tłuszczowa wykazuje cechy oporności na insulinę, co wiąże się z zaburzeniem metabolizmu glukozy w mięśniach i w wątrobie.

Cechą charakterystyczną zespołu metabolicznego jest występowanie stanu prozapalnego i prozakrzepowego. W patogenezie zespołu metabolicznego związanego z otyłością istotnym zjawiskiem jest nasiloną syntezę biologicznie aktywnych prozapalnych cząsteczek – adipokin przez tkankę tłuszczową oraz obniżona synteza i uwalnianie adipokin o właściwościach przeciwzapalnych. Tkanka tłuszczowa poprzez swoją funkcję endokrynną jest istotnym regulatorem wielu procesów w organizmie takich jak łaknienie, metabolizm lipidów i glukozy, odporność, angiogeneza, ciśnienie krwi, hemostaza i reakcja ostrej fazy, a adipokiny spełniają rolę białek sygnałowych. Charakterystyczny dla otyłości stan zapalny o niewielkim nasileniu tłumaczy występowanie nasilonych zmian miażdżycowych w zespole metabolicznym i zwiększone ryzyko występowania incydentów wieńcowych. Adipokiny prozapalne pochodzą zarówno z adipocytów i fibroblastów, jak też z makrofagów, które naciekają tkankę tłuszczową trzewną. Komórki tkanki tłuszczowej syntetyzują ponad 50 różnych związków. Niektóre z nich jak IL-6 , $\text{TNF-}\alpha$, rezystyna, CRP, lipokalina-2 czy PAI-1 są tylko w niewielkiej mierze syntetyzowane przez komórki tłuszczowe (10–12%), z kolei inne: leptyna, adiponektyna i białko wiążące retinol (RBP-4) są syntetyzowane prawie wyłącznie przez adipocyty.

Do grupy prozapalnych cytokin i białek cytokinopodobnych, których synteza i uwalnianie znacznie wzrastają w otyłości należą: leptyna, $\text{TNF-}\alpha$ i IL-6 , CRP, lipokalina-2.

Leptyna – wykazuje wielokierunkowe działanie: prozapalne, immunomodulujące i odpowiada za regulację apetytu przez podwzgórze i bilans energetyczny. Może działać także jako czynnik angiogeny oraz pośredniczyć w procesie krzepnięcia poprzez płytkowy receptor leptyny.

$\text{TNF-}\alpha$ – jest czynnikiem o pleotropowym działaniu a jego nasiloną ekspresję w komórkach tkanki tłuszczowej wiąże się z indukcją oporności na insulinę.

IL-6 – u osób z otyłością i opornością na insulinę jej podwyższone stężenie może być rozpatrywane jako czynnik predykcyjny cukrzycy typu 2 i ostrych zespołów wieńcowych.

CRP – u osób z nadwagą lub otyłością najprostszym sposobem stwierdzenia stanu prozapalnego o niewielkim nasileniu jest oznaczenie stężenia tego białka metodą o wysokiej czułości. Wykazano, że w zespole metabolicznym istnieje silna korelacja dodatnia pomiędzy stężeniem CRP a PAI-1 oraz insulinopornością.

Lipokalina-2 syntetyzowana przez komórki wielu tkanek, także przez adipocyty, niedawno została opisana jako wskaźnik stanu zapalnego o niewielkim nasileniu, którego stężenie znacznie wzrasta u osób z otyłością i jej powikłaniami metabolicznymi. Najnowsze badania dowodzą, że im stężenie lipokaliny-2 wyższe tym większa masa tkanki tłuszczowej, większa insulinoporność, hiperglikemia i hipertriglicydemia a niższe stężenie HDL-cholesterolu.

Typową cechą charakterystyczną zespołu metabolicznego jest występowanie stanu prozakrzepowego. Przewlekły stan zapalny oraz nasiloną lipolizę w tkance tłuszczowej stymulują ekspresję i syntezę PAI-1 i obniżają konwersję plazminogenu do plazminy przyczyniając się do zahamowania fibrynolizy.

PAI-1 jest białkiem fibrynolitycznym, którego podwyższona aktywność u osób otyłych koreluje dodatnio ze stężeniem CRP i insulinopornością natomiast ujemnie ze stężeniem przeciwzapalnej adiponektyny.

Adiponektyna – jest kluczowym białkiem syntetyzowanym przez komórki tłuszczowe, którego stężenie we krwi jest znacznie wyższe w porównaniu do innych adipocytokin. Ma wielokierunkowe działanie, ale u osób otyłych pełni rolę najważniejszej adipokiny przeciwzapalnej. W otyłości i cukrzycy typu 2 stężenie adiponektyny jest znacznie obniżone. Przeciwwapalny charakter adiponektyny hamuje szereg procesów wynikających z prozapalnego działania $\text{TNF-}\alpha$. Adiponektyna reguluje wrażliwość na insulinę (w wątrobie i mięśniach ma działanie insulinopodobne) i zapobiega zmianom zapalnym w naczyniach. Podanie rekombinowanej ludzkiej adiponektyny nasila przyswajanie glukozy przez mięśnie, poprawia wrażliwość na insulinę i obniża glukoneogenezę w wątrobie. Stężenie adiponektyny może być czynnikiem predykcyjnym wystąpienia cukrzycy i ryzyka choroby niedokrwiennej.

Opisane powyżej zaburzenia syntezy i uwalniania prozapalnych i prozakrzepowych adipokin wiążą otyłość centralną-brzuszną z powikłaniami metabolicznymi. Mechanizmy działania adipokin w zespole metabolicznym nie zostały jeszcze do końca poznane a jest to niezbędne do zastosowania odpowiedniego i efektywnego leczenia. Wiadomo jednak, że obniżenie masy ciała i zwiększenie aktywności fizycznej może zapobiec powikłaniom zespołu metabolicznego a w konsekwencji zmniejszyć ryzyko cukrzycy typu 2 i chorób rozwijających się na podłożu miażdżycy.

