

# diagnostyka laboratoryjna

## Journal of Laboratory Diagnostics

### Redaktor Naczelny / Editor in Chief

Jan Kanty Kulpa (Poland)

### Redaktorzy Prowadzący / Managing Editors

Urszula Rychlik (Poland)

Ewa Wójcik (Poland)

### Redaktor Statystyczny / Statistical Editor

Andrzej Sokołowski (Poland)

### Sekretarz Redakcji / Secretary of Editorial Office

Magdalena Bednarska (Poland)

### Redaktorzy Działów / Section Editors

Milena Dąbrowska	– hematologia / haematology
Anna Raszeja-Specht	– zaburzenia krzepnięcia / coagulation disorders
Maciej Szmitkowski	– biochemia kliniczna / clinical biochemistry
Joanna Niemiec	– biologia molekularna / molecular biology
Marta Faryna	– endokrynologia / endocrinology
Przemysław Tomasiak	– pediatria / pediatrics
Marta Wróblewska	– mikrobiologia / microbiology
Dagna Bobilewicz	– płyny ustrojowe / urine and body fluid
Przemysław Myjak	– parazytologia / parasitology

### Komitet Naukowy / Scientific Committee

Khosrow Adeli (Canada)  
Vivian Barak (Israel)  
Andrzej Brzeziński (Poland)  
Aldona Dembińska-Kieć (Poland)  
Michael Duffy (Ireland)  
Wanda Dobryszczycka (Poland)  
Marek Dominiczak (UK)  
Katarzyna Fischer (Poland)  
Waleria Hryniewicz (Poland)  
Jerzy Jakubowicz (Poland)  
Maria Jastrzębska (Poland)  
Bogdan Kałużewski (Poland)  
Zygmunt Kopczyński (Poland)

Raphael Molina (Spain)  
Jerzy Naskalski (Poland)  
Gerard Nowacki (Poland)  
Gerhard Oremek (Germany)  
Grażyna Odrowąż-Sypniewska (Poland)  
Marek Paradowski (Poland)  
Dariusz Sitkiewicz (Poland)  
Bogdan Solnica (Poland)  
Janusz Solski (Poland)  
Andrzej Szutowicz (Poland)  
Elizabeta Topic (Croatia)  
Ondřej Topolčan (Czech Republic)  
Cezary Watała (Poland)  
Mieczysław Woźniak (Poland)

# diagnostyka laboratoryjna

Journal of Laboratory Diagnostics

ukazuje się od 1965 r. | established in 1965

czasopismo | journal of the



POLSKIEGO TOWARZYSTWA  
DIAGNOSTYKI LABORATORYJNEJ

POLISH SOCIETY  
OF LABORATORY DIAGNOSTICS



KOLEGIUM MEDYCyny  
LABORATORYJNEJ

POLISH COLLEGE  
OF LABORATORY MEDICINE

[www.diagnostykaboratoryjna.eu](http://www.diagnostykaboratoryjna.eu)

## Adres Redakcji / Editorial Office

Redakcja Diagnostyki Laboratoryjnej  
Zakład Analityki i Biochemii Klinicznej  
Centrum Onkologii Oddział w Krakowie  
31-115 Kraków, ul. Garncarska 11, Poland

Tel. : +48 12 6348484

e-mail: [z5dl.red@cyfronet.pl](mailto:z5dl.red@cyfronet.pl)

## Wydawca, Kolportaż / Publisher, Subscription

Fundacja Rozwoju Diagnostyki Laboratoryjnej  
31-231 Kraków, ul. Bociana 22  
Tel. / fax +48 126145238  
e-mail: [info@diaglab.pl](mailto:info@diaglab.pl)

ISSN 0867-4043

nakład: 4000 egzemplarzy

**diagnostyka laboratoryjna** Journal of Laboratory Diagnostics

jest indeksowana w / is indexed in:

AGRO, Polska Bibliografia Lekarska, Index Copernicus, MNiSW

Index Copernicus Value (2015) – 59,29; Index Copernicus znormalizowany (2015) – 6,15

MNiSzW (2015) – 10

Za prenumeratę czasopisma Diagnostyka Laboratoryjna przysługują 3 pkt. edukacyjne\*

---

**Opracowanie graficzne / projekt okładki:** Urszula Rychlik

**Skład i makietowanie:** Paweł Kremer

**Druk:** Drukarnia EKODRUK s.c., ul. Wielicka 250; 30-663 Kraków

tel: +48 122673660, tel./fax: +48 122961909, e-mail: [biuro@ekodruk.eu](mailto:biuro@ekodruk.eu)

## Warunki prenumeraty:

1. Pojedynczy egzemplarz kwartalnika kosztuje 25,00 zł dla osób indywidualnych lub 40,00 zł dla instytucji
2. Koszt całorocznej prenumeraty wynosi dla osób indywidualnych 100,00 zł lub 160,00 zł dla instytucji (przy kontynuacji prenumeraty przez instytucje koszt prenumeraty wynosi 144,00 zł)
3. W cenie zawarte są koszty wysyłki oraz podatek od towarów i usług
4. Zamówienia można składać drogą elektroniczną: [info@diaglab.pl](mailto:info@diaglab.pl)
5. Płatność na konto z zaznaczeniem rocznika, którego wpłata dotyczy:

Fundacja Rozwoju Diagnostyki Laboratoryjnej  
31-231 Kraków, ul. Bociana 22  
Bank PEKAO S.A. O/Kraków, Rynek Główny 47  
77 1240 4650 1111 0000 5154 8944

Nieautoryzowane rozpowszechnianie całości lub fragmentu niniejszej publikacji w jakiegokolwiek postaci bez zgody Redakcji jest zabronione.

Wydawca i Redakcja nie ponoszą odpowiedzialności za treść reklam i ogłoszeń.

\* na podstawie Uchwały Nr 16/IV/2015 Krajowej Rady Diagnostów Laboratoryjnych z dnia 17 kwietnia 2015 roku.

# XIX Zjazd

POLSKIEGO TOWARZYSTWA  
DIAGNOSTYKI LABORATORYJNEJ

Streszczenia



**Redakcja suplementu**

Jan Kanty KULPA

Urszula RYCHLIK

Bogdan SOLNICA

## Spis treści

7	Wykłady i prezentacje ustne
49	Prezentacje plakatowe
89	Skorowidz autorów

## Słowo wstępne

**Szanowni Państwo,**

*W imieniu Komitetu Naukowego i Organizacyjnego mam zaszczyt zaprosić Państwa na XIX Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej, który odbędzie się w dniach 3 – 6 września 2017 r. w Krakowie. Cykliczne zjazdy PTDL są nie tylko największym i najważniejszym spotkaniem Członków naszego stowarzyszenia, ale stanowią również wydarzenie o istotnym znaczeniu dla całego środowiska medycyny laboratoryjnej w Polsce. Żywimy głębokie przekonanie, że różnorodne pod względem treści jak i formy przekazu programy naukowe kolejnych zjazdów są źródłem ważnych informacji na temat postępu jaki z roku na rok dokonuje się w diagnostyce laboratoryjnej, a spotkania face to face uczestników, autorów doniesień, wykładowców i reprezentantów rynku IVD stanowią, ciągle odmienną od tego, co w tej materii może oferować Internet, doskonałą platformę prezentacji nowych dokonań, dyskusji i inspiracji.*

*Podobnie jak poprzednie, tegoroczny XIX Zjazd PTDL nie ma żadnej osi tematycznej, cechą jego programu naukowego jest różnorodność w jakiejś mierze odzwierciedlająca wyjątkową złożoność problemów diagnostyki laboratoryjnej. W 15 sesjach tematycznych staraliśmy się przedstawić dynamicznie rozwijające się obszary diagnostyki laboratoryjnej (genetyka molekularna, nowe technologie pomiarowe, medycyna personalizowana i in.) oraz ważne również z punktu widzenia codziennej praktyki laboratoryjne aspekty hematologii, endokrynologii, onkologii, kardiologii, neurologii i in. Niektóre sesje zostały przygotowane we współpracy z lekarskimi towarzystwami naukowymi.*

*Mamy nadzieję, że program Zjazdu będzie dla Państwa interesujący, a zamieszczone w niniejszym suplemencie „Diagnostyki Laboratoryjnej” streszczenia wykładów przygotowanych przez wybitnych naukowców i znanych ekspertów oraz doniesień plakatowych autorstwa Koleżanek i Kolegów z różnych ośrodków będą przyciągającą uwagę, ciekawą lekturą.*

*Z wyrazami szacunku*

*Bogdan Solnica  
Przewodniczący Komitetu Naukowego  
XIX Zjazdu PTDL*



## Wykłady i prezentacje ustne

**Wykład inauguracyjny****Czy jesteśmy przygotowani na upowszechnienie nowoczesnych testów genetycznych?***Michał Witt*

Instytut Genetyki Człowieka PAN, Poznań

Niezwykle szybki rozwój nowoczesnych technik analizy genomu człowieka, zarówno w sferze badań naukowych jak i zastosowań diagnostycznych, pociąga za sobą wiele różnorodnych problemów, których rozwiązanie pozostaje daleko w tyle za naszymi obecnymi możliwościami technologicznymi. Problemy te pojawiają się w sferze etycznej, społecznej, prawnej czy religijnej

i obejmują takie szczegółowe kwestie jak np. badanie dzieci pod kątem chorób ujawniających się w wieku dorosłym, wyniki przypadkowe (drugorzędowe) będące efektem ubocznym analizy całego genomu, rosnąca oferta testów skierowanych wprost do odbiorcy, patentowanie informacji genetycznej, poufność danych genetycznych i ich dostępność dla osób trzecich, dostępność poradnictwa genetycznego, itd.

Regulacja prawna tych problemów, których lista wydłuża się w zaskakującym tempie, chwilowo ciągle pozostaje w sferze deklaracji i jej przemieszczenie się do sfery faktów wydaje się coraz bardziej odsuwać się w czasie. Czy pacjenci, diagnosty laboratoryjni, lekarze muszą być ciągle zakładnikami niemocy legislacyjnej?

**Wykłady plenarne****Aminokwasy rozgałęzione jako biomarkery w zdrowiu i w chorobie***Krystyna Sztefko*

Instytut Pediatrii, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

Metabolomika dostarcza coraz więcej danych o potencjalnych biomarkerach, wśród których informacje na temat przydatności oznaczania profilu aminokwasowego zaczynają odgrywać istotną rolę w wielu obszarach medycyny. Coraz większe znaczenie przypisuje się takim cząsteczkom jak aminokwasy rozgałęzione (BCA), które łączy się z otyłością trzewną, opornością insulinową, cukrzycą jak również z rozwojem chorób serca, chorobami nowotworowymi czy mózgu. Istnieje dodatni związek pomiędzy dietą bogatą w BCA a zdrowiem metabolicznym włączając w to regulację masy ciała, syntezę białek mięśniowych i homeostazę glukozy. U człowieka BCA (leucyna, izoleucyna i walina) są aminokwasami niezbędnymi. Stężenie BCA we krwi jest precyzyjnie regulowane przez układy enzymatyczne. BCA są niezbędne nie tylko do syntezy białek ale wykazują różnorodne funkcje w organizmie. Chociaż pula wolnych BCA jest bardzo mała, działają one jako istotne cząsteczki sygnałowe i regulatory metaboliczne. W cytozolu BCA działają prawdopodobnie jako cząsteczki sygnałowe a w mitochondrium ostatecznie są one metabolizowane dla potrzeb energetycznych. Odmienność BCA w stosunku do innych aminokwasów odzwierciedla się nie tylko w tym że pierwszy krok katabolizmu nie odbywa się w wątrobie ale w tym że pierwszy etap katabolizmu odbywa się w mięśniach szkieletowych. Metabolizm BCA jest relatywnie dobrze poznany a ich bardzo ważna rola w metabolizmie azotu wynika głównie z odmienności szlaków w których biorą udział w zależności od komórki i tkanki. Na przykład wątroba nie posiada żadnej formy transaminazy BCA, forma cytozolowa tego enzymu

znajduje się głównie w mózgu, jądrach i jajnikach a forma mitochondrialna transaminazy BCA znajduje się w całym organizmie. Zaburzenia metabolizmu BCA (choroba syroku klonowego (MSUD), kwasica izowalerianowa, kwasica metylomalonowa, kwasica propionowa czy niedobór karboksylazy 3-metylokrotonylowej) są dobrze znane pediatrom. Z kolei wzrost stężenia BCA i aminokwasów aromatycznych we krwi uznaje się za marker oporności insulinowej związanej z otyłością. Poziom BCA jest także predyktorem rozwoju cukrzycy typu II u zdrowych osób.

Obecne metody do oznaczania profilu aminokwasowego takie jak HPLCm czy HPLC/MS ze względu na czasochłonność i koszt nie nadają się do rutynowych oznaczeń, ale powoli pojawiają się możliwości oznaczeń BCA przy użyciu elektroforezy kapilarnej czy też uproszczonej i zautomatyzowanej techniki HPLC/MS. Możliwości rutynowego oznaczania BCA to kwestia niedalekiej przyszłości. W tym momencie już wiadomo, że dla stabilnego pomiaru BCA krytyczne są warunki przedanalizacyjne: hemoliza, temperatura natychmiast po pobraniu krwi, czas od pobrania do wychłodzenia próbki i odpowiednia temperatura przy długotrwałym przechowywaniu próbek. Tak więc zmiany, które dokonują się w laboratoriach to z jednej strony przenoszenie wielu analiz bliżej pacjenta ale z drugiej – przed laboratoriami otwierają się coraz co większe możliwości.

**Patofizjologia i potencjalne metody zapobiegania alloimmunologicznej małopłytkowości płodów i noworodków***Anne Husebekk*

Institute of Medical Biology, University of Tromsø The Arctic University of Norway, Tromsø

(streszczenia nie nadesłano)

## Układ odpornościowy w zdrowiu i chorobie a mikrobiota jelitowa

Bogdan Mazur

Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii Śląskiego Uniwersytetu Medycznego, Katowice

W przewodzie pokarmowym człowieka bytuje ogromna ilość organizmów tworzących tzw. mikroflorę jelitową. Bakterie, eukariota oraz wirusy zasiedlające organizm człowieka określa się jako mikrobiota, natomiast geny które są przez nie kodowane jako mikrobiom. Rozwój mikrobiota w organizmie rozpoczyna się w chwili narodzin, gdy dochodzi do kolonizacji błon śluzowych oraz skóry. Przebywając w łonie matki, dziecko pozostaje wolne od bakterii. Kolonizacja przewodu pokarmowego rozpoczyna się w momencie przyjścia na świat, a na rozwój mikroflory jelitowej wpływają różnorodne czynniki takie, jak: wiek ciążowy noworodka w chwili przyjścia na świat, rodzaj porodu oraz sposób karmienia w pierwszym okresie życia. Podczas porodu siłami natury układ pokarmowy noworodka jest kolonizowany w ciągu kilkunastu minut przez dobroczynne bakterie pochodzące z dróg rodnych mamy głównie *Lactobacillus* oraz *Prevotella*. Odgrywają one znaczącą rolę w pierwszych dniach życia noworodka ułatwiając trawienie pierwszych posiłków oraz wpływają na jego układ odpornościowy. Z kolei poród przez cięcie cesarskie prowadzi do dominacji *Staphylococcus* oraz *Propionibacterium*. Trzeba pamiętać, że nieprawidłowy skład mikroflory jelitowej, to nie tylko kwestia porodu przez cięcie cesarskie. Przyczynia się do tego również nieodpowiednia dieta czy nieracjonalne stosowanie antybiotyków. Podczas wprowadzania pokarmów stałych flora bakteryjna niemowlęcia powoli upodabnia się do flory jelitowej osoby dorosłej, a cały proces kończy się około 7 roku życia. W tym czasie zacierają się również różnice między składem mikroflory dzieci urodzonych siłami natury i drogą cięcia cesarskiego. Stabilny w czasie życia osobniczego profil flory jelitowej ulega zmianie, gdy dochodzi do starzenia się organizmu. U osób starszych zauważa się zmniejszenie liczby beztlenowych bakterii z rodziny *Bacteroides* oraz *Bifidobacteria*. Przyпуска się, że zmiana kompozycji flory jelitowej może być jednym z czynników wywołujących zaburzenia

w funkcjonowaniu układu immunologicznego u osób starszych. Funkcje, które pełnią mikroorganizmy zasiedlające jelita człowieka, można zaliczyć do jednej z trzech grup: troficznnej, metabolicznej oraz immunologicznej. Grupy te nie stanowią odrębnych elementów, lecz bardzo często wzajemnie się uzupełniają. Funkcja metaboliczna polega na rozkładzie resztek pokarmowych na drodze fermentacji oraz wytwarzaniu niezbędnych witamin z grupy B oraz witaminy K. Funkcja troficzna częściowo uzupełnia funkcje metaboliczną, ale jej zasadniczym celem jest ochrona nabłonka jelitowego i zapewnienie jego ciągłości. Głównym rolą układu immunologicznego jest szybka eliminacja drobnoustrojów i antygenów wnikaających do organizmu. Układ immunologiczny jelita GALT (gut associated lymphoid tissue) wytworzył wiele mechanizmów, tylko częściowo poznanych, które uczestniczą w reaktywności w stosunku do jelitowych komensali oraz antygenów pochodzących z pożywienia. Bakterie komensalne korzystnie wpływają na odpowiedź komórkową i humoralną. Sprawna eliminacja patogenów odbywa się dzięki stymulacji syntezy przeciwciał IgA i IgG, aktywacji limfocytów czy szybkiemu procesowi fagocytozy. Obejmuje również wpływ na profil produkcji cytokin wydzielanych przez aktywowane limfocyty T. Mnogość funkcji pełnionych przez mikrobiota czyni ten złożony ekosystem jednym z najważniejszych w ludzkim organizmie. Zgromadzone w jelitach komórki układu odpornościowego wraz immunoglobulinami, na czele z IgA wydzielniczym stanowią najliczniejszy składnik układu odpornościowego w całym organizmie, przewyższający nawet skład komórkowy całej krwi obwodowej wraz ze szpikiem kostnym.

Mikroflora jelitowa człowieka to więc ogromny ekosystem. Waży około 2kg i składa się ze 100 bilionów bakterii. Obecnie pewne jest, że mieszkańcy przewodu pokarmowego kładą fundamenty pod obecne i przyszłe funkcjonowanie całego organizmu. Ryzyko rozwoju alergii, astmy oskrzelowej czy otyłości zależy w istotny sposób zarówno od składu, jak i sposobu kształtowania się flory jelitowej. Zmiany w składzie bakteryjnej flory jelitowej można zaobserwować również u osób cierpiących na niedobory pokarmowe, choroby nerwowe, depresję czy przewlekłe dolegliwości jelitowe.