Piśmiennictwo dostępne w redakcji.



cobas 6000

Wartość diagnostyczna testu *STA-Liatest D-dimer* u pacjentów ambulatoryjnych z podejrzeniem zatorowości płucnej

W. Ghanima,^{1,2} M. Abdelnoor,³ M.-C. Mowinckel² i P. M. Sandset²

¹Department of Medicine, Østfold Hospital Trust, Fredrikstad, ²Department of Haematology, and ³Centre of Clinical Research, Ulleval University Hospital, Oslo, Norwegia

Streszczenie

Badania wykazały, że oznaczanie dimeru D może w niezawodny sposób wykluczyć zatorowość płucną (ZP) u pacjentów ambulatoryjnych. Jednakże różne testy wykazują się różną czułością i swoistością w wykrywaniu zakrzepicy. Celem niniejszej pracy była ocena w prospektywnym badaniu wartości diagnostycznej *STA-Liatest D-Di* u pacjentów ambulatoryjnych kierowanych z podejrzeniem ZP. 495 kolejnych pacjentów z podejrzeniem ZP kierowanych do Østfold Hospital Trust we Fredrikstad, pomiędzy lutym 2002 a grudniem 2003 włączono do badania oceniającego algorytm decyzyjny łączący ocenę prawdopodobieństwa klinicznego (PK), oznaczenia dimeru D oraz wielorzędową tomografię komputerową (MSCT). Oznaczenia dimeru D wykonywano jako pierwszy test. U pacjentów z wynikiem oznaczenia dimeru D $\leq 0,4$ mg/l i niskim/pośrednim PK zaniechano dalszych badań. U pozostałych pacjentów wykonywano MSCT. Wszyscy pacjenci byli poddani 3 miesięcznej obserwacji celem określenia ryzyka zakrzepowo-zatorowego w tym czasie. Kończącą kohortę stanowiło 432 pacjentów. ZP zdiagnozowano u 102 (23%) pacjentów. Przy punkcie odcięcia dla dimeru D na wartości 0,4 mg/l oznaczenia miały najwyższą czułość (100%) i swoistość (36%). W bezpieczny sposób wykluczyły ZP u 120 (28%) pacjentów. Współczynniki kappa dla porównań wobec testów *VIDAS* i *Asserachrom* wykazały dobrą zgodność. *STA-Liatest* jest niezawodnym i użytecznym testem, z pomocą którego można bezpiecznie wykluczyć ZP u pacjentów ambulatoryjnych, o wartości diagnostycznej po-

równywalnej z oznaczaniem stężenia dimeru D w teście immunoenzymatycznym.

Słowa kluczowe: dimer D, zatorowość płucna, czułość, swoistość, krzywa operacyjna zależna od operatora.

Dimer D obecny w osoczu jest produktem degradacji usieciowanej fibryny poprzez plazminę. Podwyższone stężenie dimeru D występuje w stanach prowadzących do aktywacji krzepnięcia krwi i tworzenia się fibryny⁸, np. u pacjentów z ostrą chorobą zakrzepowo-zatorową, ale również w każdym innym stanie związanym z tworzeniem się fibryny, takim jak nowotwór, ciąża, zabieg operacyjny i choroba zapalna. Ogólnie oznaczenia dimeru D cechują się wysoką czułością, ale niezadowalającą swoistością w wykrywaniu żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej (ŻChZZ).

Do oznaczeń dimeru D komercyjnie dostępne jest kilka testów. Jednakże testy te różnią się swoistością przeciwciał oraz metodyką^{4,9}. W rezultacie i różne testy wykazują się różną wartością diagnostyczną i własnościami, a zatem wyniki oznaczeń przy użyciu różnych testów nie są zamiennie^{1,11}.

Obecnie dostępne są trzy metody oznaczania dimeru D: test immunoenzymatyczny (ELISA), test aglutynacji w pełnej krwi oraz test aglutynacji lateksowej. W wykrywaniu ŻChZZ najwyższą czułość (94–100%) wykazują testy oparte na metodzie ELISA i powszechnie uznaje się je za złoty standard oznaczania dimeru D^{1,6,11,15,16}. Testy aglutynacji w pełnej krwi mają niższą czułość (80%), natomiast znacznie wyższą swoistość (90–95%)¹¹. Testy immunoturbidymetryczne cechują się czułością

(90–100%) i swoistością (30–50%) zbliżoną do testów opartych na ELISA^{7,16,19,20}, ale ich główną zaletą jest bardzo krótki czas oznaczania, co czyni te testy wysoce przydatnymi do stosowania w izbie przyjęć.

Z powodu wysokiej czułości, wykonalności, a także względnie niskiego kosztu, oznaczenia dimeru D są coraz częściej stosowane jako test pierwszego wyboru u pacjentów z podejrzeniem ŻChZZ¹⁴. W kilku badaniach oceniano rolę oznaczeń dimeru D u tych pacjentów^{15,16,17,21}. Czułe testy mogą wykluczyć zatorowość płucną (ZP) do 30% pacjentów ambulatoryjnych^{15,16}. Jednakże nadal przedmiotem poważnej debaty jest to, jak i kiedy zastosować oznaczanie dimeru D w diagnostyce ZP¹⁴.

W niniejszej pracy oceniano wartość diagnostyczną powszechnie stosowanego testu immunoturbidymetrycznego (*STA-Liatest D-Di*, Diagnostica Stago) u pacjentów ambulatoryjnych z podejrzeniem ZP wykorzystując jako test referencyjny wielorzędową tomografię komputerową (MSCT). Dodatkowo wartość diagnostyczną testu porównywano z dwoma uznanymi testami do oznaczania dimeru D.