## Wykłady

### SESJA 1

#### Dyslipidemia a ryzyko chorób sercowo-naczyniowych – nowe biomarkery, nowe rekomendacje

##### 1-W-1

##### **Wpływ aterogennych markerów lipidowych na przedział referencyjny stężenia troponiny I oznaczanej metodą o wysokiej czułości w populacji potencjalnie zdrowych dorosłych**

*Marek Koziński*

Zakład Podstaw Medycyny Klinicznej, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Wstęp. Według Trzeciej Uniwersalnej Definicji Zawału Serca warunkiem niezbędnym do jego przyżyciowego rozpoznania jest stwierdzenie wzrostu i/lub spadku stężenia biomarkera martwicy kardiomiocytów, preferencyjnie sercowej troponiny, z przynajmniej jedną wartością przekraczającą wartość 99-tego percentyla górnego zakresu referencyjnego (URL). Wprowadzenie do praktyki klinicznej wysokoczulych testów spowodowało obniżenie granic wykrywalności dla stężeń troponiny, dzięki czemu możliwa jest wczesna stratyfikacja ryzyka pacjentów z podejrzeniem zawału serca, a także wykrywanie mierzalnych stężeń tego markera u osób zdrowych. 99-ty percentyl powinien być wyznaczony w zdrowej populacji referencyjnej z zachowaniem optymalnej precyzji pomiaru, określonej współczynnikiem zmienności <10%. Mimo istniejących rekomendacji, selekcja zdrowej populacji referencyjnej pozostaje kontrowersyjna i ma kluczowy wpływ na wartość 99-tego percentyla URL.

Cele. Ocena zależności między stężeniami markerów lipidowych i białka C-reaktywnego oznaczanego metodą o wysokiej czułości (hs-CRP) a stężeniem sercowej troponiny I oznaczonej testem o wysokiej czułości (hs-cTnI) w populacji referencyjnej, ii) ocena wpływu markerów lipidowych i hs-CRP na wartość 99-tego percentyla URL dla hs-cTnI.

Materiał i Metody. 531 zidentyfikowanych na podstawie kwestionariusza przypuszczalnie zdrowych osób włączono do jednoosobowego badania przekrojowego. Dalszą selekcję w kierunku zdefiniowania zdrowej populacji referencyjnej (n = 408) przeprowadzono przy użyciu kryteriów opartych na biochemicznych markerach laboratoryjnych: stężenie peptydu natriuretycznego typu B <35 pg/mL dla obu płci, stężenie hemoglobiny glikowanej <48mmol/L (<6,5%) oraz szacowany współczynnik przesączania kłębuszkowego >60 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>. Ocenie poddano profil lipidowy, współczynnik cholesterol całkowity:cholesterol HDL, stężenia cholesterolu nie-HDL, apolipoprotein (apoAI) i B (apoB), małych, gęstych cząstek cholesterolu LDL, lipoproteiny (a) – Lp(a), hs-CRP i współczynnik apoB:apoAI.

Wyniki. Osoby z wykrywalnymi stężeniami hs-cTnI charakteryzowały się znamienne częściej podwyższonymi wartościami cholesterolu LDL (60% vs. 46%; p=0,002), apoB (73% vs. 61%; p=0,008), współczynnika apoB:apoAI (53% vs. 40%; p=0,005) i Lp(a) (15% vs. 7%; p=0,015). Współczynnik apoB:apoAI i w mniejszym stopniu inne markery lipidowe, w przeciwieństwie do stężenia hs-CRP, dodatkowo korelowały ze stężeniem hs-cTnI w analizach jedno- i wieloczynnikowych. Wykluczenie pacjentów z podwyższonymi wartościami współczynnika apoB:apoAI i apoB, w odróżnieniu od hs-CRP, prowadziło do zmniejszenia wartości 99-tego percentyla URL dla hs-cTnI w zdrowej populacji referencyjnej odpowiednio o 12,9% (6,2 vs. 5,4 ng/L) i 14,5% (6,2 vs. 5,3 ng/L). Analogiczne redukcje w grupie przypuszczalnie zdrowych osób wynosiły dla obu markerów lipidowych 24,0% (7,5 vs. 5,7 ng/L).

Wnioski. Niniejsze badanie wskazuje, że aterogenne markery lipidowe, w szczególności wartości wskaźnika apoB:apoAI i apoB, mają istotny wpływ na wartość 99-tego percentyla URL dla hs-cTnI. Po przeprowadzeniu kolejnych badań należy rozważyć wprowadzenie kryteriów związanych z markerami lipidowymi przy selekcji zdrowej populacji referencyjnej.

##### 1-W-2

##### **Przeciwzapalne działanie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (n-3 PUFA) w otyłości**

*Małgorzata Malczewska-Malec*

Katedra Biochemii Klinicznej, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

Otyłość jest często związana z przerostem i ekspansją brzusznej tkanki tłuszczowej, oraz z rozwojem przewlekłego stanu zapalnego. Tkanka tłuszczowa ulega nacieczeniu przez pro-zapalne makrofagi typu M1 oraz komórki układu immunologicznego, które łącznie z adipocytami wydzielają szereg adipokiny i cytokiny o działaniu pro-zapalnym. Konsekwencją tych zmian jest rozwój powikłań metabolicznych, insulinooporności, cukrzycy typu 2 i miażdżycy. Pochodzące z diety kwasy tłuszczowe w różnorodny sposób mogą wpływać na te procesy. W badaniach doświadczalnych wykazano, że większość nasyconych kwasów tłuszczowych nasila stan zapalny, natomiast kwasy eikozapentaenowy (EPA) i dokozaheksaenowy (DHA), należące do n-3 PUFA hamują go. Są one źródłem lipidowych mediatorów o silnym działaniu przeciwzapalnym, takich jak: rezolwiny, marezyny, lipoksyny i neuroprotektyny. Związki te, działając poprzez odpowiednie czynniki transkrypcyjne, takie jak nF-κB, PPAR regulują aktywność wielu genów. Ponadto, kwasy n-3 PUFA kontrolują metabolizm glukozy

i lipidów, procesy  $\beta$ -oksydacji, a także modyfikują skład kwasów tłuszczowych w błonie komórkowej. Wyniki badań klinicznych dotyczących zdrowotnych korzyści suplementacji n-3 PUFA u ludzi są kontrowersyjne. W badaniu „Bioclaims” uczestniczyło 100 otyłych i 50 nieotyłych pacjentów w wieku 25-65 lat. Celem badania była ocena wpływu – 3 miesięcznej diety redukcyjnej (1200-1500 kcal/dzień) i suplementacji kwasami n-3 PUFA w dawce 1,8 g/dzień na laboratoryjne i molekularne parametry stanu zapalnego i insulinooporności, które były oceniane na czczo i w okresie poposiłkowym. Zaobserwowano, że restrykcja kaloryczna i dieta bogata w n-3 PUFA zamiennie obniżyły wartość wskaźnika HOMA, wyrzut insuliny i GIP w trakcie OGTT. Istotnemu obniżeniu uległy wybrane parametry stanu zapalnego (sE-selektyna, hsCRP, IL-6, MCP1, sVCAM), a zwiększeniu stężenie przeciwzapalnych mediatorów pochodzących z DHA. Równocześnie wykazano, że suplementacja n-3 PUFA wpłynęła na ekspresję wybranych genów związanych ze stanem zapalnym.

Wyniki naszych badań wskazują, że zwiększone spożycie kwasów n-3 PUFA może istotnie obniżyć ryzyko powikłań metabolicznych u otyłych pacjentów.

### 1-W-3 Poposiłkowe oznaczanie profilu lipidowego u dorosłych i u dzieci

Łukasz Szternel

Katedra i Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Wczesne rozpoznanie zaburzeń metabolizmu lipidowego jest nieodzownym elementem prewencji pierwotnej chorób sercowo-naczyniowych. Zgodnie z aktualnymi wytycznymi ESC/EAS ocenę gospodarki lipidowej u osób dorosłych należy rozważyć w u mężczyzn  $\geq 40$  r.ż oraz u kobiet  $\geq 50$  r.ż, jak również zaleca się przeprowadzanie przesiewowych badań lipidowych u dzieci w wieku od 9 do 11 lat. Złotym standardem diagnostyki laboratoryjnej dotyczącej przygotowania pacjentów do badań profilu lipidowego jest prowadzenie analiz u osób będących na czczo w okresie od minimum 8-10 godzin przed pobraniem krwi, jednakże zalecenia EAS/EFLM z 2016 roku wskazują alternatywną możliwość oznaczania lipidów u osób niebędących na czczo. Badania ostatnich lat wskazują na istnienie jedynie nieznacznych różnic stężeń TC, HDL-C oraz LDL-C u pacjentów będących na czczo w porównaniu do tych będących po posiłku. Na podstawie czterech badań populacyjnych tj. Copenhagen General Population Study (Dania, Langsted et al. 2008, Langsted, Nordestgaard 2011), Women's Health Study (USA, Mora et al. 2008), National Health and Nutrition Examination Survey (USA, Steiner et al. 2011) oraz Calgary Laboratory Services (Kanada, Sidhu, Naugler, 2012) wykazano klinicznie nieistotny wzrost stężenia triglicerydów u pacjentów niebędących na czczo (średnio o 0.3 mmol/l (27mg/dl) oraz nieznaczne obniżenie stężenia cholesterolu całkowitego i frakcji LDL-C (spowodowane efektem hemodylucji); nie wykazano natomiast zmian w stężeniu cholesterolu HDL-C z wyjątkiem badania Langsted et al. (2008). Dotychczas prze-

prowadzone badania wskazują alternatywną drogę oznaczania profilu lipidowego u pacjentów niebędących w stanie na czczo, umożliwiając tym samym rezygnację z okresu karencji pokarmowej, uciążliwego w szczególności dla osób w podeszłym wieku, przewlekle chorych oraz dzieci.

### 1-U-1 Mieszanina subterapeutycznych stężeń inhibitorów MMP-2, MLCK i NOS chroni mięsień sercowy przed uszkodzeniem w wyniku niedokrwienia i reperfuzji

Iwona Bil-Lula, Anna Krzywonos-Zawadzka, Mieczysław Woźniak

Katedra Analityki Medycznej, Zakład Chemii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

Wstęp. Ostre niedokrwienie serca z następczą reperfuzją tętnic wieńcowych (I/R) może być przyczyną poważnego uszkodzenia mięśnia sercowego. W wyniku wzmożonej produkcji tlenu azotu (NO), dochodzi do wzmożonej, niefizjologicznej nitracji/nitrozylacji białek kurczliwych kardiomiocytów. Zarówno nitracja/nitrozylacja jak i fosforylacja łańcuchów lekkich miozyny 1 (MLC1) zwiększa podatność tych białek na ich proteolityczną degradację pod wpływem metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej 2 (MMP-2).

Celem badań była ochrona serca podczas niedokrwienia i reperfuzji poprzez podaż podprogowych stężeń trzech inhibitorów: doksycyliny (inhibitora MMP-2, Doxy), ML-7 (inhibitora kinazy łańcuchów lekkich miozyny) oraz 1400W (selektywnego inhibitora NOS). W badaniach wykorzystano model izolowanego serca szczurzego.

Materiał i metody. Serca wyekstrahowane ze szczurów rasy Wistar poddano perfuzji buforem Krebsa przy użyciu metody Langendorfa. Serca perfundowano 25 min. w warunkach tlenowych, następnie poddano je 20 min. globalnemu niedokrwieniu i 30 min. reperfuzji. Inhibitory enzymów podawano na 10 min. przed i 10 min. po niedokrwieniu. Podczas eksperymentu monitorowano parametry hemodynamiczne. W homogenatach serca oznaczono MMP-2 (metodą zymografii żelatynowej), TnI (metodą ELISA) oraz MLC1 (WB).

Wyniki. Podaż mieszaniny podprogowych stężeń trzech inhibitorów: Doxy (1  $\mu$ M), ML-7 (0,5  $\mu$ M) oraz 1400W (1  $\mu$ M) bezpośrednio do naczyń wieńcowych serca poddanego niedokrwieniu i reperfuzji prowadziło do przywrócenia prawidłowej funkcji mechanicznej serca (104,6 vs 45,4) oraz prawidłowego przepływu wieńcowego (3,2 vs 7,9) na skutek zwiększonej syntezy NO (1,01 vs 1,32). Synergistyczny lub addytywny efekt działania mieszaniny inhibitorów zmniejszyła uszkodzenie serca podczas I/R (24,1 vs 16,2), natomiast redukcja potranslacyjnych modyfikacji MLC1 obniżyła proteolityczną degradację białek kurczliwych podczas niedokrwienia i reperfuzji (1,44 vs 0,96).

Wnioski. Mieszanina niskich stężeń Doxy, ML-7 i 1400W chroni serce przed uszkodzeniem w wyniku I/R i może stanowić nową strategię farmakologicznej prewencji lub leczenia w praktyce klinicznej.

## Sesja 2

### Układ: nowotwór i organizm gospodarza – implikacje dla diagnostyki laboratoryjnej

#### 2-W-1

#### Nowotwór w podeszłym wieku – problemy diagnostyczne i terapeutyczne

Tomasz Grodzicki, Halina Gryglewska

Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

Starszy wiek należy do uznanych czynników ryzyka zwiększonej zapadalności na choroby nowotworowe. Dane Głównego Urzędu Statystycznego wskazują, że nowotwory złośliwe stanowią drugą przyczynę zgonów w Polsce, po chorobach układu krążenia. Od lat 90-tych ubiegłego wieku, mimo że obserwuje się trend spadkowy zgonów z przyczyn sercowo-naczyniowych, to częstość zgonów z powodu chorób nowotworowych stale wzrasta. Pojawił się w ostatnich latach trend poprawy rokowania, szczególnie wyraźny u osób młodszych, ale obserwowany także po 65 roku życia. Wiek w znacznym stopniu wpływa na obraz kliniczny choroby nowotworowej. U osób młodych nowotwór stanowi zazwyczaj pojedynczy poważny problem medyczny, dominuje obraz kliniczny choroby, obserwuje się stosunkowo dobrą tolerancję ostrych, poważnych objawów niepożądanych. Natomiast u osób starszych często występują różne choroby towarzyszące i zaburzenia stanu funkcjonalnego, objawom choroby nowotworowej towarzyszą objawy innych schorzeń, zespołów geriatrycznych, problemy społeczne, obserwuje się także zmienną tolerancję leczenia, co wymusza konieczność zmiany w podejściu terapeutycznym i jego indywidualizację. Jednocześnie postęp związany z wczesnym wykrywaniem chorób nowotworowych, skutecznością leczenia oraz terapią wspomagającą doprowadził do wzrostu liczby pacjentów wyleczonych lub żyjących przez wiele lat z chorobą nowotworową. Wśród nich znaczną grupę stanowią pacjenci po 65 roku życia. W przeciwieństwie do osób młodych, także populacja osób starszych z wyleczoną chorobą nowotworową jest bardzo zróżnicowana pod względem stanu zdrowia i chorób towarzyszących. W zakresie postępowania onkologicznego w wieku podeszłym można wyodrębnić następujące problemy: badania przesiewowe w kierunku wczesnego wykrycia nowotworu, wybór postępowania terapeutycznego, postępowanie w przypadku wyleczenia oraz zagadnienia związane z opieką paliatywną.

W przypadku wielu badań przesiewowych uważa się, że można zaprzestać ich wykonywania po osiągnięciu określonego wieku np. 70 lub 75 roku życia. Głównym przesłaniem do takiej rekomendacji jest oczekiwana dalsza długość życia. Tymczasem, w ostatnich latach obserwujemy podwojenie oczekiwanej długości życia dla osoby 75 letniej w Polsce w ciągu ostatnich 60 lat. Aktualnie oczekiwana długość życia dla 75 letniej kobiety w Polsce przekracza 12 lat zaś dla mężczyzny 10 lat, a liczba osób, które ukończyły 90 rok życia w ciągu najbliższych 10 lat ulegnie podwojeniu z ok 200 tys. w 2016 do prawie 400 tysięcy w 2026 roku. Z tego względu należy naszym zdaniem rozważyć możliwość wydłużenia okresu

badania przesiewowych wybranych nowotworów. W wytycznych niektórych towarzystw naukowych uwarunkowano decyzję o zaprzestaniu wykonywania badań przesiewowych od spodziewanej długości przeżycia, nie rekomendując wykonywania tych badań, gdy jest ona krótsza niż 10 lat.

Wśród czynników, które wpływają na rokowanie w chorobie nowotworowej u osób starszych, znajdują się schorzenia towarzyszące, stan funkcjonalny oraz obecność zespołów geriatrycznych w tym zespołu kruchości. Celem optymalizacji wyboru postępowania terapeutycznego w onkologii geriatrycznej rekomenduje się wykorzystanie całościowej oceny geriatrycznej (COG), obejmującej ocenę stanu funkcjonalnego, możliwości poznawczych oraz sytuacji społecznej. Liczne badania wskazują że przeprowadzenie COG pozwala na oszacowanie ryzyka działań niepożądanych terapii onkologicznej, a także korzyści wynikających z jej zastosowania. Jednocześnie wykorzystanie COG może ograniczyć nihilizm terapeutyczny wynikający z obawy przed objawami ubocznymi terapii onkologicznej, brakiem badań obejmujących populację 80 i 90-latków a także względami ekonomicznymi. Jak wskazują liczne wyniki badań obejmujące populację geriatryczną często decyzje terapeutyczne podejmowane są w oparciu o wiek metrykalny, nie uwzględniając stanu funkcjonalnego pacjentów. Wydłużenie długości życia dotyczy wszystkich okresów życia i dzisiejszy 80-latek w Polsce ma ogromną szansę przeżycia kolejnych 10 lat i w związku z tym oczekiwane efekty terapii powinny być oceniane z perspektywy wieku biologicznego, czy stanu funkcjonalnego ocenianego za pomocą COG.

Szczególną grupę pacjentów stanowią osoby, które z sukcesem leczono z powodu choroby nowotworowej we wcześniejszym okresie życia. Postęp onkologii sprawia, że liczba osób określanych mianem „cancer survivors” rośnie w bardzo szybkim tempie. W Stanach Zjednoczonych w roku 2014 spośród 14 milionów osób wyleczonych z choroby nowotworowej ponad 70% stanowiły osoby w wieku starszym. W ciągu najbliższych 10 lat spodziewany jest wzrost liczby osób wyleczonych o około 30%. U tych pacjentów obserwujemy późne objawy niepożądane związane ze stosowanym uprzednio leczeniem chirurgicznym, radioterapią lub chemioterapią. Równocześnie, osoby te są narażone na rozwój innego typu schorzeń nowotworowych. Z tego powodu niezbędne jest opracowanie standardów postępowania dla osób wyleczonych z choroby nowotworowej w wieku podeszłym.

#### 2-W-2

#### „Pandemie XXI wieku” – otyłość i nowotwory

Ewa Wójcik, Jan Kanty Kulpa, Urszula Rychlik

Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Krakowie

W ostatnich kilku dekadach obserwuje się niepokojący wzrost średniej masy ciała w populacji, narastające tendencje do otyłości,



powszechnie ocenianej na podstawie wartości współczynnika masy ciała (BMI; *body mass index*), prawidłowa masa ciała – wartości BMI <25, nadwaga – BMI w granicach 25–30, natomiast otyłość – BMI >30. Zjawisko wzrostu odsetków osobników z wartościami BMI >25 lub >30 dotyczy nie tylko krajów wysoko rozwiniętych, ale również krajów rozwijających się, wyraźniej zaznacza się w populacjach miejskich, ale jest także obserwowane w populacjach wiejskich. Ocenia się że wartości BMI wyższe od 25 ma blisko połowa dorosłych mężczyzn i ok. 32% kobiet. Wzrost odsetka osób otyłych staje się poważnym problemem współczesnej medycyny, publicznej opieki zdrowotnej, zaczyna przyjmować charakter epidemii.

Wiele badań potwierdza związki pomiędzy otyłością, a zwiększonym ryzykiem rozwoju szeregu chorób, a m.in. cukrzycy typu 2, chorób układu krążenia, udaru mózgu, wysokiego ciśnieniem, chorób stawów, nerek. W ostatnich latach badania epidemiologiczne potwierdzają istotne zależności pomiędzy otyłością i zwiększonym ryzykiem zachorowań na nowotwory złośliwe, m.in. raka jelita grubego, endometrium, piersi u kobiet po menopauzie, nerki, trzustki, przełyku, a także na ziarnicę i niektóre nowotwory hematologiczne. Przedmiotem licznych badań jest nie tylko ocena ryzyka zachorowań na nowotwory w populacji ludzi z nadwagą lub otyłością, ale również problemy związane z wpływem otyłości na rozwijającą u szeregu chorych oporność na leczenie, gorszym rokowaniem, ryzykiem rozwoju przerzutów, krótszym czasem przeżycia wolnego od choroby jak i całkowitego, zwiększoną śmiertelnością. Jednak wyniki tych badań nie są jednoznaczne. W odniesieniu do niektórych nowotworów wręcz przeciwnie otyłość okazuje się być czynnikiem korzystnym, łączy się z mniejszą zachorowalnością, ograniczeniem toksyczności stosowanej chemio- i radioterapii, lepszym rokowaniem chorych.

Tkanka tłuszczowa w zdrowym organizmie działa jako rodzaj „magazynu”, w którym w adipocytach w formie lipidów gromadzone są składniki odżywcze (substraty energetyczne i strukturalne) niezbędnych dla prawidłowego funkcjonowania innych tkanek i narządów. Jednak jej funkcja nie ogranicza się jedynie do magazynowania, ale tkankę tłuszczową cechuje duża aktywność metaboliczna. Wytwarzanych i wydzielanych jest w niej szereg hormonów polipeptydowych, adipokin, czynników wzrostu, w tym szereg cytokin prozapalnych.

Rozwojowi tkanki tłuszczowej – otyłości – towarzyszy nasilająca się hipoksja, miejscowy i ulegający stopniowo uogólnieniu stan zapalny, insulino oporność, wzrost stężenia insulino-podobnego czynnika wzrostu 1, a także szeregu cytokin prozapalnych oraz odgrywającego kluczową rolę w ich aktywacji czynnika jądrowego kB, zaburzenia poziomu adipokin. Biorąc pod uwagę aktywność endokrynną tkanki tłuszczowej i zmiany poziomu szeregu hormonów do jakich dochodzi w następstwie otyłości powstają warunki korzystne dla nasilenie proliferacji komórek i angiogenezy. Wzajemne oddziaływania zmienionych adipocytów z obecnymi w ich sąsiedztwie komórkami nowotworowymi mogą sprzyjać powstawaniu mikrośrodowiska promującego rozwój nowotworu, jego progresję i tworzenie przerzutów.

## 2-W-3

### Diagnostyka różnicowa złośliwych i niezłośliwych zmian w jajnikach – nie tylko CA 125 i HE4, ale również wybrane wykładniki gospodarki lipidowej

Maria Kowalska

Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Warszawa

Metabolizm lipidów to jeden z istotnych szlaków przemian biochemicznych niezbędnych dla przeżycia komórek nowotworowych. Powstałe metabolity aktywnie uczestniczą w takich procesach jak: wzrost, proliferacja, różnicowanie czy apoptoza komórek nowotworowych. Lipidy łączone są z mechanizmem oporności na leki. Zmieniony metabolizm lipidów komórek nowotworowych prowadzi do zaburzeń składu błon komórkowych, wzrostu ich przepuszczalności i progresji choroby. Ponadto wykazano, że lipidy są także aktywne w przekazywaniu sygnałów między komórkami. Wzmoczonej proliferacji komórek nowotworowych towarzyszy nie tylko intensywny wychwytywanie egzogennych lipidów ale także wzrost ich syntezy. Nadmiar lipidów, komórki przechowują w postaci kropeł tłuszczu, zawartość tych kropeł jest niejednorodna i zależy od rodzaju komórki nowotworowej i mikrośrodowiska. Obecnie uważa się, że ilość tych kropeł koreluje z agresywnością komórek nowotworowych.

Powyższe dane zapoczątkowały prace dotyczące klinicznej oceny użyteczności parametrów gospodarki lipidowej u chorych na nowotwory złośliwe. Wyniki badań wskazują, że profil lipidowy u osób zagrożonych chorobą nowotworową jest inny od profilu związanego z ryzykiem chorób kardiologicznych.

Rak jajnika, to nowotwór złośliwy, którego niecharakterystyczne objawy są przyczyną późnego rozpoznania choroby. Leczenie w ośrodkach onkologicznych znacznie zwiększa szansę chorych na dłuższe przeżycie, dlatego w tej lokalizacji raka tak istotne jest określenie prawdopodobieństwa złośliwego charakteru zmiany już przed operacją, celem podjęcia leczenia w specjalistycznym ośrodku. Od wielu lat poszukuje się nowych markerów, zwiększających skuteczność diagnostyki różnicowej. Najczęściej tworzone są algorytmy opierają się o metody obrazowe i różnorodne parametry laboratoryjne. Pomimo funkcjonowania algorytmu ROMA, opartego o dwa markery, CA 125 i HE4 oraz znajomości stanu hormonalnego, kontynuowane są badania poszukiwania nowych biomarkerów, pomocnych nie tylko w diagnostyce różnicowej ale także w oszacowaniu przebiegu choroby. Występowanie różnorodnych czynników modyfikujących stężenia parametrów lipidowych może być przyczyną niejednoznacznych laboratoryjnych wyników badań. Prezentowane są dane wskazujące na różnice w wybranych wykładnikach gospodarki lipidowej pomiędzy chorymi na raka zlokalizowanego w narządzie rodny a grupą chorych ze zmianami łagodnymi. U chorych na raka jajnika wykazano znamienne niższe stężenia w surowicy krwi: cholesterolu HDL, LDL i cholesterolu całkowitego. Jednak nie wszyscy autorzy potwierdzają powyższe wyniki badań. W badaniach dotyczących wartości prognostycznej parametrów lipidowych, wykazano istotną zależność pomiędzy stężeniami LDL a czasem wolnym

od choroby jak i czasem całkowitego przeżycia chorych. Stosując chromatografię cieczową połączoną ze spektrometrią masową poszukuje się różnic w profilu lipidów pomiędzy chorymi na raka jajnika a zmianami łagodnymi. Wśród lipidów poszukiwane są także biomarkery, które byłyby pomocne we wskazaniu grupy chorych na raka jajnika zagrożonych wczesnym nawrotem choroby. Reasumując, w chwili obecnej wiadomo, że lipidy i ich różnorodne połączenia są niezbędne dla namnożenia, przeżycia i przemieszczenia się komórki nowotworowej do innych narządów. Dotychczas prowadzone badania dostarczają już wstępnych informacji. Wskazanie biomarkera lub kilku biomarkerów związanych z przemianami lipidów wymaga zaplanowanych, wieloetapowych badań, które powinny być podjęte nie tylko ze względu na poprawę diagnostyki ale także na wskazanie nowego celu dla leków nowej generacji.

## 2-W-4 Wykładniki stanu zapalnego w diagnostyce raka przełyku – znaczenie predykcyjne i prognostyczne

Barbara Mroczko

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Rak przełyku należy do nowotworów złośliwych przewodu pokarmowego. Charakteryzuje się szybkim przebiegiem, niepomyślnym rokowaniem i krótkim czasem przeżycia chorych. Nowotwór ten stanowi szóstą co do częstości przyczynę zgonów z powodu nowotworów złośliwych na świecie. Głównymi typami histologicznymi złośliwych nowotworów przełyku jest płaskonabłonkowy rak przełyku oraz gruczolakorak przełyku. Współczesna diagnostyka chorych na nowotwory przełyku opiera się na histopatologicznej ocenie wycinka pobranego ze zmiany oraz badaniach endoskopowych. Klasyczne markery nowotworowe raka przełyku, tj.: antygen karcyno-embryonalny (CEA), antygen raka płaskonabłonkowego (SCC-Ag) ze względu na niską czułość i swoistość diagnostyczną są mało przydatne w procesie diagnostycznym.

Wieloletnie badania naukowe pozwoliły poznać podstawy biologii nowotworów i potwierdziły istotną rolę zapalenia w patogenezie guzów złośliwych. Jednak znaczenie mediatorów reakcji zapalnej jako potencjalnych markerów raka przełyku w dalszym ciągu nie jest poznane. W związku z tym trwają badania nad zastosowaniem wybranych mediatorów reakcji zapalnej jako nowych markerów nowotworów przełyku, które umożliwiłyby wcześniejsze wykrycie, dokładniejszą ocenę stopnia zaawansowania klinicznego, a zwłaszcza określenie rokowania przeżycia pacjentów z tym nowotworem.

W naszych dotychczasowych badaniach oznaczyliśmy stężenia wybranych białek specyficznych, tj. metaloproteinaz i ich inhibitorów, chemokin i ich specyficznych receptorów, hematopoetycznych czynników wzrostu, interleukiny-6 (IL-6) oraz białka C-reaktywnego (CRP) w surowicy chorych na raka przełyku w zależności od typu histologicznego. Wykazaliśmy, że czułość diagnostyczna oznaczeń stężeń ww. białek specyficznych była wyższa w porównaniu do klasycznych markerów nowotworowych raka przełyku. Ponadto CRP oraz IL-6 okazały się dobrymi wskaźnikami stopnia

zaawansowania raka przełyku, obecności przerzutów w węzłach chłonnych i przerzutów odległych, stając się istotnymi parametrami oceny progresji nowotworu.

Uzyskane wyniki wskazują na potencjalną przydatność badanych białek specyficznych w diagnostyce pacjentów z rakiem przełyku.

## 2-W-5 Odpowiedź układu immunologicznego na zakażenie wirusami brodawczaka ludzkiego – wpływ na kancerogenezę i wyniki leczenia przeciwnowotworowego

Beata Biesaga

Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Krakowie

Infekcja wirusami brodawczaka ludzkiego (HPV) jest najczęstszym zakażeniem przenoszonym drogą płciową, występującym u około 75% osób aktywnych seksualnie. Większość tych infekcji przebiega bez objawów klinicznych i ma charakter przemijający. HPV, na skutek wyciszenia odpowiedzi immunologicznej gospodarza, ma jednak zdolność do rozwoju infekcji przetrwałej. Sugeruje się, że ucieczka wirusów spod nadzoru układu odpornościowego jest związana z zaburzeniami różnicowania makrofagów i komórek dendrytycznych, sygnalizacji immunologicznej (blokowanie produkcji niektórych cytokin i interferonu) oraz odchyleniami od równowagi pomiędzy limfocytami pomocniczymi i regulatorowymi. W wyniku tych procesów HPV może pozostawać w zakażonych komórkach warstwy podstawnej nabłonka nawet przez kilkanaście lat i integrować z genomem zakażonych komórek. Produkowane są wówczas wirusowe białka E6 i E7, które pobudzają zakażone komórki do niekontrolowanej proliferacji, co sprzyja nagromadzeniu mutacji, aneuploidii i wykształceniu fenotypu nowotworowego. Wyniki badań klinicznych wskazują, że chorzy na raki płaskonabłonkowe (SCC) terenu głowy i szyi z infekcją HPV charakteryzują się lepszym rokowaniem niż chorzy bez infekcji. Sugeruje się, że jedną z przyczyn tych korzystniejszych prognoz jest pobudzenie miejscowej i systemowej odpowiedzi układu immunologicznego gospodarza. Przemawiają za tym wyniki badań, w których wykazano zwiększony poziom limfocytów CD4+ i CD8+ krążących we krwi chorych zakażonych HPV, w porównaniu do chorych bez infekcji. W nowotworach HPV pozytywnych wykazano także zwiększony napływ komórek układu immunologicznego i nadekspresję różnego rodzaju cytokin. W świetle tych danych sformułowano hipotezę głoszącą, że lepsze rokowanie chorych z infekcją HPV jest związane z uruchomieniem wzmożonej odpowiedzi immunologicznej przez ginące komórki nowotworowe, które generują reakcję zapalną i uwalniają obce antygeny w postaci cząstek wirusa. Reakcja układu odpornościowego na zakażenie wirusami brodawczaka ludzkiego wydaje się odgrywać ważną, choć odmienną rolę, zarówno w kancerogenezie (wyciszenie reakcji immunologicznej), jak i w odpowiedzi chorych na leczenie przeciwnowotworowe (pobudzenie reakcji immunologicznej). Oznaczenie obecności HPV i typu infekcji (infekcja przetrwała), a także badanie zaburzeń układu immunologicznego pod wpływem zakażenia jest zatem istotne dla zdrowych osób i chorych na nowotwory złośliwe.

## Sesja 3

### Analiza kwasów nukleinowych we współczesnej medycynie

#### 3-W-1

#### **Molekularna diagnostyka genetyczna – kiedy więcej znaczy lepiej**

*Marek Sanak*

Zakład Biologii Molekularnej i Genetyki Klinicznej,  
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

Współpraca klinicysty z diagnostą genetycznym pozwala potwierdzić rozpoznanie choroby wrodzonej często jednym celowanym badaniem molekularnym. Jednak duża grupa chorób wrodzonych nie ma typowej manifestacji i może je spowodować mutacja różnych genów. Stąd badania laboratoryjne wykonywane technikami przesiewowymi o wysokiej przepustowości od kilku lat powszechnie są stosowane w diagnostyce genetycznej. Dzięki ich zastosowaniu znacznie zwiększył się odsetek testów ustalających mutację i tym samym przyczynę choroby wrodzonej.

Postęp ten ilustruje diagnostyka genetyczna zaburzeń neurorozwojowych z towarzyszącymi wadami wrodzonymi, fenotyp dotyczący około 5-10% populacji dzieci. Klasyczne badanie cytogenetyczne wykrywa mutację chromosomową u średnio 4% chorych z tej grupy. Powszechnie wprowadzone mikromacierzowe badanie chromosomów (aCGH) zwiększyło odsetek wyników nieprawidłowych w tej grupie do około 8%. Sugeruje to wykonanie badania aCGH jako pierwszego, o ile charakterystyczny fenotyp nie jest wskazaniem do badania kariotypu. Jednak u około 80-85% chorych mutacje nie są wykrywane techniką aCGH. Zdarza się to jeśli wielkość CNV nie jest nieduża, lub występują złożone zaburzenia strukturalne o typie powtarzalnych delecji lub insercji (SV), albo warianty pojedynczych nukleotydów (SNV) nie rozpoznawane przy użyciu tej techniki. Kolejnym etapem badania przesiewowego, którego czułość pozwala na dodatkowe wykrycie mutacji u około 25% chorych jest sekwencjonowanie całego eksomu (WES). Analiza sekwencji kodującej genów umożliwia wykrycie mutacji SNV, mogą też być wykryte CNV, zazwyczaj o większej długości. Znane już są porównania czułości sekwencjonowania całego genomu (WGS) z kombinowaną techniką aCGH i WES. Ponownie, dotyczy to grupy chorych dzieci, których niecharakterystyczny fenotyp uniemożliwił podjęcie celowanej diagnostyki genetycznej, jak w przypadku autyzmu albo niepełnosprawności intelektualnej z towarzyszącymi wadami wrodzonymi, często dyskretnymi. Rekomendowane jest wykonanie WGS z przynajmniej 50-krotnym średnim pokryciem sekwencji genomu, przy 99% jego długości reprezentowanych przez więcej niż 10 odczytów. Interpretacja wyników wymaga zaawansowanych narzędzi bioinformatycznych. Średnio odczyt całego genomu jednej osoby ujawnia ponad 3,5 miliona SNV, 250 CNV i 1600 wariantów strukturalnych (tandemowych duplikacji i delecji). W obrębie regionów kodujących wykrywane jest około 20 000 wariantów nukleotydowych, wliczywszy miejsca składania eksonów. Badanie WGS pozwala wykryć w grupie chorych z nieustaloną diagnozą genetyczną około

40% mutacji będących przyczyną choroby, w przeważającej liczbie dominujących. Około 20-25% przyczynowych mutacji jest typu CNV, pozostałe mutacje dotyczą pojedynczych nukleotydów.

W podsumowaniu, WGS umożliwia wykrycie przyczyny choroby u około 40% dzieci z wrodzonymi zaburzeniami neurologicznymi i cechami dysmorfii lub innymi wadami narządowymi. Jest to blisko 4-krotne zwiększenie czułości w porównaniu do aCGH i co najmniej 2-krotne, gdy uwzględnimy wszystkie inne molekularne badania genetyczne. Szybko zmniejszający się koszt wykonania oraz interpretacji wyników WGS nie pozwana na rzetelną ocenę ekonomiczną takiej strategii. Obecne zalecenia nakazują weryfikację wykrytych mutacji CNV przez badanie aCGH lub mutacji SNV przez sekwencjonowanie Sangera. Należy oczekiwać, że ciągu kilku najbliższych lat WGS stanie się standardowym badaniem diagnostycznym w przypadku chorób wrodzonych o niecharakterystycznym fenotypie.

#### 3-W-2

#### **Sekwencjonowanie DNA nowej generacji (NGS) – zastosowanie w diagnostyce**

*Rafał Płoski*

Zakład Genetyki Medycznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

W 2012 Zakład Genetyki Medycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pozyskał platformę sekwencjonowania następnej generacji Illumina HiSeq 1500, co pozwoliło wdrożyć sekwencjonowanie całoeksomowe (WES) jako metodę badawczą oraz diagnostyczną. Od tego czasu wykonano > 1000 badań WES, z których większość była skierowana na ustalenie rozpoznania u pacjentów z podejrzeniem rzadkiej choroby neurologicznej uwarunkowanej genetycznie. Równolegle zbudowano infrastrukturę informatyczną oraz oprogramowanie pozwalające sprawne analizowanie danych WES pochodzących. Podczas wykładu zostaną zaprezentowane wybrane przykłady ilustrujące możliwości wykrywania nowych mutacji w znanych genach warunkujących choroby, w tym mutacji związanych z zupełnie nowymi fenotypami, a także nowych chorób związanych z mutacjami w genach dotychczas nie związanych z chorobami u człowieka.