Pacjenci i metody

Pacjenci

Projekt badania opisano szczegółowo w pracy Ghanima i wsp. (2005). W skrócie, 495 kolejnych pacjentów kierowanych z podejrzeniem ZP do Østfold Hospital Trust we Fredrikstad pomiędzy lutym 2002 a grudniem 2003 roku, włączano do badania klinicznego mającego na celu ocenę algorytmu decyzyjnego łączącego oznaczenia dimeru D i MSCT. Pacjentów kwalifikowano w przypadku istniejącego klinicznego

podejrzenia ZP, zdefiniowanego jako ostry początek duszności, ból w klatce piersiowej, kołatanie lub omdlenie i jeśli mieli oni ≥ 18 lat. Pacjentów określono jako ambulatoryjnych gdy czas pomiędzy przyjęciem do szpitala a początkiem klinicznego podejrzenia ZP wynosił poniżej 48 h. Protokół badawczy został zatwierdzony przez Lokalną Komisję Etyczną. Wszyscy pacjenci udzielili świadomą pisemną zgodę w w oparciu o Poprawioną Deklarację Helsińską.

Algorytm diagnostyczny

Dimer D oznaczano przy użyciu testu *STA-Liatest D-Di*, jak opisano poniżej. W oparciu o dane producenta i zawarte w poprzednich doniesieniach^{5,11}, jako punkt odcięcia w algorytmie diagnostycznym definiującym kolejny etap diagnostyki wybrano wartość stężenia dimeru D $\leq 0,4$ mg/L. Następnie prowadzono chorych według prawdopodobieństwa klinicznego (PK), które było oceniane przez leczącego lekarza w oparciu o obecność czynników ryzyka, wyniki prześwietlenia klatki piersiowej, gazometrię krwi tętniczej oraz prawdopodobieństwo rozpoznania alternatywnego według kryteriów zaproponowanych przez Hyers (1999) (Tabela 1.).

U pacjentów ze stężeniem dimeru D $\leq 0,4$ mg/L oraz niskim lub pośrednim (niskie/pośrednie) PK, ZP uznawano za nieobecną i u tych pacjentów zaniechano dodatkowych badań. Badania radiologiczne

przeprowadzano, jeśli w 3 miesięcznym okresie obserwacji byli ponownie przyjmowani z klinicznymi objawami ŻChZZ.

U pacjentów z prawidłowym stężeniem dimeru D ($\leq 0,4$ mg/L), ale wysokim PK oraz pacjentów z podniesionym stężeniem dimeru D wykonywano MSCT. Przy niejednoznacznych wynikach MSCT rozpoznanie weryfikowano za pomocą ultrasonografii uciskowej kończyn dolnych, scyntygrafii perfuzyjnej płuc lub angiografii płuc. Wszyscy pacjenci, u których wykluczono ZP poprzez oznaczenia dimeru D lub MSCT byli poddani 3 miesięcznemu okresowi obserwacji celem oceny ryzyka wystąpienia ŻChZZ¹⁰.

Zatem same wyniki obserwacji służyły jako test referencyjny dla pacjentów z poziomem dimeru D $\leq 0,4$ mg/L i niskim/pośrednim PK, natomiast wyniki MSCT i obserwacji były odniesieniem dla pozostałych pacjentów.

Pobieranie krwi i oznaczenia dimeru D

Przy przyjmowaniu pobierano pełną krew (dziesięć porcji) była do probówek próżniowych (Vacutainer, Becton-Dickinson) zawierających 0,129 mol/L cytrynianu sodu (jedna porcja), po czym wirowano 15 min przy 2600 g. Świeże próbki oznaczano przy użyciu testu *STA-Liatest D-Di* w Centralnym Laboratorium w *Østfold Hospital Trust* w Fredrikstad. Osocza otrzymane od 291 pacjentów były porcjowane i przechowywa-

ne w -70°C do testów porównawczych. Próbkę tę następnie analizowano w *Haematology Research Laboratory, Department of Haematology, Ullevål University Hospital*.

Oznaczenia *STA-Liatest D-Di* wykonywano w automatycznym analizatorze krzepnięcia (STA-R; Diagnostica Stago). Ten test jest ilościową, immunoturbidymetryczną metodą wykorzystującą dwa przeciwciała monoklonalne skierowane przeciw dimerowi D i kowalencyjnie związane z mikrocząsteczkami lateksu. Dimer D oznaczano również w przechowanych próbkach z wykorzystaniem dwóch ilościowych testów opartych na metodzie ELISA: VIDAS d-dimer New (BioMerieux) w immunoanalizatorze VIDAS (BioMerieux) oraz Asserachrom d-dimer ELISA (Diagnostica Stago). Technicy wykonujący testy nie znali danych klinicznych pacjentów.

Analiza statystyczna

Czułość, swoistość, negatywne i pozytywne wartości predykcyjne (NPV i PPV) oraz ilorazy wiarygodności (LR) wyliczono przy pomocy oprogramowania OPENEPI (Atlanta, GA, USA). Znaczące różnice we współczynnikach umieralności badano przy użyciu 3 x 2 tablicy rozkładu testu chi-kwadrat przy wartości p wynoszącej 0,05. Do analizy zależności dawka-odpowiedź wykorzystano test Mantela-Haenszela trendu liniowego¹⁸. Krzywe operacyjne zależne od operatora (krzywe ROC) tworzone wykreślając czułość (*true positive rate* = TP) wobec 1-swoistość (*false positive rate* = FP) z zastosowaniem kalkulatora internetowego do tworzenia krzywych ROC umieszczonego na stronie Uniwersytetu Johnsa Hopkinsa (Baltimore, MD, USA).

Zgodność pomiędzy dwoma testami oceniano wyliczając współczynnik kappa (Cohena) wykorzystując kalkulator internetowy MedCalc 3000. Wartość kappa $> 0,81$ przedstawiała doskonałą zgodność, 0,80–0,61 dobrą zgodność, 0,60–0,41 średnią zgodność, 0,40–0,21 słabą, a $< 0,20$ małą zgodność.

Wyniki

Do badania zakwalifikowano całkowitą liczbę 492 pacjentów. Sześćdziesięciu pacjentów wyłączono. Kończącą kohortę stanowiło 432 pacjentów (mężczyźni/kobiety = 201/231).

Tabela 1. Ocena prawdopodobieństwa klinicznego zatorowości płucnej według kryteriów zaproponowanych przez Hyers (1999).

Wysokie prawdopodobieństwo kliniczne:

Obecny czynnik ryzyka*
Duszność, tachypnoe lub ból opłucnowy, których nie można wytłumaczyć inną przyczyną
Nieprawidłowości radiograficzne i zaburzenia wymiany gazowej, których nie można wytłumaczyć inną przyczyną

Pośrednie prawdopodobieństwo kliniczne:

Ani wysokie, ani niskie prawdopodobieństwo kliniczne

Niskie prawdopodobieństwo kliniczne:

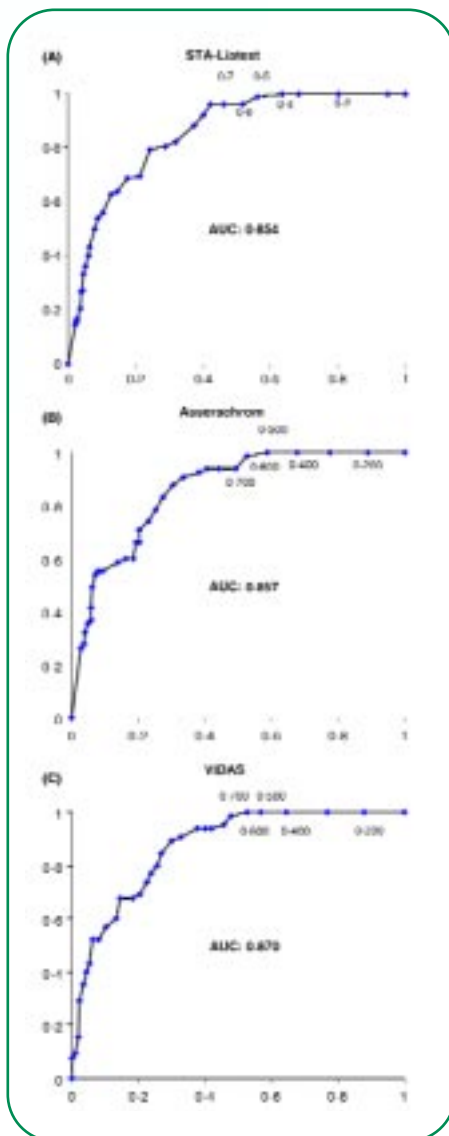
Duszność, tachypnoe lub ból opłucnowy mogą być obecne, ale można je wytłumaczyć obecnością innego zaburzenia
Nieprawidłowości radiograficzne i zaburzenia wymiany gazowej, ale można je wytłumaczyć obecnością innej patologii

* Żylna choroba zakrzepowo-zatorowa w wywiadzie rodzinnym, nowotwór, trombofilia, unieruchomienie > 3 d., zabieg operacyjny w ciągu poprzednich 12 tygodni, doustne środki antykoncepcyjne, hormonoterapia zastępcza, niedawna podróż drogą lotniczą > 4 godz. w ciągu ostatnich 2 tygodni, okres poporodowy.

Mediana wieku wyniosła 58 lat (zakres od 18 do 94 lat). Przyczyny wyłączenia omówiono w innym miejscu¹⁰.

Zatorowość płucną zdiagnozowano u 102 pacjentów [23,6% (95% CI 20–28%)]. Obrazy uzyskane w MSCT były jednoznacznie dodatnie u 93 pacjentów [21,5% (95% CI 18–26)]. U dziewięciu pacjentów interpretacja była mniej jasna. Jednakże ci pacjenci otrzymywali leczenie przeciwkrzepliwie z powodu rozpoznania ZŻG na podstawie dodatniego wyniku ultrasonografii w dwóch przypadkach oraz klinicznej oceny popartej wynikiem MSCT przy braku alternatywnej diagnozy u pozostałych siedmiu pacjentów.

Krzywa ROC dla *STA-Liatest D-Di* została utworzona na podstawie wyników oznaczeń dimeru D dla całej kohorty wykazując czułość i 1 – swoistość przy różnych punktach odcięcia (Ryc. 1.). Wartość pola pod krzywą (ang. *area under curve*, AUC) oszacowano na 0,854. Najwyższa czułość i negatywna wartość predykcja osiągnięta w tym teście wyniosła 100%. Według analizy krzywej ROC najwyższy punkt odcięcia dający 100% czułość znajdował się przy wartości 0,4 mg/L. U 120 pacjentów [28% (95% CI 24–32)] wartość stężenia dimeru D była $\leq 0,4$ mg/L. Swoistość i NPV przy poziomie odcięcia wyniosły odpowiednio 36% i 100%. PK dla ZP było niskie/pośrednie u 103 (86%), a wysokie u pozostałych 17 (14%) pacjentów. U żadnego z tych 17 pacjentów nie zdiagnozowano ZP w MSCT. Ryzyko zakrzepowo-zatorowe w 3 miesiącach dla pacjentów z wartością dimeru D $\leq 0,4$ mg/L wyniosło 0% (95% CI 0–2,5%).