#### 3-W-3

#### **Zastosowania i ograniczenia nowych technologii badań genomowych w diagnostyce prenatalnej**

*Łucjusz Jakubowski*

Zakład Genetyki, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi

Badania prenatalne pod kątem określonych typów wad rozwojowych oraz chorób uwarunkowanych genetycznie mają na celu



umożliwienie posiadania zdrowych dzieci rodzinom ponoszącym wyższe niż populacyjne ryzyko wystąpienia tego typu zaburzeń u potomstwa. Integralną częścią diagnostyki prenatalnej jest poradnictwo genetyczne. Niezależnie od identyfikacji „rodzin ryzyka” należy brać pod uwagę problemy związane z właściwą interpretacją wyników badań. Podczas badań postnatalnych wnioskowanie zawiera się w osi „znany fenotyp-genotyp”. W diagnostyce przedurodzeniowej jest to kierunek „genotyp-fenotyp” ze świadomością, że w wielu przypadkach ten sam wariant w obrębie genomu, nawet uznany za patogenny, może objawiać się ze skrajnie różną ekspresją nawet u członków tej samej rodziny.

Od roku 2003 realizowany jest w Polsce Program Badań Prenatalnych (PBP) dedykowany kobietom ciężarnym z określonych grup wskazań do diagnostyki. W ramach programu możliwe są badania przesiewowe o charakterze nieinwazyjnym (USG płodu, markery biochemiczne we krwi matki) oraz diagnostyka materiału uzyskanego na drodze inwazyjnej (biopsja trofoblastu, amniopunkcja, kordocenteza). PBP nie obejmuje diagnostyki preimplantacyjnej, stanowiącej alternatywę dla badań w późniejszym okresie ciąży. Diagnostyka przedurodzeniowa przeprowadzana jest z wykorzystaniem technik cytogenetyki klasycznej, cytogenetyki molekularnej (w tym FISH) oraz metod biologii molekularnej. Badania całogenomowe wykonuje się m. in. przy użyciu porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy (aCGH) i różnych platform do sekwencjonowania następnej generacji (NGS). Jako badanie przesiewowe oferuje się analizę znajdującego się we krwi matki wolnego DNA pochodzącego od płodu (cffDNA). Test ten cechuje wysoka swoistość przede wszystkim w odniesieniu do trisomii chromosomu 21. Odrębne zagadnienie stanowi szybka diagnostyka aneuploidii u płodu przy użyciu FISH, BoBs, MLPA czy QF-PCR. Metody cytogenetyki molekularnej oraz badań całogenomowych wykorzystywane są coraz szerzej podczas wspomnianej już diagnostyki preimplantacyjnej. Wszystkie badania przedurodzeniowe muszą spełniać najwyższe standardy jakości. Powinien istnieć system licencjonowania laboratoriów uprawnionych do ich prowadzenia. Diagnostyka prenatalna wymaga także rozstrzygnięcia szeregu problemów natury etycznej i prawnej. Szkodliwe i stygmatyzujące w kontekście tych badań jest stosowanie pojęć o charakterze pejoratywnym oraz niski merytorycznie poziom debaty publicznej.

### 3-W-4 Molekularna diagnostyka sepsy i sekwencjonowanie następnej generacji (NGS) – czyli co możemy jeszcze zrobić?

*Tomasz Gosiewski (1), Dominika Salamon (1), Agnieszka Sroka-Oleksiak (1), Małgorzata Bulanda (1), Agnieszka Ludwig-Gałęzowska (2), Paweł Wołkow (2)*

(1) Zakład Bakteriologii, Ekologii Drobnoustrojów i Parazytologii, Katedra Mikrobiologii, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków, (2) Ośrodek Genomiki Medycznej – OMICRON Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

Sepsa jest zakażeniem krwi, które wymaga szybkiej diagnostyki i właściwego leczenia. Kluczowe jest potwierdzenie zakażenia oraz określenie jego etiologii. Na całym świecie „złotym standardem” jest diagnostyka mikrobiologiczna sepsy oparta o metody posiewu krwi, które jednak są niewystarczająco czułe wydłużają czas uzyskania wyniku nawet do kilku dni. Alternatywą dla klasycznej diagnostyki mikrobiologicznej mogą być metody biologii molekularnej oparte o detekcję kwasów nukleinowych drobnoustrojów we krwi, takie jak PCR czy FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*) – pozwalają one na szybsze wykrycie śladowych nawet liczb mikroorganizmów w próbkach. Na rynku obecne są bardzo nieliczne zestawy diagnostyczne stosowane w molekularnej diagnostyce sepsy, takie jak np. SeptiFast (Roche), SeptiTest (Molzym) czy VYOO (SIRS-Lab) – umożliwiają one detekcję wybranych gatunków lub grup drobnoustrojów, co pozwala jedynie na potwierdzenie zakażenia, lecz już nie na jego wykluczenie.

Mała ilość dostępnych metod diagnostyki molekularnej sepsy wskazuje na duże trudności techniczne, związane głównie z bardzo małą liczbą komórek mikroorganizmów we krwi, obecnością inhibitorów zaburzających proces amplifikacji DNA oraz koniecznością uzyskania bardzo dobrej jakości izolatów kwasów nukleinowych.

Od niedawna szeroko dostępna na szeroką skalę stała się technika sekwencjonowania następnej generacji (NGS; *Next Generation Sequencing*), która umożliwia m.in. identyfikację w próbce wszystkich grup bakterii, wraz z ich klasyfikacją taksonomiczną. Skoro metoda ta pozwala uzyskiwać wiedzę na temat wszystkich obecnych w próbce drobnoustrojów, pada pytanie czy we krwi pacjentów z klinicznymi objawami sepsy występują bakterie, nawet jeśli nie są wykrywane przy pomocy dostępnych metod diagnostycznych? Czy krew u zdrowych osób jest całkowicie pozbawiona śladów obecności bakterii?

Przeprowadzone przez nasz zespół badania wykazały, że DNA bakteryjne było obecne we wszystkich badanych próbkach krwi pobranych od pacjentów z sepsą oraz zdrowych wolontariuszy, oraz że profile bakteryjne w obydwu grupach były istotnie różne.

## Sesja 4

### Postępy naukowe i metodyczne w diagnostyce hematologicznej

#### 4-W-1

#### Czy warto mierzyć poziom mikrocząstek we krwi obwodowej?

Piotr Marek Radziwon

Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecnicstwa,  
Białystok

Mikrocząstki (MP) to beczkowate pęcherzyki błonowe o wielkości od 0,1 do 1  $\mu\text{m}$  uwalniane m.in. z krążących komórek krwi oraz komórek śródbłona naczyń, bogate w fosfolipidy i białka, ale mogą zawierać również komponenty cytoplazmatyczne oraz mRNA. Skład ilościowy i jakościowy markerów zawartych na ich powierzchni może wskazywać zarówno na komórkę źródłową, jak i na mechanizm powstania mikrocząstki.

MP powstają w wyniku zaburzenia naturalnej asymetrii błon komórkowych spowodowanego apoptozą, bądź aktywacją komórki, np. na skutek kontaktu z trombiną, kolagenem, ciałem obcym, czynnikiem martwicy nowotworów  $\alpha$ , cytokinami zapalnymi a także po związaniu ze składnikami dopełniacza lub pod wpływem niskiej temperatury, hiperglikemii, hipoksji, hiperhomocysteinemii. MP są powszechnie obecne we krwi i mają znaczący wpływ na hemostazę, angiogenezę, rozwój stanu zapalnego, miażdżycę, nowotworów i zakażeń. Biologiczne znaczenie MP zależy od różnych czynników, przede wszystkim od tego z jakich komórek pochodzą, a także pod wpływem jakiego bodźca i w jakich okolicznościach zostały uwolnione. Ich podwyższona liczba jest obserwowana w przebiegu min.: chorób sercowo-naczyniowych, zakrzepicy żył głębokich, choroby obturacyjnej płuc, cukrzycy, wrodzonej niedokrwistości sierpowatokrwinkowej, małopłytkowości indukowanej heparyną, posocznicy, zakrzepowej plamicy małopłytkowej, nocnej napadowej hemoglobinurii, reumatoidalnego zapalenia stawów.

Oznaczanie MP pochodzących z komórek śródbłona i płytek krwi może być pomocne we wczesnym wykryciu, określeniu fenotypu i ciężkości chorób układu krążenia związanych z hipoksją (ostre niedokrwienie mięśnia sercowego, udar) oraz ustalaniu sposobu profilaktyki.

U chorych z wysokim ryzykiem niedokrwienia mięśnia sercowego poziom mikrocząstek z ekspresją CD144 ma sam w sobie wartość prognostyczną niezależną od skali ryzyka Framingham opartego na stężeniu CRP oraz peptydu natriuretycznego. Podobne znaczenie mikrocząstek obserwuje się u chorych na przewlekłą niewydolność nerek. Liczba MP we krwi może też stanowić dodatkowy marker do monitorowania leczenia przeciwplatekowego. Niektóre typy MP mogą być potencjalnym biomarkerem dla przewlekłej choroby obturacyjnej płuc oraz ryzyka zakrzepicy, szczególnie u chorych na nowotwory.

Mikrocząstki mają potencjał jako biomarker w predykcji i rokowaniu szeregu chorób, ponieważ: wiele komórek uwalnia mi-

krocząstki, ich liczba koreluje z fizjologicznym stanem komórek, z których są uwalniane, większość z nich krąży we krwi i innych płynach ustrojowych, a dzięki podwójnej błonie fosfolipidowej są stabilne w przestrzeni pozakomórkowej. Ze względu na przedanalizacyjne i analityczne trudności w oznaczaniu mikrocząstek bardzo pożądane jest opracowanie prostszej metody swoistego i powtarzalnego ich oznaczania.

#### 4-W-2

#### Miejsce diagnostyki laboratoryjnej w rozpoznawaniu choroby Gauchera

Bożena Sokołowska

Klinika Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku,  
Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Znamy obecnie ponad 45 chorób spichrzeniowych (LSDs; *lysosomal storage disorders*). Spośród tych chorób najczęstsza jest choroba Gauchera, która rozwija się u 1 na 40 000 mieszkańców Europy i u 1 na 500-1 na 1000 w populacji Żydów Aszkenazyjskich. Podłożem choroby jest obniżenie aktywności enzymu  $\beta$ -glukocerebrozydazy, co uniemożliwia rozkład glukocerebrozydu do glukozy i ceramidu. Nierozłożony glukocerebrozyd gromadzi się w makrofagach tkankowych, które zmienione patologicznie, nazwane komórkami Gauchera gromadzą się w śledzionie, wątrobie, szpiku, kościach i węzłach chłonnych powodując charakterystyczne objawy kliniczne.

Najbardziej charakterystycznym objawem klinicznym choroby Gauchera jest znaczne powiększenie śledziony. Wątroba powiększa się zwykle 1,5-2 krotnie. Do najważniejszych objawów hematologicznych zalicza się: niedokrwistość, małopłytkowość, leukopenię, zaburzenia krzepnięcia, podwyższone stężenie ferrytyny a także niskie stężenie witaminy B12. W typie 1 choroby, występującym głównie u osób dorosłych, nasilenie większości w/w objawów jest niewielkie i wynika z powiększenia śledziony, hypersplenizmu i nacieczenia szpiku przez komórki Gauchera. Objawy kostne występują u około 80% chorych z typem 1. Oprócz przewlekłych lub napadowych bólów kostnych, może wystąpić osteopenia, martwica kości, ogniska osteolityczne a także złamania patologiczne. Objawy kostne mają charakter postępujący i prowadzą do kalectwa.

Podstawą rozpoznania choroby Gauchera są badania enzymatyczne: badanie aktywności glukocerebrozydazy w leukocytach, która u objawowych chorych obniża się poniżej 30% normy oraz badanie aktywności chitotriozydazy. Aktywność chitotriozydazy, która u chorych może być nawet kilkaset razy wyższa, odzwierciedla stopień nagromadzenia glukocerebrozydu w makrofagach i jest czułym wskaźnikiem skuteczności leczenia. U pewnego odsetka chorych aktywność glukocerebrozydazy w leukocytach może mieścić się w granicach normy. Wówczas w celu rozpoznania



choroby konieczne jest oznaczenie aktywności tego enzymu w hodowlach fibroblastów skóry. W diagnostyce istotne są też badania molekularne. Najczęściej stwierdzane mutacje genu glukocerebrozydazy to: N370S i L444P. Ocena histopatologiczna szpiku nie jest podstawą rozpoznania, ponieważ komórki podobne do komórek Gauchera stwierdza się także w przebiegu innych chorób spichrzeniowych. Ponadto komórki Gauchera naciekają szpik nierównomiernie i tkanka pobrana w czasie biopsji może nie zawierać komórek piankowatych, co z kolei prowadzi do błędnego wykluczenia choroby Gauchera.

W Polsce liczba pacjentów ze zdiagnozowaną chorobą Gauchera wynosi ok. 70 a biorąc pod uwagę częstość jej występowania powinna wynosić ok. 200. Konieczne jest zatem zintensyfikowanie postępowania diagnostycznego, np. poprzez spopularyzowanie badań przesiewowych oznaczania aktywności glukocerebrozydazy za pomocą testu suchej kropli.

### 4-W-3 Laboratoryjna diagnostyka szpiczaka mnogiego

Artur Jurczyszyn

Katedra i Klinika Hematologii, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

Szpiczak mnogi, inaczej plazmocytowy (MM) stanowi 1% wszystkich nowotworów oraz około 10% pierwotnych hemocytopatii. Częstość występowania MM w Europie wynosi 4,5-6,0/100000 przypadków/rok ze średnią wieku 72 lata w chwili diagnozy, śmiertelność wynosi 4,1/100000 przypadków/rok. MM jest nowotworem wywodzącym się z komórek B w końcowym etapie różnicowania. Do niedawna diagnostyka szpiczaka mnogiego była oparta na wykazaniu klonalnego rozrostu komórek plazmatycznych w szpiku kostnym oraz stwierdzeniu objawów uszkodzenia narządowego organów, takich jak hiperkalcemia, niewydolność nerek, anemia, nacieki kostne. Czynniki te są znane jako zbiór kryteriów narządowego uszkodzenia związanego z nowotworem CRAB (*Calcium* – wapń, *Renal Insufficiency* – niewydolność nerek, *Anemia* – anemia, *Bones* – kości). W związku z rozwojem wiedzy o biologii choroby, dzięki dostępności innowacyjnych metod diagnostycznych oraz wprowadzeniu nowych, coraz bardziej skutecznych schematów terapeutycznych, obecne wytyczne Międzynarodowej i Polskiej Grupy Szpiczakowej wprowadziły modyfikację wspomnianych kryteriów, definiując dodatkowe biomarkery złośliwości znane również jako kryteria SLiMCRAB (*Sixty* – 60, *Light Chains* – lekkie łańcuchy, *Magnetic Resonance* – rezonans magnetyczny). Kryteria te opisują następujące czynniki:  $\geq 60\%$  klonalnych komórek plazmatycznych w szpiku,  $> 1$  ogniskowy naciek w obrazie rezonansu magnetycznego oraz stosunek klonalnych do nieklonalnych wolnych lekkich łańcuchów w surowicy sFLC  $\geq 100$ . Kryteria CRAB i SLiMCRAB w połączeniu są aktualnie określane jako czynniki definiujące rozpoznanie szpiczaka objawowego. Według najnowszych wytycznych minimum wymagane do zdiagnozowania szpiczaka kwalifikującego się do leczenia to obecność  $\geq 10\%$  klonalnych komórek plazmatycznych w szpiku lub potwierdzony biopsją pozaszpikowy guz plazmocytowy oraz

jeden lub więcej czynników SLiMCRAB definiujących nowotwór. Dzięki zmodyfikowanym kryteriom choroby wcześniej kwalifikowani do grupy pacjentów z chorobą bezobjawową lub stanem przednowotworowym, czyli gammapatią o nieustalonym znaczeniu MGUS, u których nie występują zmiany narządowe, mogą być teraz kwalifikowani do leczenia. Dla tej populacji pacjentów nowe i bardziej czułe, niż stosowane dotychczas, metody oznaczania laboratoryjnych wskaźników, w tym oceny klonalności białka, które w typowych przypadkach choroby jest wydzielane, dają możliwości monitorowania i coraz bardziej precyzyjnej oceny rokowania, a tym samym identyfikacji pacjentów wysokiego ryzyka. Są one również użyteczne w wyborze terapii, monitorowaniu leczenia, ocenie minimalnej choroby resztkowej i głębokości odpowiedzi na leczenie oraz we wczesnym wykrywaniu wznowy szpiczaka plazmocytoowego. Diagnostyka cytogenetyczna, sekwencjonowanie DNA oraz wykrywanie mutacji genów nie są jeszcze dziś badaniami stosowanymi w postępowaniu rutynowym, ale dają szansę na dalszy rozwój wiedzy i przyszłe sukcesy w leczeniu nowotworu.

### 4-W-4 Badania genetyczne w praktyce hematologicznej

Magdalena Zawada

Zakład Diagnostyki Hematologicznej, Szpital Uniwersytecki w Krakowie

Od kilkunastu lat, wraz z rozwojem nauki, badania genetyczne w chorobach hematologicznych odgrywają coraz większą rolę. Tempo rozwoju wiedzy, wprowadzania do terapii nowych leków przeciwnowotworowych z równoczesnym rozwojem biologii molekularnej sprawia, że w tej dziedzinie medycyny możemy mówić o wkraczaniu w erę medycyny personalizowanej, opartej na optymalizacji leczenia u danego pacjenta ściśle w kontekście patogenezy zmian wykrytych w jego organizmie.

Schorzenia hematologiczne należą do bardzo heterogenicznej grupy chorób. Podstawowe grupy białaczek sklasyfikowane wg Światowej Organizacji Zdrowia to:

1. Nowotwory mieloproliferacyjne (MPN)
2. Nowotwory mieloidalne lub limfoidalne z eozynofilią i nieprawidłowościami *PDGFRA*, *PDGFRB* i *FGFR1*
3. Nowotwory mielodysplastyczno-mieloproliferacyjne MDS/MPN
4. Zespoły mielodysplastyczne (MDS)
5. Ostra białaczka szpikowa z powtarzalnymi nieprawidłowościami genetycznymi (AML)
6. Ostra białaczka szpikowa
7. Ostre białaczki o nieokreślonym pochodzeniu liniowym
8. B komórkowa białaczka limfoblastyczna/chłoniak
9. T komórkowa białaczka limfoblastyczna/chłoniak.

Każdej z wymienionych chorób możemy przypisać pewne charakterystyczne dla niej aberracje genetyczne, z których część klasyfikujemy jako tzw. czynniki rokownicze, których obecność lub brak świadczy o rodzaju nowotworu u pacjenta oraz jak, z dużym prawdopodobieństwem, będzie przebiegało jego leczenie.

## Diagnostyka genetyczna ostrych białaczek

Ostra białaczka szpikowa (AML; *Acute Myeloid Leukemia*) jest chorobą silnie zróżnicowaną ze względu na podtypy cytogenetyczne uzupełnione o obecność aberracji molekularnych. Bardzo ogólnie można je klasyfikować jako:

- „Good risk” z obecnością tzw. korzystnych zmian cytogenetycznych
- „Intermediate risk” pacjenci z prawidłowym kariotypem oraz innymi nieprawidłowościami
- „Poor risk” – z obecnością niekorzystnych zmian cytogenetycznych.