Ryc. 1. Krzywe operacyjne zależne od operatora dla *STA-Liatest D-Di* ($n = 432$), *VIDAS d-dimer* ($n = 291$) i *Asserachrom d-dimer* ($n = 291$). Oś odciętych = czułość, rzędnych = swoistość. AUC, pole pod krzywą

Efekt podnoszenia poziomu odcięcia na wartość diagnostyczną testu ilustruje Tabela 2. Tylko u jednego pacjenta doszło do ZP przy stężeniu dimeru D wynoszącym 0,5 mg/L, co wpłynęło na wartość diagnostyczną tego testu nieznacznym obniżeniem czułości (99%) za cenę podniesienia swoistości do 43%.

PK dla ZP oszacowano u 398 (92%) pacjentów. Niepełna diagnostyka uniemożliwiła oszacowanie PK u pozostałych 8% pacjentów. ZP zdiagnozowano u 47 z 305 (15%) pacjentów z niskim/pośrednim PK oraz u 41 z 79 (52%) pacjentów z wysokim PK.

Chorobowość na ZP stopniowo rosła wraz ze stężeniem dimeru D (Tabela 3.); dla wartości 1–2,4 i $\geq 2,5$ mg/L nastąpił odpowiednio 2,5- i sześciokrotny wzrost chorobowości na ZP, w porównaniu z zakresem 0,5–0,9 mg/L. Analiza trendu dała $\chi^2_{\text{trend}} = 56,18$ przy $df = 1$ ($p < 0,0005$), wykazując znamiennej zależność dawka–odpowiedź pomiędzy stężeniem dimeru D a częstością ZP.

Podczas 3 miesięcznego okresu obserwacji zmarło dziewięciu pacjentów. Czterech z nich leczono z powodu ZP. Jednakże wszystkie zgony nastąpiły u chorych z wynikami oznaczeń dimeru D $\geq 2,5$ mg/L dając w tej grupie po trzech miesiącach współczynnik umieralności 7,7% (95% CI 3,9–15,3) ($P < 0,0005$).

Porównanie z testami VIDAS i Asserachrom d-dimer wykonano dla 291 pacjentów. Współczynnik zgodności kappa pomiędzy *STA-Liatest D-Di* wobec VIDAS i Asserachrom wykazał dobrą zgodność,

Tabela 2. Wartość diagnostyczna *STA-Liatest d-dimer* przy różnych wartościach odcięcia. 3 miesięczne ryzyko zakrzepowo-zatorowe dla pacjentów z wynikiem oznaczenia dimeru D $\leq 0,7$ wyniosło 0%

Odcięcie mg/L	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7
czułość %	100 (96,3–100)	100 (96,3–100)	99 (94,0–99,0)	96 (90,3–98,4)	96 (90,3–98,4)
swoistość %	31 (26,7–36,7)	36 (31,3–41,6)	43 (38,3–49)	48 (4,1–53,8)	53,6 (48,5–59,2)
NPV %	100 (96,4–100)	100 (96,9–100)	99,3 (96,2–99,8)	97,5 (93,9–99)	97,8 (94,4–99,1)
PPV %	31 (26,3–36,3)	32 (27,7–38,0)	35 (29,9–40,8)	36,5 (31–42,4)	39,2 (33,3–45,3)
LR+	1,4 (1,44–1,47)	1,5 (1,55–1,58)	1,7 (1,73–1,77)	1,8 (1,84–1,88)	2,0 (2,05–2,11)
LR-	0	0	0,02 (0,0–0,16)	0,08 (0,04–0,13)	0,07 (0,04–0,11)
wskaźnik wykluczenia %	24 (20–28)	27,7 (23–32)	33,5 (29–38)	38 (33–42)	42 (37–46)

W nawiasach podano wartości 95% CI.

NPV, negatywna wartość predykcja; PPV, pozytywna wartość predykcja; LR, iloraz wiarygodności.

Tabela 3. Chorobowość na zatorowość płucną (ZP) według stężenia dimeru D

Dimer D, mg/L (n)	0,5–0,9 (86)	1,0–2,4 (110)	2,5 (116)
obserwowana ZP (n)	8	26	68
chorobowość na ZP (%)	9,6	23,6	60
iloraz szans	1	3,0	13,8
iloraz wiarygodności+	0,3	1,0	4,6

Tabela 4. Współczynnik zgodności kappa

	VIDAS 0,5 mg/l	Asserachrom 0,5 mg/l
STA Liatest $\leq 0,5$ mg/L	0,78	0,75
STA Liatest $\leq 0,4$ mg/L	0,80	0,77
Asserachrom $< 0,5$ mg/L	0,91	

Tabela 5. Wartość diagnostyczna testów VIDAS i Asserachrom d-dimers u 291 pacjentów

VIDAS Odcięcie mg/L	Asserachrom			
	0,5	0,6	0,5	0,6
czułość %	100 (94,4–100)	100 (94,4–100)	100 (94,4–100)	98,4 (91,79–99,73)
swoistość %	43,3 (37–49,8)	47,3 (40,9–53,8)	41,1 (34,9–47,6)	47,3 (40,9–53,8)
NPV %	100 (96,2–100)	100 (96,05–100)	100 (96,0–100)	99,0 (94,9–99,8)
PPV %	33,6 (27,3–40,6)	35,3 (28,7–42,4)	32,8 (26,6–39,6)	34,9 (28,4–42,1)
LR+	1,76 (1,73–1,79)	1,89 (1,86–1,93)	1,69 (1,67–1,72)	1,87 (1,83–1,90)
LR-	0,0	0,0	0,0	0,032 (0,00–0,23)
współczynnik wykluczenia	33,6 (28–39)	36,7 (31–42)	31 (26–37)	37,1 (31–42)

W nawiasach podano wartości 95% CI.