Badania molekularne w ostrej białaczce szpikowej to w pierwszej kolejności diagnostyka i określenie stopnia zaawansowania choroby oraz w dalszych etapach monitorowanie choroby resztkowej w kontekście odpowiedzi na zastosowane leczenie. Obecnie w Polsce molekularnym standardem diagnostycznym jest ocena występowania typowych nieprawidłowości:

- t(8;21) *RUNX1-RUNX1T1* (*AML1-ETO*);
- inv(16) lub t(16;16); *CBFB-MYH11*;
- t(15;17) *PML-RAR*;
- *MLL-PTD*;
- *EVI1*
- testy molekularne w kierunku: *FLT3*, *NPM1*, *Kit*, *CEBP* CCAAT/ enhancer binding protein alpha oraz potencjalnie użyteczne testy molekularne w kierunku: *DNMT3a*, *TET2*, *MLL*, *IDH1*, *IDH2*.

Obecność mutacji tandemowej w genie *Flt3* (*Flt3-ITD*) wyraźnie koreluje ze złą prognozą, natomiast alternatywnie, pojedyncze mutacje w genie *NPM1* (nucleophosmin1 gene) (najczęstsza mutacja identyfikowana w AML o prawidłowym kariotypie) jest związana z korzystnym rokowaniem. Uważa się aktualnie, że analiza co najmniej *NPM1* i *FLT3* wystarcza w ocenie ryzyka AML. Badania te są niezbędne dla wszystkich chorych na AML w momencie diagnozy.

Inne markery molekularne mogące być użyteczne w stratyfikacji ryzyka to m in.:

- Mutacja w genie *CEBP* (CCAAT/enhancer binding protein alpha) świadczy o korzystnej prognozie w przypadku braku niekorzystnych zmian
- Mutacje w genach *IDH1* (białko cyklu Krebsa) i *IDH2* (białko mitochondrialne) identyfikowanych u ok. 20% pacjentów z prawidłowym kariotypem świadczą o złej prognozie
- Mutacja w onkogenie *TET2* (najczęściej stwierdzana w momencie progresji zespołów mielodysplastycznych lub mieloproliferacyjnych do AML) koreluje z krótszym przeżyciem
- Mutacja w genie *RUNX* jest niezależnym czynnikiem prognostycznym korelującym z krótszym przeżyciem

Leczenie AML z charakterystycznymi zmianami genetycznymi może być uzupełnione o leczenie celowane ukierunkowane na konkretną aberrację. W badaniach klinicznych AML z mutacją *FLT3-ITD* (30% AML) wykorzystuje się inhibitory kinazy *Flt3* np. Lestaurtinib, Midostaurin czy Sunitinib. Nie mają one jednak zadowalającej skuteczności w monoterapii, jednak stosowane dodatkowo z chemioterapią pozwalają na znaczne zwiększenie jej skuteczności.

Ostra białaczka limfoblastyczna (ALL; *Acute Lymphoblastic Leukemia*) jest schorzeniem często występującym u chorych przed 30 rokiem życia i stanowi 20% wszystkich ostrych białaczek.

U ok. 30% chorych na ALL występuje gen fuzyjny *BCR-ABL*. Stanowi on wysoce niekorzystny czynnik rokowniczy w tej grupie chorych jednak daje możliwość monitorowania choroby resztkowej (MRD – *Minimal Residual Disease*), które prowadzi się przy pomocy molekularnych metod jakościowych (RT-PCR – polimerazowa reakcja łańcuchowa poprzedzona odwrotną transkrypcją) i ilościowych (RQ-PCR – ilościowa polimerazowa reakcja łańcuchowa w czasie rzeczywistym). W 2008 roku Klinika Hematologii CMUJ w Krakowie wzięła udział w pierwszej międzynarodowej rundzie standaryzacyjnej w ramach *European Leukemia Net* (ELN) oraz *European Working Group for Adult Acute Lymphoblastic Leukemia* (EWALL). Standaryzacja ta miała na celu ujednoczenie protokołów badawczych stosowanych w detekcji genu *BCR-ABL* u chorych na ALL. Pozostałe 70% pacjentów z ALL pozbawione jest możliwości oceny MRD przy pomocy powyższej metody molekularnej, w związku z tym w literaturze opisywane są nowe markery molekularne mogące być użyteczne zarówno w diagnostyce jak i monitorowaniu leczenia u pacjentów chorych na ALL.

- Aberracja *E2A-PBX1* odpowiada translokacji t(1;19). Występuje przede wszystkim u pacjentów, u których stwierdzono podtyp pre-B-ALL z towarzyszącą cytoplazmatyczną ekspresją Igμ, jakkolwiek może ona sporadycznie pojawiać się u pacjentów ze stwierdzoną pro-B-ALL i common ALL (<1% przypadków). Występowanie *E2A-PBX1* koreluje z obecnością znanych niekorzystnych czynników klasyfikujących pacjentów do grupy wysokiego ryzyka, takich jak: podwyższona liczba leukocytów, wysoki poziom LDH i zajęcie centralnego systemu nerwowego.
- Gen fuzyjny *TCRD-TAL1* (alternatywne nazwy genu *TAL1* to *SCL* i *TCL5*) jest następstwem pojawienia się translokacji t(1;14). Aberracja *SIL-TAL1* występuje u około 16% dorosłych z T-ALL. Nie określono jednoznacznie wartości prognostycznej tego czynnika jak i możliwości jego wykorzystania do monitorowania choroby resztkowej.
- Gen fuzyjny *TEL-AML1* (znany również jako *ETV6/RUNX1* lub *ETV6-CBFA2*) występuje u mniej niż 2% dorosłych pacjentów ze stwierdzoną pre-B-ALL i common ALL, natomiast nie odnaleziono przypadków występowania tego genu fuzyjnego u pacjentów z T-ALL ani z AML. Częstość występowania tego genu fuzyjnego u pacjentów jest podobna, zarówno w momencie diagnozy jak i nawrotu choroby. Stwierdzono również, że pacjenci z tą aberracją mają niską wyjściową liczbę WBC i nie mają hyperdiploidalnego DNA. Występowanie genu fuzyjnego *TEL-AML1* jest dobrym czynnikiem prognostycznym i wiąże się z opóźnieniem nawrotu choroby.
- *CALM-AF10* koreluje z translokacją t(10;11). Znaczenie prognostyczne tego czynnika zależy od stadium rozwoju białaczki. Jest to dobry czynnik prognostyczny w przypadku T-ALL wywodzącej się z limfocytów T dojrzałych o zreorganizowanych receptorach Tδy, natomiast jego ekspresja w ALL wywodzącej się z niedojrzałych komórek T, w których nie doszło do reorganizacji receptorów TCRδy jest niekorzystnym czynnikiem rokowniczym. Odnaleziono kilka różnych odmian genu fu-

zyjnego *CALM-AF10* jednak nie stwierdzono żadnej korelacji z podtypem białaczki.

Obecne standardy międzynarodowe prezentowane przez WHO wymagają oznaczania powyższych markerów w grupie chorych na ALL.

### Diagnostyka genetyczna chorób mieloproliferacyjnych bez chromosomu Filadelfia

Najczęściej diagnozowanymi chorobami mieloproliferacyjnymi bez chromosomu Filadelfia (MPN – *Mieloproliferative Neoplasms*) są czerwieńca prawdziwa, nadpłytkowość samoistna i pierwotna mielofibroza. Diagnostyka genetyczna polega na analizie występowania mutacji w genach *JAK2*, *CALR*, *MPL* [10] a w przypadku rozpoznania mielofibrozy także mutacji w genie *ASXL1*. Mutacje w genie *ASXL1* stanowią wysoce niekorzystny czynnik rokowniczy i korelują ze złą prognozą.

Mutacja w genie *JAK2* występuje u 98% pacjentów z czerwieńcą, u 50-60% pacjentów z nadpłytkowością oraz u 55-65% pacjentów z mielofibrozą. Mutacje w genach *CALR* oraz *MPL* nie występują u pacjentów z czerwieńcą, natomiast częstotliwość ich występowania to odpowiednio 20% 25% i 3-4% u pacjentów z nadpłytkowością oraz 20-25% i 6-7% u pacjentów z mielofibrozą. U blisko 10-15 % pacjentów nie stwierdza się występowania żadnej z powyższych mutacji i grupę tę nazywamy „potrójnie negatywną” (*“triple negative”*).

U części pacjentów stwierdza się także występowanie innych mutacji niespecyficznych tylko dla MPN i są to *ASXL1*, *TET2*, *SRSF2* oraz *U2AF1*. W przypadkach zaostżenia choroby do fazy blastycznej, stwierdza się występowanie mutacji w genach *IDH1* oraz *IDH2*, *TP53*, *IKZF1* oraz *LNK*. Inne rzadkie mutacje wykrywane w MPN to między innymi mutacje w genach: *SF3B1*, *EZH2*, *CBL* czy *SETBP1*. Rola tych mutacji w patogenezie MPN nie jest jeszcze do końca poznana. Uważa się, że ich obecność koreluje z występowaniem mutacji tzw. „driverowych” (*JAK2*, *MPL*, *CALR*) co wpływa na zmniejszenie wpływu cytokin, splicing RNA, czy regulację transkrypcji. Wyższa częstość występowania niektórych z tych mutacji w fazie blastycznej MPN, może wskazywać na prawdopodobieństwo transformacji/progresji choroby do ostrej białaczki szpikowej.

### Diagnostyka przewlekłej białaczki szpikowej

Sztandarowym przykładem nowotworu, w którego leczeniu stosowana jest terapia celowana jest przewlekła białaczka szpikowa (PBSz). Jej cechą charakterystyczną jest występowanie genu *BCR-ABL* kodującego białko enzymatyczne obdarzone patologicznie wysoką aktywnością kinazy tyrozynowej. Z początkiem XXI wieku nastąpił istotny przełom w leczeniu farmakologicznym przewlekłej białaczki szpikowej poprzez pojawienie się bowiem możliwości leczenia pacjentów przy pomocy leków działających selektywnie i kompetytywnie na patologiczną kinazę tyrozynową *BCR-ABL*. Mają one zdolność blokowania miejsca aktywnego wszystkich poznanych odmian kinazy *BCR-ABL*, współzawodniczą z ATP (adenozynotrifosforan) o miejsce wiązania w specyficznym miejscu domeny kinazy, hamując fosforylację białka *bcr-abl*. Uniemożliwia to jej interakcję z białkami substratowymi przekazującymi sygnał proliferacyjny do jądra komórkowego i wywołuje apoptozę komórek białaczkowych.

W diagnostyce PBSz wykorzystuje się metodę RT-PCR typu multiplex umożliwiającą wykrycie obecności różnych podtypów aberracji *BCR-ABL* lub jej braku. Do monitorowania choroby resztkowej PBSz złotym standardem jest obecnie technika RQ-PCR w wyniku której uzyskujemy informację o poziomie transkryptu *BCR-ABL* w trakcie terapii. Dokładna i szybka informacja o poziomie MRD pozwala na:

- szybką decyzję o modyfikacji leczenia (zwiększenie dawki stosowanego leku, terapie innowacyjne),
- możliwości zmniejszenia toksycznych efektów leczenia poprzez redukcję jego intensywności u pacjentów dobrze odpowiadających na terapię.

Monitorowanie MRD w PBSz jest ujednolicone poprzez standaryzację oceny ekspresji *BCR-ABL* u chorych na przewlekłą białaczkę szpikową prowadzonej w ramach konsorcjum *European Leukemia Net* oraz *EUTOS for CML* co pozwala na wyrażanie wyników w uniwersalnej skali międzynarodowej (IS; *International Scale*). Pracownia Diagnostyki Molekularnej Zakładu Diagnostyki Hematologicznej Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie posiada status Narodowego Laboratorium Referencyjnego w tym zakresie. U części pacjentów z czasem może dojść do nabycia lub wyselekcjonowania specyficznej mutacji punktowej wewnątrz ważnego regionu domeny kinazowej *ABL* i w takiej sytuacji wskazane jest wykonanie badania w kierunku wykrycia tego typu mutacji metodą bezpośredniego sekwencjonowania. W zależności od typu wykrytej mutacji można stosować modyfikację stosowanego leczenia.

### Podsumowanie

Obecnie, w przypadku wszystkich typów nowotworów, tylko dla 10% pacjentów jest możliwa terapia personalizowana w oparciu o typ wykrytej mutacji. W przypadku PBSz u 90% pacjentów osiągnięto wielki sukces terapeutyczny w postaci uzyskania długich trwałych głębokich odpowiedzi molekularnych. Niestety w przypadku innych nowotworów, odpowiedzi trwają dużo krócej, od kilku miesięcy do kilku lat i po tym czasie dochodzi do nawrotu choroby lub ewolucji klonalnej.

Bardzo istotną rolę w procesie diagnostycznym pełnią badania genetyczne pozwalające często na precyzyjne zakwalifikowanie pacjenta do konkretnej terapii w oparciu o profil wykrytych mutacji. Równocześnie, następuje ciągły rozwój metodyki stosowanej w tej dziedzinie. Wielkie nadzieje wiąże się z rozwojem sekwencjonowania nowej generacji, które pozwala na szybkie przebadanie wielu pacjentów pod kątem wielu mutacji czy aberracji genetycznych w trakcie pojedynczego badania panelowego. Podobnie, zastosowanie nowej metody tzw. cyfrowej PCR (*droplet digital PCR*) działającej w oparciu o absolutną kwantyfikację badanej aberracji genetycznej charakteryzującej się bardzo dużą czułością (nawet  $10^{-7}$ ), rozdzielczością i wysoką tolerancją na inhibitory pozwala na prowadzenie badań nad markerami molekularnymi nowotworów – oszacowywanie liczby kopii DNA/RNA, wykrywanie rzadkich mutacji, ocenę ekspresji genów na poziomie mRNA/miRNA czy badanie rzadkich transkryptów pozwalające na opisanie ich funkcji w biologii komórki czy patomechanizmie chorób. Uważa się, że zmienność liczby kopii może być istotna w przebiegu licznych chorób lub być również podłożem niekorzystnych reakcji na stosowany lek.



## Sesja 5

### Laboratoryjna diagnostyka niewydolności serca (we współpracy z Polskim Towarzystwem Kardiologicznym)

#### 5-W-1

#### Obraz kliniczny niewydolności serca

Ewa Konduracka

Klinika Choroby Wieńcowej i Niewydolności Serca,  
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

(nie nadesłano streszczenia)

#### 5-W-2

#### Oś IL-33/ST2 – znaczenie w chorobach sercowo-naczyniowych (niewydolność serca, miażdżyca)

Dariusz Sitkiewicz

Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej,  
Katedra Biochemii i Chemii Klinicznej, Warszawski  
Uniwersytet Medyczny

ST2 należy do rodziny receptorów interleukiny-1 (IL-1). Występuje w dwóch podstawowych izoformach: transbłonowej lub komórkowej (ST2L) i rozpuszczalnej lub krążącej (sST2). ST2 jest receptorem dla interleukiny-33 (IL-33), która jest cytokiną podobną do IL-1 i wydzielaną przez żyjące komórki w odpowiedzi na stres mechaniczny lub uszkodzenie. IL-33 wykazuje swoje funkcję przez interakcję z kompleksem receptora ST2L i białka akcesorowego (IL-1RAcP). System IL-33/ST2L ulega aktywacji w kardiomiocytach fibroblastach w następstwie uszkodzenia komórek.

W modelach doświadczalnych wykazano, że interakcja pomiędzy IL-33 i ST2L wykazuje działanie kardioprotekcyjne redukując włóknienie miokardium, hipertrofię kardiomiocytów a także apoptozę, co prowadzi do poprawy funkcji serca. Rozpuszczalna izoforma sST2 efektywnie wiąże IL-33 i hamuje jej interakcję z ST2L, co w konsekwencji ogranicza efekt kardioprotekcyjny i dlatego sST2 zyskał miano „receptora przynęty” (ang. *decoy receptor*). Rola interakcji IL-33/ST2 nie ogranicza się jedynie do wpływu na funkcję miokardium. Wykazano ostatnio istotny udział osi IL-33/ST2 także w rozwoju i progresji miażdżycy.

Szlak sygnalizacyjny indukowany interakcją IL-33/ST2L jest ważnym elementem parakrynnego systemu fibroblasty-kardiomiocyty o dobrze udokumentowanym działaniu kardioprotekcyjnym. W odróżnieniu, sST2 wychwytyując IL-33 znosi działanie osi IL-33/ST2. Stężenia sST2 wzrastają istotnie zarówno w zawale jak i niewydolności serca i dostarczają ważnych informacji prognostycznych, szczególnie w połączeniu z oznaczeniem stężenia NT-proBNP.

#### 5-W-3

#### Nowe biomarkery niewydolności serca: od peptydów natriuretycznych do miRNA

Grażyna Sygitowicz

Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej,  
Katedra Biochemii i Chemii Klinicznej, Warszawski  
Uniwersytet Medyczny

Niewydolność serca (HF) jest najczęstszą przyczyną zgonów sercowo-naczyniowych. Jest związana z patologiczną hipertrofią mięśnia sercowego, a w szczególności z procesem włóknienia oraz z martwicą i apoptozą miocytów. Istotną rolę w diagnostyce HF zajmują markery biochemiczne. Obecnie, jedynymi w pełni zaaprobowanymi markerami w rozpoznaniu HF, których przydatność kliniczna w oparciu o kryteria medycyny laboratoryjnej opartej na dowodach naukowych została udowodniona, są peptydy natriuretyczne.

Niezwykle istotną rolę w ocenie czynnego procesu chorobowego, jak i w monitorowaniu procesów naprawczych zachodzących w kardiomiocytach odgrywają markery procesu włóknienia. Szczególną rolę przypisuje się tutaj metaloproteinazom (MMPs) i ich inhibitorom (TIMPs) oraz galektynie-3 i rozpuszczalnej izoformie receptora ST2 (sST2). Liczne badania kliniczne wskazują, że wysokie stężenia galektyny-3 oraz sST2 są niekorzystnymi czynnikami rokowniczymi u pacjentów z niewydolnością serca. Korzystną perspektywę ujawniają również cząsteczki miRNA, które są zaangażowane w procesy fizjologiczne zachodzące w mięśniu sercowym, ale i także w procesy związane z patologicznym jego przerostem. W uszkodzonym sercu wiele cząsteczek miRNA jest zaangażowanych w przebudowę serca i progresję niewydolności serca. Równowaga pomiędzy pro-włóknieniowymi cząsteczkami miRNA a pro-apoptycznymi cząsteczkami miRNA bierze prawdopodobnie udział w rozwoju niewydolności serca. Dużą uwagę poświęca się cząsteczkom: miRNA-21 i miRNA-208a z grupy cząsteczek pro-włóknieniowych oraz miRNA-1 z grupy pro-apoptycznych. Wydają się być one niezwykle obiecujące, zwłaszcza że potwierdzono wzajemne relacje stężeń: NT-proBNP oraz galektyny-3 z odpowiednimi miRNA. Znajomość ekspresji tych cząsteczek w krążeniu może przyczynić się do poznania szczegółowego, molekularnego mechanizmu niewydolności serca oraz może odzwierciedlać stadium zaawansowania choroby.