NPV, negatywna wartość predykcyjna; PPV, pozytywna wartość predykcyjna; LR, iloraz wiarygodności.

co przedstawiono w Tabeli 4. Wartość diagnostyczną tych dwóch testów zilustrowano w Tabeli 5.

Dyskusja

Celem niniejszego badania była ocena roli i wartości diagnostycznej testu STA-Liatest u pacjentów ambulatoryjnych z podejrzeniem ZP włączonych do prospektywnego badania oraz weryfikacja wyników poprzez porównanie wyników testu z rezultatami otrzymanymi przy pomocy powszechnie uznanych testów opartych na metodzie ELISA. Przy poziomie odcięcia 0,4 mg/L skuteczność testu była doskonała, bezpiecznie wykluczając ZP u 28% pacjentów ambulatoryjnych (czułość 100%, swoistość 36%). Podniesienie poziomu odcięcia do 0,5 mg/L zwiększyło swoistość (43%) i współczynnik wykluczenia (34%) kosztem nieznacznego zmniejszenia czułości

(99%) oraz NPV (99,3%) testu. Wartości odcięcia $> 0,5$ mg/L wiązały się ze zbyt dużą liczbą fałszywie ujemnych wyników, aby mogły być uznane za przydatne w praktyce klinicznej.

Ponieważ badanie MSCT wykonywano u pacjentów z PK niezależnie od stężenia dimeru D, to rzeczywisty odsetek pacjentów, u których wykluczono ZP poprzez same oznaczenia dimeru D wyniósł 24% i 29% odpowiednio dla poziomów odcięcia 0,4 i 0,5 mg/L. ZP zdiagnozowano jedynie u jednego pacjenta z wartością 0,5 mg/L w teście STA-Liatest D-Di (VIDAS = 0,698 mg/L, Asserachrom = 0,675 mg/L). Jednakże pacjent ten miał wysokie PK dla ZP, a zatem jest mało prawdopodobne, żeby nie postawiono właściwego rozpoznania przy podniesieniu poziomu odcięcia do 0,5 mg/L. Pomimo że poziom odcięcia $\leq 0,4$ mg/L wydaje

się najbezpieczniejszy, można uwzględnić podniesienie poziomu odcięcia do 0,5, jednakże należałoby je stosować w ścisłym połączeniu z oceną PK.

Stężenie dimeru D $\leq 0,4$ mg/L stwierdzono u dziesięciu pacjentów, zostali oni jednak wykluczeni z badania z powodu nieprzestrzegania protokołu. U żadnego z nich w następnych 3 miesiącach nie wystąpiła ŻChZZ. Dołączenie ich do pozostałych pacjentów z wynikami oznaczeń dimeru D $\leq 0,4$ mg/L spowodowałoby podniesienie całkowitej wydajności czułości diagnostycznej oznaczania D-dimerów do 30%.

Pomimo że ocena PK wydawała się nie odgrywać żadnej roli przy poziomie odcięcia $\leq 0,4$, to liczba pacjentów w grupie

wysokiego ryzyka była zbyt mała i 95% przedziały ufności były zbyt szerokie, aby wyciągać ostateczne wnioski odnośnie bezpieczeństwa oznaczeń D-dimerów bez oceny PK w grupie wysokiego ryzyka. Nawet jeśli bezpieczeństwo takiego podejścia jest udokumentowane, to jego wartość w tej grupie nadal będzie kwestionowana z powodu małej swoistości i w konsekwencji, należałoby zbadać dużą liczbę w celu wykluczenia ZP.

W kilku badaniach oceniano wartość diagnostyczną STA-Liatest D-Di. Dla poziomu odcięcia 0,5 mg/L czułość przedstawiona w tych pracach kształtowała się w zakresie pomiędzy 94% a 100%^{2,3,5,11,13,14,20}. Jednakże wiele z tych badań było albo retrospektywnymi², niewielkimi badaniami prospektywnymi wykonanymi głównie dla pacjentów z podejrzeniem zakrzepicy żył głębokich^{5,11,20} lub dużymi prospektyw-

nymi badaniami, w których retrospektywnie analizowano *STA-Liatest D-Di* w przechowywanych próbkach osocza³. Zgodnie z wiedzą autorów, niniejsze badanie jest największą próbą kliniczną oceniającą wartość diagnostyczną testu *STA-Liatest D-Di*, wykonywanego w analizatorze *STA-R*, u pacjentów z podejrzeniem ZP w badaniu, w którym u większości pacjentów jako test referencyjny zastosowano MSCT.

W niniejszym badaniu test *STA-Liatest* wykazywał niemal jednakową wartość diagnostyczną, jak testy oparte na metodzie ELISA w odniesieniu do jego bezpieczeństwa i skuteczności. Test VIDAS powszechnie uznaje się za złoty standard w oznaczeniach dimeru D. Był on weryfikowany w wielu badaniach klinicznych. Dobrze udokumentowano, że przy pomocy tego testu można bezpiecznie wykluczyć ŻChZZ u około 30% pacjentów niezależnie od PK^{15, 16, 17}. W analizie porównawczej *STA-Liatest* wykazywał nieznacznie niższą swoistość w szczególności w porównaniu z VIDAS d-dimer (Ryc. 1.). Ten trend zaobserwowano w kilku innych pracach^{2, 11, 20}. Przy 100% poziomie czułości współczynniki wykluczenia testów VIDAS i Asserachrom przy poziomie odcięcia 0,5 mg/L wyniosły odpowiednio 34% i 32% w porównaniu z 28% dla *STA-Liatest* (odcięcie 0,4 mg/L). Jednakże wykorzystanie automatycznych analizatorów krzepnięcia z krótkimi czasami oznaczania powoduje, że ten test jest wysoce atrakcyjny i odpowiedni do stosowania w praktyce klinicznej, szczególnie w izbie przyjęć.

Wskaźniki zgodności pomiędzy tymi testami były dobre (Tabela 4.). Jednakże w innych pracach przedstawiono znaczne różnice w stopniach zgodności od średniej^{2, 11, 20} do idealnej (Barro i wsp., 1999; Waser i wsp., 2005). Na wyniki analiz porównawczych mogły mieć wpływ różnice w miejscach wykonywania testów, a szczególnie *STA-Liatest*, który był przeprowadzany w rutynowo w klinice, podczas gdy testy ELISA wykonywano w laboratoriach badawczych, tj. w wystandaryzowanych warunkach.

Bosson i wsp. (2005) wykazali, że wartości oznaczeń dimeru D >2 mg/L w dobrze zdefiniowanej populacji niskiego ryzyka były wskaźnikiem wystąpienia ZP. Dodanie PK do wyniku oznaczeń D-dime-

rów >2 mg/L jeszcze podniosła wartość predykcyjną tego testu³. Niniejsze badanie potwierdziło wartość predykcyjną nieprawidłowego wyniku *STA-Liatest d-dimer* w losowo wybranej kohorcie pacjentów ambulatoryjnych (Tabela 3.). Chorobowość na ZP rosła stopniowo wraz ze stężeniem dimeru D aż do 60% w grupie pacjentów z wynikiem oznaczeń dimeru D $\geq 2,5$ mg/L. Ten współczynnik chorobowości był nieznacznie wyższy niż współczynnik w grupie PK niniejszego badania, ale bliższy przedstawianemu w innych pracach wykorzystujących wystandaryzowane algorytmy rozpoznania (80%)²². Dlatego stratyfikacja pacjentów zgodnie z wartościami oznaczenia dimeru D umożliwia proste i szybkie oszacowanie prawdopodobieństwa ZP, które byłoby wartościowe w diagnostyce pacjentów z zwiększonym stężeniem dimeru D. Z powodu heterogenności właściwości dimeru D, model ten nie może być ekstrapolowany na inne testy. Ponadto wartości stężeń dimeru D $\geq 2,5$ mg/L były związane ze znacznie wyższą umieralnością w ciągu 3 miesięcy. Ten wynik ma przede wszystkim wartość predykcyjną i ograniczone znaczenie diagnostyczne poza wskazaniem obecności zasadniczej poważnej patologii wymagającej kompleksowej diagnostyki.

Niniejsze badanie posiada trzy ograniczenia. Po pierwsze MSCT nie wykonano u wszystkich pacjentów. MSCT nie przeprowadzono u pacjentów z niskim/po-

średnim PK i wynikiem oznaczeń dimeru D $\leq 0,4$ mg/L. Dlatego nie można wykluczyć możliwości, że drobna ZP mogła być wykryta, jeżeli u tych pacjentów wykonano MSCT. Jednakże autorzy uważają to za mało prawdopodobne, ponieważ w 3 miesięcznym okresie obserwacji nie wykryto u nich ŻChZZ. Po drugie, do *STA-Liatest* zastosowano skalę nominalną z jednym miejscem dziesiętnym. Taka skala mogła uniemożliwić określenie bardziej precyzyjnego poziomu odcięcia. Po trzecie, do przeprowadzenia porównania z oznaczeniami ELISA próbki osocza były dostępne jedynie od dwóch trzecich pacjentów. Probki te były przygotowane na żądanie przez techników laboratoryjnych nie dysponujących żadną wiedzą odnośnie rozpoznania. Dlatego autorzy nie podejrzewają wystąpienia żadnego błędu systematycznego.

Podsumowując, *STA-Liatest D-Di* to niezawodny, skuteczny test mogący bezpiecznie wykluczyć ZP u pacjentów ambulatoryjnych z wartością diagnostyczną porównywalną do testów do oznaczeń dimeru D metodą ELISA. Ponadto test ten jest wysoce przydatny do stosowania w izbie przyjęć.

Artykuł opublikowano w (c) 2005 Blackwell Publishing Ltd, *British Journal of Haematology*, 132, 210–215

Tłumaczenie redakcja

Piśmiennictwo dostępne w redakcji.



STA® R Evolution

Capecchi, Evans i Smithies, laureaci nagrody Nobla 2007 za badania specyficznych modyfikacji genów u myszy wprowadzanych za pomocą zarodkowych komórek macierzystych

Iwona Grabowska, Zakład Cytologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