**5-W-4****Prognostyczne znaczenie peptydów natriuretycznych**

Marek Paradowski

Uniwersytecki Szpital Kliniczny im. Wojskowej Akademii Medycznej – Centralny Szpital Weteranów

Peptydy natriuretyczne – NP (BNP, NT-proBNP) są uznanymi już testami laboratoryjnymi w rozpoznawaniu/wykluczaniu niewydolności serca (HF). Prowadzone od kilku lat badania wskazują, że oznaczanie stężenia NP może być wykorzystane u ludzi zdrowych bez wcześniejszych zdarzeń sercowo-naczyniowych (S-N) i u pacjentów w czasie hospitalizacji oraz po jej zakończeniu dla przewidywania (predykcji) wystąpienia zaostrzeń HF lub różnych niepomyślnych incydentów S-N. Kliniczną użyteczność oznaczeń NP w tym zakresie wykazano u ludzi:

- zdrowych bez wcześniejszych incydentów S-N dla stratyfikacji ryzyka wystąpienia chorób S-N (*McDonald and Wilkinson: Clin Chem 2017*);
- z przewlekłym HF leczonych ambulatoryjnie w przewidywaniu jej zaostrzeń (*DeBeradinis and Januzzi, jr: Curr Opin Cardiol 2012*);
- po zawale serca dla klinicznej oceny ryzyka pozawałowego (*Khan et al.: Clin Sci (Lond) 2009*);
- hospitalizowanych z powodu przewlekłej HF w celu dokonania stratyfikacji ryzyka niezależnie od etiologii HF (*Cohan-Solal et al.: J Am Coll Cardiol 2009*);
- w ostrej HF przy przyjęciu do OIT i po wyjściu ze szpitala w przewidywaniu przebiegu choroby oraz w predykcji powtórnej hospitalizacji i prawdopodobieństwa śmierci (*Luchner et al.: Eur J Heart Fail 2012*);
- z ostrą nieskompensowaną HF po hospitalizacji w predykcji niepomyślnych zdarzeń: rehospitalizacji lub śmierci (*Januzzi jr et al.: Congest Heart Fail 2012*);
- z migotaniem przedsionków dla predykcji wystąpienia udaru i śmierci (*Hijazi et al.: JACC 2013*);
- z zatorowością płuc dla niepomyślnego przebiegu choroby (*Verschuren et al.: Thromb Res 2013*);
- leczonych w szpitalu z powodu przewlekłej HF dla predykcji rehospitalizacji z wykorzystaniem analizy wielomarkerowej: NT-proBNP, BNP i hs-TNT (*Bayes-Genis: Frontiers in Cardiovasc Med 2016*).

**5-W-5****Zalecenia Panelu Ekspertów PTK i PTDL dotyczące wykorzystania peptydów natriuretycznych w diagnostyce niewydolności serca**

Ewa Straburzyńska-Migaj

I Klinika i Katedra Kardiologii, Szpital Kliniczny „Przemienienia Pańskiego” Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu

Oznaczanie stężeń peptydów natriuretycznych (NP) ma ugruntowaną pozycję w diagnostyce niewydolności serca (HF). Spośród znanych peptydów tylko dwa są powszechnie dostępne w Polsce, w zasadzie tylko w szpitalach. Są to: peptyd natriuretyczny typu B – BNP i N-końcowy fragment propeptydu natriuretycznego typu B – NT-proBNP. Oba peptydy mają równorzędne znaczenie. Nie mogą być jednak stosowane zamiennie, ponieważ zarówno wartości absolutne, jak i odpowiednie wartości odcięcia w diagnostyce HF są różne. W praktyce klinicznej niedostępny jest w Polsce, zalecany przez Europejskie Towarzystwo Kardiologiczne (ESC) – śródkowy fragment peptydu natriuretycznego typu A – MR-proANP. W zaleceniach ESC podano wartości NP przydatne w diagnostyce niewydolności serca w zależności od prezentacji objawów, przy czym podkreśla się, że oznaczanie stężeń NP ma większą wartość wykluczającą niż potwierdzającą rozpoznanie HF.

W przypadku ostrego początku objawów można wykluczyć HF, gdy:

- |             |             |
|-------------|-------------|
| • BNP       | < 100 pg/ml |
| • NT-proBNP | < 300 pg/ml |

W warunkach nie-ostrych można wykluczyć HF, gdy:

- |             |             |
|-------------|-------------|
| • BNP       | < 35 pg/ml  |
| • NT-proBNP | < 125 pg/ml |

Należy pamiętać, że stężenia NP mogą być podwyższone nie tylko w HF. Wiele stanów pozasercowych i chorób serca może wpływać na ich stężenia.

W wytycznych amerykańskich towarzystw naukowych zaleca się oznaczanie NP nie tylko dla potwierdzenia lub wykluczenia HF, ale także należy je rozważyć u pacjentów zagrożonych rozwojem HF jako badanie skriningowe, w wyniku którego można będzie włączyć leczenie zapobiegające HF.

Badanie stężeń NP jest przydatne również w ocenie rokowania chorych z HF, zarówno w fazie przewlekłej, jak i w zaostrzeniu. Przydatność oznaczania NP w monitorowaniu leczenia jest dyskusyjna.

Podsumowanie. Oznaczanie peptydów natriuretycznych ma ugruntowaną pozycję w diagnostyce HF. Obserwujemy coraz większą dostępność oznaczania stężeń BNP i NT-proBNP w Polsce, jednak jest ona nadal niewystarczająca, zwłaszcza w diagnostyce ambulatoryjnej.

## Sesja 6

### Odrębności diagnostyki laboratoryjnej w pediatrii

#### 6-W-1

#### Jakość próbek krwi w pediatrii

Krystyna Sztefko

Zakład Biochemii Klinicznej, Instytut Pediatrii,  
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

Jakość próbki krwi ma ogromny wpływ na jakość wyniku badania laboratoryjnego, który często ma kluczową rolę w medycznym procesie diagnostycznym. Pobranie próbki krwi od dziecka w sposób prawidłowy technicznie nie jest równoznaczne z uzyskaniem próbki o wysokiej jakości. Pobieranie krwi u dzieci wymaga nie tylko umiejętności i wiedzy eksperckiej ale także zręczności i zdolności do krytycznej oceny klinicznej. Procedura pobierania krwi wywala u dzieci strach, ból, dyskomfort a także ekstremalne i nieoczekiwane reakcje. Współczesne techniki pobierania krwi, efektywne systemy do pobierania, ich miniaturyzacja są bardzo użyteczne przy pobieraniu małych objętości krwi od noworodków i niemowląt ale nie rozwiązują wszystkich problemów związanych z jakością próbek.

U noworodków i niemowląt pobieranie nadmiernych objętości krwi w stosunku do rzeczywistych potrzeb laboratorium może prowadzić do anemii jatrogennej. Łatwość pobierania krwi od pacjentów z założonym do żyły lub tętnicy cewnikiem, wzrastająca liczba możliwych do oznaczenia analitów i zwiększona częstość wykonywania oznaczeń przyczyniają się głównie do pobierania coraz większych objętości krwi nie tylko u dzieci. W pediatrii zaleca się korzystanie z probówek czy strzykawek o ściśle zaznaczonych objętościach. Pobranie zbyt małej lub zbyt dużej objętości krwi do probówek zawierających antykoagulant powoduje zaburzenie stosunku krwi do antykoagulantu co ma wpływ na jakość próbki. Wymieszanie niewielkiej objętości krwi z antykoagulantem małej probówki nie jest łatwe i często nie cała krew miesza się z antykoagulantem. Z drugiej strony, zbyt intensywne mieszanie powoduje hemolizę krwi z powodu kruchości erytrocytów. Korzystanie z tego samego typu probówek o tym samym numerze serii jest polecane przy monitorowaniu danego analitu. Właściwa kolejność pobierania krwi do odpowiednich probówek jest obligatoryjna, bowiem błędy z powodu kontaminacji EDTA są większe przy małych objętościach próbek. Ze względu na zwiększony stosunek powierzchni parowania do objętości w przypadku małych objętości krwi/surowicy probówki czy naczynka powinny być zawsze zabezpieczone korkiem lub nakrywką aby uniknąć parowania próbek.

Chociaż wiele czynników przedanalitycznych mających wpływ na wyniki oznaczeń laboratoryjnych u dzieci i dorosłych jest podobnych to w pediatrii dodatkowym czynnikiem jest odpowiednie nawodnienie dziecka (zwłaszcza u dzieci z gorączką) niezależnie od jego wieku. Status dziecka z punktu widzenia ostatniego posiłku, zwłaszcza u noworodków, powinien być znany przed

pobranem krwi i odnotowany. Częstsza hemoliza i bilirubinemia u noworodków istotnie wpływa na jakość próbki.

Wynik oznaczenia laboratoryjnego zależy od wielu czynników ale jakość próbki jest najważniejsza ponieważ wszystkie inne czynniki przedanalityczne i analityczne to zawsze elementy dodatkowe. Każdy, również diagnosta laboratoryjny, powinien robić wszystko aby poprawić jakość próbek krwi pobieranych od dzieci, ponieważ wiarygodny i czasowo dostarczony wynik ma istotny wpływ na bezpieczeństwo pacjenta.

#### 6-W-2

#### Różnicowanie zakażeń wirusowych i bakteryjnych u dzieci metodą cytometrii przepływowej

Anna Stelmaszczyk-Emmel

Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii  
Klinicznej Wieku Rozwojowego, Warszawski Uniwersytet  
Medyczny

Różnicowanie pomiędzy bakteryjną a wirusową przyczyną zakażenia stanowi podstawę do decyzji o zastosowaniu odpowiedniego leczenia. Lekarze, przyjmujący gorączkujących pacjentów, starają się uniknąć potencjalnego ryzyka, jakie niosą ze sobą choroby bakteryjne i często podają antybiotyki na wyrost lub zbyt wcześnie. W wielu przypadkach okazuje się, że antybiotykoterapia jest niekonieczna, a wręcz niewskazana, gdyż wpływa negatywnie na zdrowie pacjenta. A dodatkowo, występowanie oporności bakteryjnej jest coraz większym problemem.

Jednym z głównych powodów nadużywania stosowania antybiotykoterapii jest brak szybkiego i odpowiedniego testu diagnostycznego, gdyż oczekiwanie na potwierdzenie lub wykluczenie bakteryjnego pochodzenia zakażenia jest często zbyt długie.

Złotym standardem potwierdzającym bakteryjną etiologię infekcji są hodowle komórek bakteryjnych, przy których czas wydania wyniku wynosi od 6 – 48h. Często ocena hodowli bakteryjnych u osób już otrzymujących antybiotyki może dawać wyniki fałszywie ujemne. Obecnie, rutynowo wykorzystywane parametry laboratoryjne do diagnostyki zakażeń bakteryjnych obejmują oznaczenie liczby leukocytów, neutrofilii, limfocytów, białka C-reaktywnego (CRP), opad Biernackiego (OB) czy prokalcytoninę. Testy te cechuje jednak niewystarczająca swoistość i czułość.

Od kilku lat dużo uwagi poświęca się cytometrycznej ocenie antygenów powierzchniowych na monocytach i neutrofilach, która po zastosowaniu odpowiedniego algorytmu pozwala na dokładne zróżnicowanie przyczyn zakażenia. Ocenie podlegają najczęściej antygeny związane z rozpoznawaniem, fagocytozą i opsonizacją patogenów, a także prezentacją antygenów oraz działaniem komplementu. Należą do nich między innymi: CD64, CD35, CD32, CD88, CD46, CD55, CD59, MHC Class I, CD46, CD10, CD66b, CD282.

Podczas wykładu zostanie przedstawiona metoda cytometrycznej oceny wybranych antygenów powierzchniowych wykazujących ekspresję na granulocytach i monocytach, która może ułatwić i przyspieszyć podjęcie decyzji o przyczynie zakażenia, a co za tym idzie o zastosowaniu odpowiedniego leczenia.

### 6-W-3

#### Postępy w diagnostyce laboratoryjnej alergii pokarmowej u dzieci

Urszula Demkow

Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii  
Klinicznej Wieku Rozwojowego, Warszawski Uniwersytet  
Medyczny

Złotym standardem w diagnostyce chorób atopowych są testy skórne i oznaczanie poziomu swoistego IgE w oparciu o ekstrakty alergenowe. Obecnie możliwa jest również diagnostyka oparta na komponentach alergenowych, otrzymanych metodami molekularnymi, naniesionych na mikrochipy białkowe lub metodami immunoblot. W ostatnich latach wprowadzony do diagnostyki testy umożliwiające jednoczesne oznaczanie alergenowo-swoistych przeciwciał w klasie IgE dla wielu alergenów naturalnych i rekombinowanych, co pozwala na dokładniejsze poznanie profilu uczulenia dzieci chorych na alergię pokarmową. Tego typu testy umożliwiają równoczesną detekcję swoistych przeciwciał IgE skierowanych przeciwko poszczególnym epitopom alergenowym. Dzięki wykorzystaniu alergenów reagujących krzyżowo, ułatwia wyjaśnienie niektórych reakcji krzyżowych (profiliny, lipokaliny, parvalbuminy, albuminy surowicy, tropomiozyny, białka spichrzeniowe), a przez swoje szerokie spektrum alergenów pokarmowych, pozwala w przybliżeniu na oszacowanie ryzyka reakcji groźnych dla zdrowia i życia, szczególnie u pacjentów z wieloważnym uczuleniem. Test pozwala również rozpoznać przyczynę zespołu alergii jamy ustnej (OAS), dobór indywidualnego zestawu alergenów do bardziej skutecznego i bezpiecznego odczulania i zdefiniowanie indywidualnych wskazań do diety eliminacyjnej.

### 6-W-4

#### Szacowana wartość przesączania kłębuszkowego (eGFR) u dzieci

Jolanta Bugajska

Zakład Biochemii Klinicznej, Instytut Pediatrii,  
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

Przewlekła choroba nerek (PChN) we wstępnych stadiach jest często bezobjawowa. Chociaż u dzieci i młodzieży wartości GFR poniżej 75 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> mogą wskazywać na PChN, to ciągle poszukuje się markerów, które precyzyjnie odzwierciedlałyby funkcje nerek. Najczęściej w diagnostyce chorób nerek wykorzystuje się oznaczanie stężenia kreatyniny, stężenia cystatyny C w surowicy, oraz wydalanie białka i albuminy z moczem. Najlepszym wskaźnikiem funkcji nerek jest wielkość przesączania kłębuszkowego GFR (*glomerular filtration rate*), czyli objętość osocza przesączanego przez kłębuszki w jednostce czasu. Wartość GFR jest niezbędna w diagnostyce, w monitorowaniu funkcji nerek oraz stosowaniu leków nefrotoksycznych. Złotym standardem dla pomiaru GFR jest nadal klirens inuliny, natomiast w praktyce został on zastąpiony przez pomiar klirensu joheksolu, jotalamatu, <sup>51</sup>CrEDT lub <sup>99m</sup>TcDTPA. Jednak badania te dostępne są jedynie w ośrodkach wysokospecjalistycznych. W praktyce klinicznej GFR u dzieci jest najczęściej szacowany ze wzorów uwzględniających stężenia: kreatyniny, cystatyny C, mocznika i wartości parametrów antropometrycznych (masa, wzrost). Do szacowania GFR (eGFR) stosuje się najczęściej: wzór Filler'a, wzór Zappitelli'a lub wzory Schwartz'a. Wzory te mają jednak wiele ograniczeń szczególnie u dzieci. Najczęściej używanym wzorem do szacowania GFR u dzieci jest wzór Schwartz'a z 2009 roku, który został opracowany w oparciu o wyniki joheksolu ale tylko dla wartości GFR w zakresie 21,1–75,9 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>. U dzieci z wyższymi wartościami GFR wzór ten został zmodyfikowany dla populacji polskiej. Modyfikacja ta jest istotna gdyż w przypadku wartości GFR > 137,7 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> zwiększa się ryzyko wystąpienia zespołu metabolicznego. Tak wysokie wartości GFR występuje także u dzieci z nowotworami złośliwymi.

Biorąc pod uwagę fakt, że w pewnym okresie życia u dzieci obserwuje się wzrost stężenia kreatyniny związany z przyrostem masy mięśniowej, coraz częstsze zaburzenia odżywiania (otyłość, anoreksja) oraz schorzenia mogące mieć wpływ na dokładność oszacowania GFR, istotne jest stosowanie takiego wzoru, który najlepiej odzwierciedlałby filtrację kłębuszkową dla indywidualnego pacjenta.



## Sesja 7

### Diagnostyka zaburzeń hemostazy

#### 7-W-1

#### Skazy krwotoczne wywołane inhibitorami czynników krzepnięcia

Jerzy Windyga

Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

(nie nadesłano streszczenia)

#### 7-W-2

#### Diagnostyka trombofilii – aktualne zalecenia i praktyka

Anetta Undas

Instytut Kardiologii, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

Trombofilia to skłonność do występowania żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej (**ŻChZZ**) oraz niekiedy zakrzepicy tętniczej, w tym zawału serca i niedokrwienego udaru mózgu.

Wrodzona trombofilia obejmuje mutację czynnika V Leiden (5% Europejczyków) i genu protrombiny 20210A (3% Europejczyków) oraz niedobór naturalnych antykoagulantów tj. antytrombiny białka C lub białka S. Najczęstsza nabyta trombofilia to zespół antyfosfolipidowy, który w połowie przypadków występuje u chorych na toczeń trzewny układu.owy.

**Diagnostyka trombofilii zdaniem większości ekspertów jest uzasadniona nie u wszystkich chorych z zakrzepicą ale w wybranych sytuacjach takich jak:**

- Incydent zakrzepowo-zatorowy o niejasnej przyczynie przed 50. rż. lub u osoby z takimi incydentami w rodzinie lub nawracającymi.
- Zaleca się także poszukiwanie trombofilii u chorych z zakrzepicą o nietypowej lokalizacji (np. żyły jamy brzusznej lub zatoki żyłne mózgu) oraz rozwijająca się w czasie ciąży, stosowania doustnej antykoncepcji lub menopauzalnej terapii hormonalnej.
- Nawykowe poronienia lub urodzenie martwego płodu także ma znaczenie gdyż potwierdzono ich związek z zespołem antyfosfolipidowym, którego wykrycie pozwala zastosować właściwe leczenie i przynieść donoszenie płodu.

U chorych z podejrzeniem trombofilii zaleca się zwykle następujące oznaczenia:

1. oporność na aktywowane białko C jako marker w większości przypadków czynnika V Leiden
2. aktywność białka C i poziom wolnego białka S – zmniejszona zwykle odpowiednio <70% i <55% w niedoborze białka C lub białka S
3. aktywność antytrombiny – zmniejszona zwykle między 50%-75% w niedoborze

4. aktywność cz. VIII – zwiększona >150%

5. antykoagulant toczniowy, przeciwciała antykardiolipinowe i przeciwciała przeciw  $\beta_2$ -glikoproteinie I w klasach IgG i IgM aby potwierdzić lub wykluczyć zespół antyfosfolipidowy; konieczne utrzymanie się nieprawidłowych wyników w drugim oznaczeniu po co najmniej 3 miesiącach

6. stężenie całkowite homocysteiny w osoczu, ale nie zaleca się oznaczania polimorfizmu C677T ani A1298C genu reduktazy metylenotetrahydrofolianowej (nie stanowią obecnie trombofilii)

7. czynnik V Leiden i wariant 20210A genu protrombiny zwykle metodą PCR.

Należy rozważyć badanie w kierunku dysfibrinogenemii, gdy stężenie fibrynogenu wynosi <1,5 g/l; wtedy oznacza się poziom antygeny fibrynogenu np. nefelometrycznie i czas trombinowy. Rzadkie trombofilie to niedobór plazminogenu, zwiększona aktywność inhibitora aktywatora plazminogenu, które diagnozowane są w wyspecjalizowanych ośrodkach.

Zwiększone stężenie D-dimerów nie stanowi wskazania do poszukiwania trombofilii.

Zaleca się wykonanie badań diagnostycznych po 36 miesiącach od incydentu zakrzepowego. U pacjenta leczonego warfaryną lub acenokumarolem aktywność białka C i stężenie wolnego białka S są zmniejszone, co często nie pozwala wykluczyć niedoboru tych białek. W razie wątpliwości oznaczenie należy powtórzyć po odstawieniu antagonisty witaminy K na 10-14 dni i zastąpienie go heparyną drobnocząsteczkową. Doustne antykoagulanty niebędące antagonistami witaminy K (NOAC lub DOAC) powodują fałszywie dodatnie wyniki oznaczeń antykoagulantu toczniowego, mogą zawyżyć aktywność antytrombiny i obniżyć aktywność czynnika VIII, zatem oznaczenia najlepiej wykonać co najmniej 24 h od ostatniej dawki.

Wykrycie trombofilii tylko w niektórych przypadkach jest wskazaniem do antykoagulacji do końca życia, zatem interpretacja wyników wymaga doświadczenia i dobrej współpracy diagnosty z lekarzem.

#### 7-W-3

#### Diagnostyka zaburzeń funkcji i metabolizmu płytek

Anna Michno

Katedra Biochemii Klinicznej, Gdański Uniwersytet Medyczny

Wrodzone lub nabyte upośledzenia metabolizmu i funkcji płytek krwi prowadzą do zaburzeń procesu hemostazy pierwotnej, a w konsekwencji do powikłań zakrzepowo-zatorowych lub skazy krwotocznej. Szereg metod laboratoryjnych jest wykorzystywanych w diagnostyce i różnicowaniu zaburzeń funkcji płytek krwi



oraz monitorowania leczenia przeciw-płytkowego. Ocena hemostazy pierwotnej obejmuje podstawową agregację płytek krwi, jak również ocenę interakcji elementów morfotycznych we krwi pełnej z uwzględnieniem sił ścierania zbliżonych do warunków panujących w łożysku naczyniowym oraz ocenę uwalniania ziarnistości płytkowych, ich udziału w tworzeniu skrzepu czy badań molekularnych. Metody te podlegają standaryzacji zgodnie z zaleceniami International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH). Ponadto, opracowywane są algorytmy zastosowania poszczególnych metod do różnicowania zaburzeń płytkowych i oceny skuteczności leczenia.

Dane literaturowe z ostatnich lat wskazują, że ocena metabolizmu energetycznego płytek krwi, z uwzględnieniem funkcji ich mitochondriów mogłoby dostarczać informacji o szeregu chorób neurodegeneracyjnych, psychicznych czy metabolicznych, w tym cukrzycy. Zatem, określenie funkcji mitochondriów płytek krwi mogłoby być wykorzystywane jako model do oceny metabolizmu energetycznego w organizmie.

Co więcej, istnieje coraz więcej dowodów naukowych potwierdzających możliwość potencjalnego wykorzystania mikrocząstek płytkowych (PMPs) jako wysokiej czułości markerów aktywacji i niszczenia płytek krwi w diagnostyce epizodów zakrzepowo-zatorowych, takich jak zawał serca i udar niedokrwienny mózgu, jak również w stanach zwiększonego ryzyka zakrzepowo-zatorowego. Czy standaryzacja wybranych metod oceny funkcji i metabolizmu płytek krwi będzie milowym krokiem rozwoju nowoczesnych badań diagnostycznych? Czy płytki krwi 'wyjdą' poza ramy hematologiczno-hemostatyczne i mają szansę stać się biomarkerami chorób cywilizacyjnych?

## 7-W-4 Badania genetyczne w diagnostyce zaburzeń hemostazy

*Edyta Odnoczko*

Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

Diagnostyka zaburzeń układu hemostazy w praktyce laboratoryjnej bywa zadaniem dość trudnym. Skłonność do nadmiernych krwawień wywołaną zaburzeniami w układzie hemostazy określa

się mianem skazy krwotocznej, zaś skłonność do zakrzepicy – mianem trombofilii. Zarówno wrodzone skazy krwotoczne, jak i wrodzona trombofilia, wynikają z defektu molekularnego jednego lub więcej białek uczestniczących w procesach krzepnięcia krwi. Badania genetyczne umożliwiają zidentyfikowanie defektu molekularnego odpowiedzialnego za wystąpienie zaburzenia układu hemostazy, co ostatecznie weryfikuje rozpoznanie choroby. W przypadku diagnostyki wrodzonych skaz krwotocznych badaniom molekularnym poddaje się m.in. pacjentów z hemofilią A i B, z chorobą von Willebranda, niedoborem fibrynogenu, niedoborem czynnika V, VII, X, XI i XIII, trombastenią Glanzmanna, zespołem Bernarda-Souliera i płytkową postacią choroby von Willebranda. W przypadku diagnostyki wrodzonej trombofilii obecnie niemalże rutynowo wykonuje się badania w kierunku obecności najczęściej występujących mutacji prozakrzepowych [c.1601G>A (p.Arg534Gln) w genie czynnika krzepnięcia V (*F5*) oraz mutacji c.\*97G>A w genie czynnika krzepnięcia II (*F2*)], a także prowadzi się badania molekularne u pacjentów z niedoborem antytrombiny (AT), białka C (PC), białka S (PS).

Sztandarowym i najlepiej scharakteryzowanym przykładem wrodzonej skazy krwotocznej jest hemofilia. Wyróżnia się hemofilię A, spowodowaną niedoborem osoczonego czynnika krzepnięcia VIII (FVIII), oraz hemofilię B, u podłoża której leży niedobór czynnika IX (FIX). Niedobór tych czynników krzepnięcia prowadzi do istotnych zaburzeń w układzie hemostazy będących przyczyną nadmiernych krwawień, zaś nasilenie objawów skazy krwotocznej determinuje stopień niedoboru FVIII/FIX w osoczu. Rozpoznanie HA lub HB stawia się głównie na podstawie wyników badań krzepnięcia osocza, w tym pomiaru aktywności koagulacyjnej FVIII/FIX. Współcześnie uważa się, że diagnostyka HA/HB powinna być uzupełniana o badania molekularne identyfikujące mutację sprawczą choroby, gdyż umożliwia to wstępną ocenę ryzyka rozwoju alloprzeciwciał (inhibitora) wobec FVIII/FIX oraz postawienie pewnej diagnozy stanu nosicielstwa HA/HB.

W wykładzie przedstawiono algorytmy przeprowadzania badań genetycznych u pacjentów z zaburzeniami hemostazy, a także omówiono najczęściej wykorzystywane techniki molekularne wraz z trudnościami związanymi z interpretacją uzyskanych wyników.

## Sesja 8

### Laboratoryjna diagnostyka chorób układu wewnątrzwydzielniczego (we współpracy z Polskim Towarzystwem Endokrynologicznym)

#### 8-W-1

#### **Pomiar wolnych frakcji hormonów – problem metodyczny czy kliniczny?**

Krystyna Sztefko

Instytut Pediatrii, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

Wiele hormonów krążących we krwi występuje zarówno w stanie wolnym jak i w formie związanej z białkami swoistymi i nieswoistymi. Pomiędzy frakcją wolną i związaną hormonu istnieje dynamiczna równowaga, która zależy nie tylko od stężenia frakcji wolnej i czy stężenia białek, ale także zależna jest od środowiska (pH, siły jonowej), obecności leków i stanu klinicznego pacjenta. Laboratoryjnie oznaczyć można całkowite stężenie hormonu, stężenie frakcji wolnej i stężenie białek wiążących. O ile oznaczenie całkowitego stężenia hormonu czy białek wiążących nie stanowi problem to oznaczenie wolnej frakcji hormonu nie naruszając równowagi jaka istnieje pomiędzy frakcją wolną i związaną jest praktycznie niemożliwe.

Metody oznaczania wolnych frakcji hormonów mogą być bezpośrednie (metodą dializy równowagowej, metody rozcieńczenia izotopowego) lub szacunkowe (metody immunochemiczne). Wszystkie metody mają ograniczenia i mogą zawyżać lub zaniżać wyniki pomiaru przy nieprawidłowym stężeniu białek wiążących. Równoczesne oznaczanie stężenia wolnej i związanej frakcji hormonu oraz białek wiążących nie rozwiązuje problemu, bowiem nie da się na tej podstawie określić stężenia wolnej frakcji. Problemem jest także czułość metod, ponieważ stężenie wolnej frakcji może być nawet 1000 razy niższe niż całkowitej frakcji hormonu. Niezależnie od trudności metodycznych nie znane są wszystkie czynniki wpływające na równowagę pomiędzy oboma frakcjami w zależności od warunków patologicznych.

Dla klinicystów istotna jest stężenie wolnej frakcji hormonu, bowiem frakcja ta jest aktywna biologicznie. I chociaż niektóre oznaczenia, np. oznaczenie stężenia FT4, wykonywane są od dwóch dekad, ich kliniczna przydatność jest coraz bardziej kwestionowana zwłaszcza gdy stężenia tej frakcji są niskie. Chociaż najwięcej wątpliwości przy interpretacji wyników wzbudzają oznaczenia wykonywane dla populacji szpitalnej i geriatrycznej oraz dla kobiet w ciąży to w praktyce nigdy do końca nie ma pewności czy próbka pacjenta jest wolna od czynników interferujących, np. przeciwciał heterofilowych czy autoprzeciwciał. Wątpliwości związane z oznaczeniami wolnych frakcji hormonu nie zlikwiduje postęp w metodologii gdyż każda metoda ma swoje ograniczenia nie tylko analityczne, ale także ekonomiczne. Nie znając zmienności wewnątrzosobniczej i międzypersonicznej dla wolnych frakcji wielu hormonów nie można korzystać z populacyjnych wartości referencyjnych. Z kolei osobnicze wartości referencyjne wymagają

oznaczeń zawsze tą samą metodą zakładając, że rodzaj i stężenie potencjalnych czynników interferujących we krwi pozostają niezmiennie. Ten ostatni warunek jest w praktyce niemożliwy do osiągnięcia. Zatem oznaczanie wolnych frakcji hormonów to nie tylko problem analityczny, ale także kliniczny wymagający od lekarza akceptacji ograniczeń metodycznych i interpretacji wyników w połączeniu z innymi, często nie związanymi bezpośrednio z danym hormonem, badaniami laboratoryjnymi.

#### 8-W-2

#### **Diagnostyka subklinicznej nadczynności i niedoczynności tarczycy w ciąży**

Alicja Hubalewska-Dydejczyk

Katedra i Klinika Endokrynologii, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

Zaburzenia funkcji tarczycy są dobrze znanym czynnikiem ryzyka wystąpienia zaburzeń płodności, a nieleczone prawidłowo w czasie ciąży zwiększają ryzyko powikłań położniczych oraz mają niekorzystny wpływ na rozwój płodu. W ciągu ostatnich lat przybyło danych klinicznych sugerujących, że łagodne formy zaburzeń funkcji tarczycy tj. subkliniczna niedoczynność tarczycy i hypotyroksynemia (hypoT), również zwiększają ryzyko niekorzystnych następstw położniczych, chociaż ich przyczyny nie są w pełni jasne.

Rozpoznanie subklinicznych zaburzeń funkcji tarczycy opiera się wyłącznie na podstawie wyników badań laboratoryjnych głównie TSH i FT4. Stąd bardzo ważne jest, aby pamiętać, że każdy czynnik wpływający na wartość tych oznaczeń może potencjalnie spowodować uznanie oznaczonych wyników TSH i FT4 za czynnik ryzyka wystąpienia dysfunkcji tarczycy. Objawy kliniczne zarówno subklinicznej nadczynności (SNT) jak i niedoczynności (SHT) tarczycy są niespecyficzne i mogą występować w różnych innych stanach patologicznych jak również w fizjologicznej ciąży. Obecność p-ciał przeciwtarczycowych w surowicy krwi ciężarnej jest najczęściej brany pod uwagę czynnikiem ryzyka istniejącej choroby tarczycy; ostatnie badania wskazują także na znaczenie BMI, wieku matki, palenia papierosów, liczby ciąż/porodów, przynależności etnicznej, spożycia jodu i wartości hCG. Niektóre z powyższych, poza zastosowanymi technikami laboratoryjnymi, wpływają na wartość hormonów tarczycy i TSH utrudniając interpretację wyników badań.

W przypadku SHT najczęściej zadawane są pytania jak należy ją zdefiniować, jak należy postępować, aby leczenie było bezpieczne dla matki i płodu i czy rzeczywiście SHT ma negatywny wpływ na organizm matki i dziecka. Przyjmuje się, że SHT rozpoznajemy przy stężeniu TSH powyżej górnej granicy, trymestr specyficznej, wartości referencyjnej TSH przy prawidłowym stężeniu tyroksyny,

a izolowaną hypotyroksynemię (hypoT) jeśli stężenie tyroksyny jest poniżej 2,5 percentyla w stosunku do dolnej wartości referencyjnej trymestr specyficznej przy prawidłowym TSH. Istnieją dane kliniczne, że SHT i hypoT powodują gorszy intelektualny rozwój dzieci, ale niewiele jest danych wskazujących, że leczenie l-tyroksyną im zapobiega i czy podjęcie interwencji leczniczej nie ma niekorzystnego wpływu na przebieg ciąży. Z klinicznego punktu widzenia właściwe postępowanie w SHT jest szczególnie istotne we wczesnej ciąży (do ok. 20 tyg. płód korzysta wyłącznie z hormonów tarczycy pochodzących od matki). Przy braku trymestr specyficznych wartości referencyjnych dla danej populacji i zastosowanej metody laboratoryjnej, najczęściej za górną granicę TSH w I trym. ciąży przyjmuje się wartość 2,5 mIU/l, a w II i III trym. 3,0 mIU/l. Należy w tym miejscu zaznaczyć, że zgodnie z literaturą wyrażenie wartości TSH i FT4 jako MoMs wskazuje, że metody analityczne mają wpływ głównie na wartość otrzymanych wyników FT4, a zmiany TSH spowodowane są raczej przyczynami „poza analitycznymi”.

Stwierdzenie hypoT w II i III trym. ciąży najczęściej uważa się za „zjawisko” laboratoryjne; w I trym. jej etiologia jej jest niejasna (niedobór Fe?) i pytanie czy interwencja terapeutyczna jest wskazana pozostaje otwarte.

Obniżenie TSH poniżej dolnej wartości referencyjnej jest często obserwowane u kobiet ciężarnych (gł. wpływ hCG). W niewielkiej grupie pacjentek w fizjologicznej ciąży TSH może spadać do wartości <0.01 mIU/l. Najważniejszy jest jednak fakt, że rozpoznanie SNT w ciąży nie jest związane z jej powikłaniami. Wyższe wartości hCG związane są z częstszym występowaniem subklinicznej i jawnej nadczynności tarczycy. Ostatnie badania kliniczne wskazują dodatkowo, że wartość hCG może być związana z wyższym ryzykiem występowania hypoT (nie SHT), a kobiety z hypoT wykazują prawidłową odpowiedź tarczycy na stymulację przez hCG, ale ta odpowiedź może być nieprawidłowa w SHT.

Należy mieć nadzieję, że wyniki aktualnie prowadzonych/planowanych badań w niedalekiej przyszłości pozwolą klinicytom na optymalizację postępowania w subklinicznych zaburzeniach funkcji tarczycy u kobiet w ciąży.

### 8-W-3 Czy niskie stężenie TSH we krwi zawsze wskazuje na nadczynność tarczycy?

Marek Ruchała

Katedra i Klinika Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu

Hormon tyreotropowy (TSH) wydzielany przez przysadkę stanowi istotny element w regulacji biosyntezy hormonów tarczycy – trójodotyroniny (T3) i tyroksyny (T4). Z tych względów, oznaczenie TSH jest powszechnie wykorzystywane w screeningu zaburzeń czynności tarczycy. Jednakże hormon ten nie odzwierciedla stanu tyreometabolicznego organizmu a jedynie aktywność wydzielniczą przysadki. Z tych powodów, zgodnie z rekomendacjami wszystkich towarzystw endokrynologicznych, następnym krokiem po stwierdzeniu nieprawidłowości w zakresie TSH powinna być

ocena kliniczna oraz oznaczenie hormonów tarczycy, aby ustalić właściwą diagnozę oraz wdrożyć adekwatne leczenie.

Niskie wartości TSH najczęściej znamionują pierwotną nadczynność tarczycy i niestety na tej podstawie, często w praktyce klinicznej, rozpoznaje się nadczynność tarczycy i wprowadza leki tyreostatyczne. Obniżenie stężenia TSH ma miejsce w wielu jednostkach chorobowych i stanach fizjologicznych, które nie prowadzą do nasilenia procesów metabolicznych i nie są powodem nadczynności tarczycy. Obniżenie TSH jest zjawiskiem fizjologicznym i dość częstym w pierwszym trymestrze ciąży. Z kolei konsekwencją zaburzeń w obrębie podwzgórza i przysadki jest niskie TSH i wtórna niedoczynność tarczycy. Niskie TSH w przebiegu przewlekłego i podostrego zapalenia tarczycy nie wymaga leczenia, ponieważ jest wynikiem destrukcji pęcherzyków tarczycy i jest zjawiskiem przejściowym. Podobnie w przypadku „zespołu niskiego T3” nie dążymy do wyrównania poziomu hormonów, ponieważ jest to fizjologiczny proces adaptacyjny do ciężkiej choroby. Do obniżenia TSH może także dochodzić pod wpływem powszechnie znanych i stosowanych leków takich jak Metformina czy hormony steroidowe oraz wielu innych, które zostaną w tym wykładzie zaprezentowane. Należy także zwrócić uwagę na trend stosowania wysokich dawek Biotyny, niejednokrotnie przekraczające tysiącokrotnie rekomendowane dawki witaminy H. Wiele zestawów do oznaczeń hormonalnych i badań immunohistochemicznych wykorzystuje wiązanie biotyna-streptoawidyna. W zależności od zastosowanej metody oznaczeń hormonalnych wysoki poziom krążącej biotyny może wpływać na fałszywie wysoki lub fałszywie niski poziom mierzonego hormonu, na skutek interferencji biotyny w oznaczenia hormonalne.

Reasumując oznaczenie TSH jest świetnym badaniem przesiewowym i niezbędnym elementem diagnostycznym w ocenie zaburzeń funkcji tarczycy, ale winien być wspomagany solidnym wywiadem, badaniem klinicznym i oznaczeniem hormonów tarczycy. Jeśli wynik laboratoryjny odbiega od stanu klinicznego należy przeanalizować ponownie problem i ponowić oznaczenie hormonalne, aby nie narazić pacjenta na niewłaściwe leczenie.