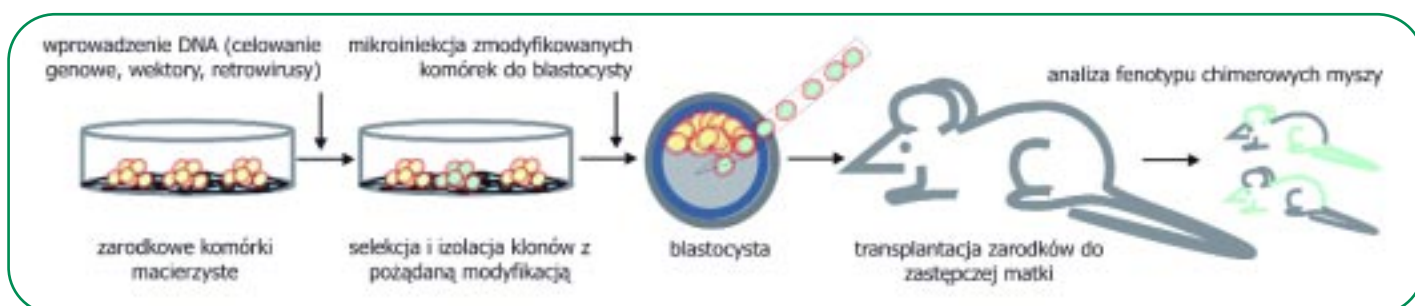
Uhonorowani badacze opracowali technikę, która pozwala na precyzyjne manipulacje genetyczne u myszy, dzięki czemu możliwe stało się stworzenie zwierzęcych modeli wielu ludzkich chorób. Capecchi i Smithies wraz z ze współpracownikami udowodnili, że w komórkach ssaków znajduje się aparat enzymatyczny pozwalający na rekombinację pomiędzy DNA „dostarczoną” do komórki a homologiczną sekwencją znajdującą się na chromosomie (*in situ*) [Smithies *et al.*, 1985; Wong i Capecchi, 1986]. Technika ta nazywana celowaniem genowym (ang. *gene targeting*) polega na wymianie dowolnych fragmentów DNA i umożliwia wprowadzanie do genu takich modyfikacji, które pozwalają na jego naprawę lub wyłączenie (nokaut).

W 1981 roku dwie niezależne grupy naukowców ogłosiły uzyskanie linii komórkowej zarodkowych komórek macierzystych z hodowli wczesnych zarodków mysich [Evans i Kaufman, 1981; Martin, 1981]. Komórki pochodzące z wczesnych stadiów rozwojowych zarodków (zarodki złożone z 2, 3 i 4 komórek) są komórkami totipotentnymi i mogą tworzyć wszystkie tkanki dorosłego organizmu, około 200 rodzajów wyspecjalizowanych komórek soma-

tycznych oraz uczestniczą *in vivo* w formowaniu struktur pozazarodkowych [Draper *et al.*, 2004]. Zarodkowe komórki macierzyste (ES) są pluripotentnymi komórkami pochodzącymi z węzła zarodkowego blastocysty. Można je też uzyskać z pierwotnych komórek płciowych wyizolowanych z listew płciowych zarodków na późniejszych stadiach rozwoju. Wykazują one największą zdolność do różnicowania w wyspecjalizowane tkanki i prawie nieograniczoną możliwość odtwarzania własnej populacji. Te cechy powodują, iż zarodkowe komórki macierzyste budzą wielkie nadzieje związane z możliwością stosowania ich w terapii, ale jednocześnie są przyczyną wielu obaw [Wobus i Boheler, 2005]. Wśród poznanych do tej pory komórek macierzystych wyróżnia je stosunkowo łatwy sposób uzyskiwania i powiększania populacji w hodowli *in vitro*. W odpowiednich warunkach komórki te można hodować bez wywoływania ich różnicowania. Zarodkowe komórki macierzyste zostały najlepiej poznane zarówno pod względem mechanizmów molekularnych warunkujących ich pluripotentność i zdolność do samoodnawiania się, jak też mechanizmów zaangażowanych w ich różnicowanie. Komórki

te wykazują zdolność do różnicowania we wszystkie linie komórek obecne w organizmie, wyłączając w to komórki linii płciowej. Fakt ten ma ogromne znaczenie podczas tworzenia genetycznie modyfikowanych myszy. W regulację podziałów i utrzymaniu stanu nieodróżnicowania ES myszy zaangażowane są białka Nanog, Oct3/4 i STAT3. Nanog jest czynnikiem transkrypcyjnym występującym w komórkach węzła zarodkowego *in vivo* i nieodróżnicowanych komórkach ES *in vitro*. Podczas różnicowania jego synteza ulega zmniejszeniu. Brak czynnika Nanog u myszy powoduje zainicjowanie tworzenia pierwotnej endodermy, wynikające z ekspresji genów kodujących czynniki transkrypcyjne Gata4 i Gata6. Nanog jest odpowiedzialny za odtwarzanie populacji nieodróżnicowanych ES. Mechanizmy zaangażowane w regulację Nanog nie są do końca poznane, ale istnieją prace sugerujące oddziaływania z Oct3/4 i Sox2, które posiadają miejsca wiązania do promotora Nanog [Stewart *et al.*, 2006].

Wprowadzenie do rozwijającego się zarodka (blastocysty) zmodyfikowanych genetycznie zarodkowych komórek macierzystych prowadzi do powstania organizmu, który będzie chimerą (Rycina 1).



Rycina 1. Schemat zastosowania technik opracowanych przez Noblistów do tworzenia genetycznie modyfikowanych myszy.

Połączenie technik opracowanych przez nagrodzonych naukowców pozwoliło na tworzenia modeli zwierzęcych służących do badania ludzkich chorób i testowania różnych możliwości ich leczenia.

Mysie zarodkowe komórki macierzyste wprowadzone do rozwijającego się zarodka uczestniczą w tworzeniu wszystkich narządów i tkanek zarodka, łącznie z linią komórek płciowych [Wexler *et al.*, 2003]. Jeżeli wprowadzone do blastocysty komórki wezmą udział w tworzeniu

komórek linii płciowej to po odpowiednim krzyżowaniu potomstwa można uzyskać zmodyfikowaną genetycznie mysz, która będzie stanowiła model w badaniach. Do tej pory udało się już „znokautować” ponad 10 tys. genów i utworzyć ponad 500 zwierzęcych modeli ludzkich chorób. Zastosowanie tych fundamentalnych dla inżynierii genetycznej technik stało się podstawą badań dla wielu naukowców.

Piśmiennictwo dostępne w redakcji.