### 8-W-4 Diagnostyka laboratoryjna hiperkortycyzmu

Monika Buziak-Bereza

Katedra i Klinika Endokrynologii, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

Nadmiar kortyzolu w surowicy krwi prowadzi do klinicznego ujawnienia się tzw. zespołu Cushinga. Najczęstszą przyczyną hiperkortycyzmu jest przewlekłe podawanie GKS w leczeniu objawowym wielu chorób np. z autoagresji. Mamy wtedy do czynienia z tzw. egzogennym zespołem Cushinga (polekowym, jatrogennym). Wszystkie pozostałe przyczyny wiodące do nadmiernej syntezy kortyzolu przez nadnercza, określa się mianem endogennego zespołu Cushinga (ZC). Biorąc pod uwagę etiologię endogennego ZC wyróżniamy dwie jego postaci: ACTH-zależny ZC (nadprodukcja ACTH przez guz przysadki – choroba Cushinga, ektopowa produkcja ACTH rzadziej CRH przez guz np. płuca lub trzustki) oraz ACTH-niezależny ZC wynikający z nadprodukcji kortyzolu

przez guz nadnercza (gruczolak/rak). Do klinicznych objawów ZC należą m.in.: otyłość centralna, zaniki mięśni kończyn dolnych i górnych, ścieczenie skóry, rumień twarzy, szerokie, żywoczerwone rozstępy na skórze, trądzik, hirsutyzm, łatwe tworzenie się siniaków, podwyższone ciśnienie tętnicze, zaburzenia gospodarki węglowodanowej, zwiększona skłonność do infekcji.

Wysunięcie podejrzenia hiperkortycyzmu stanowi duże wyzwanie dla lekarzy klinicyistów i diagnostów. Po pierwsze – potwierdzenie lub wykluczenie choroby, a po drugie – ustalenie jej przyczyny. Oba te trudne zadania rozstrzyga się głównie w oparciu o analizę badań hormonalnych, a szczególnie interpretację wyników testów diagnostycznych. Za badania przesiewowe w kierunku hiperkortycyzmu uważa się: krótki test hamowania z 1 mg dexametazonu, oznaczenie stężenia kortyzolu w surowicy lub w ślinie o godz. 23-24.00 oraz dobowe wydalenie wolnego kortyzolu w moczu. Ustalenie przyczyny ZC opiera się w pierwszej kolejności na ozna-

czeniu porannego stężenia ACTH. Bardzo niskie lub nieoznaczalne ACTH (<5 pg/ml) przemawia za ACTH-niezależnym ZC i nakazuje poszukiwanie przyczyny choroby w nadnerczach. Stężenie ACTH w granicach 10-20 pg/ml może wskazywać na ACTH-zależny ZC. Konieczne jest wtedy wykonanie testu hamowania z 8 mg dexametazonu. Do różnicowania w obrębie ACTH- zależnych ZC najbardziej przydatnym testem jest test z CRH. W chorobie Cushinga po podaniu CRH obserwuje się większy niż u ludzi zdrowych wzrost stężenia ACTH i kortyzolu w surowicy krwi, czego nie ma w ektopowym ACTH- zależnym ZC. Kierując pacjenta do badań hormonalnych konieczne jest wnikliwe przeanalizowanie sytuacji klinicznej w aspekcie występowania czynników, które mogłyby wpłynąć na fałszywie dodatni lub fałszywie ujemny wynik badania, zarówno w okresie przedlaboratoryjnym, jak i laboratoryjnym, co sprawi, że proces diagnostyczny będzie podążał we właściwym kierunku.



## Sesja 9

### Glikozylacja – znaczenie diagnostyczne

#### 9-W-1

#### Znaczenie glikozylacji w zdrowiu i w chorobie

Lech Chrostek (1), Bogdan Cylwik (2)

(1) Zakład Diagnostyki Biochemicznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, (2) Zakład Laboratoryjnej Diagnostyki Pediatricznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Większość białek obecnych we krwi jest *de facto* glikoproteinami. Przyłączanie struktur węglowodanowych do białka odbywa równoległe lub po zakończeniu translacji. Obecność węglowodanów ma ogromne znaczenie dla końcowej aktywności białka/glikoproteiny będąc podstawą do wyodrębnienia glikoform, które przybierają postać izoform bądź izoenzymów o zróżnicowanej funkcji i aktywności biologicznej. Zauważając wpływ obecności reszt cukrowych na strukturę i funkcję glikoprotein (a także innych związków, np. lipidów) jako jeden z działów glikobiologii wyodrębniono glikomikę a część cukrową zawartą w strukturach białek i lipidów nazwano glikomem. Opracowano wysokospecjalistyczne techniki badawcze umożliwiające ocenę zawartości i składu części cukrowej glikoprotein i glikolipidów. Glikozylacja białek i lipidów zachodzi w sposób ciągły, zarówno w zdrowiu jak i w chorobie. Przy czym, w przebiegu niektórych chorób zmiany N- lub O-glikozylacji mogą być na tyle charakterystyczne, że stają się patognomoniczne dla choroby lub mogą nawet być związane z zaawansowaniem lub dynamiką procesu chorobowego. Stosując odpowiednią technikę można więc określić glikom w stanie zdrowia oraz jego zmiany w chorobie. Do najbardziej charakterystycznych i znanych zmian glikozylacji białek należą występowanie izoform ubogowęglowodanowych transferyny (CDT) w nadużywaniu alkoholu oraz zmiany glikozylacji IgG (w tym przypadku galaktozylacji) w przebiegu reumatoidalnego zapalenia stawów. Znane są i wykorzystywane do celów diagnostycznych testy umożliwiające wykrycie zmian glikozylacji białek w chorobach wątroby, w tym zwłóknieniu (*GlycoFibroTest*), w marskości (*GlycoCirrhoTest*) i w nowotworach (*GlycoHCCTest*). Najczęściej opisywanymi w literaturze białkami podlegającymi zmianom glikozylacji są: transferyna,  $\alpha$ 1-kwaśna glikoproteina,  $\alpha$ 1-antytrypsyna, ceruloplazmina,  $\alpha$ -fetoproteina, immunoglobuliny.

#### 9-W-2

#### Profil glikozylacji transferyny w chorobach wątroby

Ewa Gruszewska (1), Monika Gudowska (1), Bogdan Cylwik (2), Anatol Panasiuk (3), Robert Flisiak (3), Lech Chrostek (1)

(1) Zakład Diagnostyki Biochemicznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, (2) Zakład Laboratoryjnej Diagnostyki Pedia-

trycznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, (3) Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Schorzenia powodujące uszkodzenie wątroby są jednym z istotnych problemów współczesnej medycyny. Niezależnie od etiologii zaistnienie czynnika uszkadzającego może doprowadzić do pogłębiającego się i trwałego uszkodzenia miększu wątroby, a w konsekwencji do przebudowy marskiej tego narządu. Stan czynnościowy wątroby jest niezwykle ważny, gdyż determinuje wszystkie niezbędne składniki w procesie syntezy białek, jak i ich ko- i posttranslacyjnej modyfikacji. W ten sposób wpływa na prawidłową aktywność biologiczną białek. To właśnie w wątrobie zachodzi synteza większości glikoprotein osocza krwi. Do przeprowadzenia badań wybrano transferynę, która ze względu na swoją dużą mikroheterogenność (9 sjalowanych izoform) może posłużyć do analizy profilu N-glikoform w chorobach wątroby. Celem podjętych badań było określenie profilu izoform transferyny w surowicy pacjentów z chorobami wątroby o różnej etiologii (marskością alkoholową – MA i niealkoholową – MNA, zapaleniem toksycznym – TH oraz wirusowymi zapaleniami wątroby typu B i C – HBV i HCV). Profil izoform transferyny został określony metodą elektroforezy kapilarnej z użyciem zestawu Minicap CDT (Sebia, Francja), który umożliwia rozdział na 5 głównych frakcji: a-, di-, tri-, tetra- i pentasjalotransferynę. Każdy z pacjentów miał wykonaną biopsję wątroby w celu oceny stopnia aktywności zapalnej choroby (grading) i stopnia zwłóknienia wątroby (staging). Stężenie disjalotransferyny było istotnie wyższe u pacjentów z TH, a stężenie trisjalotransferyny u pacjentów z MA i MNA w porównaniu do osób zdrowych. U pacjentów z wirusowymi zapaleniami wątroby (WZW) stężenie tetrasjalotransferyny było istotnie wyższe, a pentasjalotransferyny istotnie niższe niż w grupie kontrolnej. Stężenia di-, tri- i tetrasjalotransferyny wykazywały istotne różnice pomiędzy chorobami wątroby. Stężenie disjalotransferyny było istotnie wyższe u pacjentów z TH niż u tych z MNA, a stężenie trisjalotransferyny istotnie niższe u pacjentów z TH niż u tych z MA i MNA. Z kolei stężenie tetrasjalotransferyny było istotnie wyższe u pacjentów z TH i MNA w porównaniu do tych z MA. Analiza statystyczna wykazała, że stężenia tri-, tera- i pentasjalotransferyny różniły się w zależności od klasyfikacji Childa-Pugh. Natomiast u pacjentów z WZW tylko stężenie trisjalotransferyny różniło się w zależności od aktywności zapalnej (zapalenie wrotne/około wrotne i śródzrakikowa degeneracja) oraz stopnia zwłóknienia wątroby.

Przeprowadzone badania wskazują, że zaburzenia glikozylacji w chorobach wątroby są faktem i mogą odgrywać istotną rolę w patogenezie, progresji i diagnostyce chorób tego narządu. Badanie profilu glikozylacji transferyny nie tylko poszerza diagnostykę kliniczną chorób wątroby, ale także pozwala monitorować progresję i regresję choroby w sposób nieinwazyjny.

### 9-W-3

#### **Kwas sjałowy oraz izoformy transferyny jako wskaźniki zburzeń glikozylacji w chorobach trzustki**

*Bogdan Cywlik (1), Ewa Gruszevska (2), Monika Gudowska (2), Karina Lipartowska-Klimuk (1), Bogusław Kędra (3), Maciej Szmitkowski (2), Lech Chrostek (2)*

(1) Zakład Laboratoryjnej Diagnostyki Pediatricznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, (2) Zakład Diagnostyki Biochemicznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, (3) Klinika Chirurgii Ogólnej i Gastroenterologii, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Glikozylacja jest najczęściej występującą kotranslacyjną i posttranslacyjną modyfikacją białek. Polega ona na przyłączeniu wiązaniem glikozydowym reszt węglowodanowych do łańcucha polipeptydowego białka i przekształceniu go w glikoproteinę. Jest to proces uporządkowany, złożony, zależny od enzymów i miejscowo specyficzny. Składnik węglowodanowy w typowych glikoproteinach stanowi co najmniej 20% masy cząsteczki. W reakcjach glikozylacji zazwyczaj uczestniczą heksozy i ich pochodne: mannoza, galaktoza, N-acetyloglukozoamina, N-acetylogalaktozoamina oraz różnego rodzaju kwasy sjałowe. Wszystkie glikoproteiny osocza, płynów tkankowych, śluzu i błon komórkowych powstają przez glikozylację odpowiednich prekursorów w retikulum endoplazmatycznym szorstkim (RER) (N-glikozylacja) i w aparacie Golgiego (O-glikozylacja). Glikoproteiny wykazują znaczną mikroheterogenność części cukrowej i dlatego występują w różnych formach molekularnych (izoformach). W stanie fizjologicznym ustroju współdział występowania tych izoform jest względnie stały, natomiast w chorobach organizmu ulega wyraźnym zmianom.

Celem badań było określenie stężenia kwasu sjałowego i ocena profilu izoform transferyny w surowicy pacjentów z chorobami trzustki, tj. ostrym i przewlekłym zapaleniem oraz pierwotnym nowotworem tego narządu. Rozpoznanie dokonano w oparciu o badania podmiotowe, przedmiotowe i laboratoryjne. Chorych z zapaleniami podzielono z uwagi na etiologię tych zapaleń (kamica i alkoholizm), a z nowotworem – ze względu na lokalizację guza i stopień zaawansowania klinicznego. Transferyna jest glikoproteiną o dużej mikroheterogenności (różny stopień usjałowienia części oligosacharydowej) i dlatego stanowi dobry model do oceny zaburzeń N-glikozylacji. Profil izoform transferyny składa się z 5-ciu podstawowych frakcji zawierających od 2 do 6-ciu reszt kwasu sjałowego, przy czym wszystkich glikoform może być 9. Całkowite stężenie kwasu sjałowego (TSA) oznaczano metodą enzymatyczną, a profil izoform transferyny – metodą elektroforezy kapilarnej z użyciem zestawu Minicap CDT (Sebia, Francja). Technika ta pozwala na rozdział 5-ciu frakcji: asjało-, disjało-, trisjało-, tetrasjało- i pentasjało-Tf.

Wykazano, iż całkowite stężenie TSA było istotnie wyższe w ostrym (OZT) i przewlekłym zapaleniu trzustki (PZT) oraz w pierwotnym raku trzustki (NW) w porównaniu do wartości w grupie kontrolnej. W obrębie chorób trzustki, stężenie TSA było wyższe w OZT niż w PZT i NW. Wysoka moc diagnostyczna TSA w zapaleniach

trzustki wskazuje na możliwość wykorzystania tego kwasu do celów diagnostycznych. W profilu izoform transferyny, stężenie disjało-Tf było znamienne wyższe, a pentasjało-Tf – znacząco niższe u pacjentów z OZT i PZT w porównaniu do osób zdrowych. W grupie z NW, stężenie tetrasjało-Tf było istotnie wyższe, a pentasjało-Tf – znamienne niższe w porównaniu do grupy kontrolnej. W chorobach trzustki, stężenie disjało-Tf w OZT i PZT było istotnie wyższe niż w NW, a poziom tetrasjało-Tf wykazywał znaczący wzrost w NW w porównaniu do OZT i PZT. Stężenie disjało-Tf w OZT i PZT pochodzenia alkoholowego było znamienne wyższe, a tetrasjało-Tf – istotnie niższe w porównaniu do zapaleń o etiologii kamiczej. Moc diagnostyczna disjało-Tf w PZT była bardzo dobra, a w OZT dobra, natomiast pentasjało-Tf – dostateczna we wszystkich schorzeniach trzustki.

Przesunięcia w obrazie izoform transferyny i zmiany stężenia kwasu sjałowego wskazują, iż w chorobach trzustki dochodzi do upośledzenia procesu N-glikozylacji. Może to mieć istotne znaczenie w patogenezie schorzeń tego narządu. Kwas sjałowy oraz izoformy transferyny mogą być wskaźnikami zaburzeń N-glikozylacji w chorobach trzustki i może to być wykorzystane do celów diagnostycznych.

### 9-W-4

#### **Zaburzenia glikozylacji transferyny w chorobach reumatycznych**

*Monika Godowska (1), Ewa Gruszevska (1), Bogdan Cywlik (2), Ewa Gindzińska-Sieskiewicz (3), Stanisław Sierakowski (3), Lech Chrostek (1)*

(1) Zakład Diagnostyki Biochemicznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, (2) Zakład Laboratoryjnej Diagnostyki Pediatricznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, (3) Klinika Reumatologii i Chorób Wewnętrznych, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Wczesna diagnostyka ma kluczowe znaczenie dla poprawy jakości życia pacjentów z chorobami reumatycznymi, u których oprócz układu kostno-stawowego zmiany mogą dotyczyć również skóry, serca, płuc, układu nerwowego i nerek. Chorobom reumatycznym zazwyczaj towarzyszy przewlekły proces zapalny którego konsekwencją jest zmiana stężenia białek ostrej fazy oraz profilu glikozylacji białek osocza. W związku z tym, iż istnieje ścisły związek pomiędzy strukturą białek a ich funkcją, zmiany glikozylacji wpływają na ich właściwości farmakokinetyczne i efektorowe. Najczęściej badanym zaburzeniem glikozylacji białek jest defekt immunoglobuliny G (IgG) charakteryzujący się zmniejszeniem ilości galaktozy, obecności dodatkowej N-acetyloglukozoaminy i zwiększeniem zawartości fukozy. Patogeneza chorób reumatycznych jest, jednak także związana ze zmianą glikozylacji białek takich jak: fibronektyna,  $\alpha$ 1-kwasna glikoproteina, haptoglobina oraz transferyna.

Transferyna, jako klasyczny model N-glikoprotein posiada dwa miejsca N-glikozylacji, do których przyłączone są łańcuchy oligosacharydowe zakończone kwasem sjałowym co wpływa na jej mikroheterogenność (9 sjałowanych izoform: od asjało- do okta-sjałotransferyny). Przeprowadzone do tej pory badania oceniające

stężenie izoform transferyny świadczą o zaburzeniach glikozylacji tego białka m.in. w reumatoidalnym zapaleniu stawów, twardzinie układowej oraz toczniu rumieniowatym układowym. Wykazano, że stężenie trisjalo- oraz pentasjalo-transferyny u pacjentów z ww. chorobami jest istotnie niższe w porównaniu z osobami zdrowymi. Jednocześnie pacjenci z chorobami reumatycznymi mieli znacznie wyższe stężenie tetrasjalo-transferyny w stosunku do grupy kontrolnej. Ponadto, stężenie trisjalo-transferyny koreluje ze wskaźnikiem aktywności choroby (DAS 28) w reumatoidalnym zapaleniu stawów. Dowiedziono również, że pacjenci z chorobami reumatycznymi mają znacznie wyższe w porównaniu z osoba-

mi zdrowymi stężenie względne transferyny ubogowęglowodanowej, stanowiącą sumę a-, mono- oraz disjalo-transferyny. Odnosząc się do otrzymanych wyników dotyczących zmian stężenia poszczególnych izoform transferyny można wnioskować, że w chorobach reumatycznych występują zaburzenia stopnia usjaloowania glikoprotein.

Przydatność oceny profilu glikozylacji w diagnostyce chorób reumatycznych wymaga jeszcze wielu dodatkowych badań, ale wydaje się, że będą one cennym uzupełnieniem diagnostyki tych schorzeń, zwłaszcza w połączeniu z markerami klasycznymi, np. anty-CCP czy RF.

## Sesja 10

### Laboratoryjna transfuzjologia medyczna

#### 10-W-1

#### Zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu E – sytuacja epidemiologiczna oraz metody diagnostyczne

*Piotr Grabarczyk, Ewa Sulkowska*

Zakład Wirusologii Instytutu Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

Epidemiologia i znaczenie kliniczne. Dotychczas zidentyfikowano 7 genotypów wirusa zapalenia wątroby typu E (HEV). Najwięcej wiadomo o genotypie 1 rozpowszechnionym w krajach azjatyckich i szerzących się tzw. drogą „brudnych rąk”. Szacuje się, że przede wszystkim ta forma polimorficzna wirusa jest odpowiedzialna co roku za 20 milionów zakażeń, w tym blisko 3 miliony przypadków ostrego wirusowego zapalenia wątroby; w około 70 000 przypadków dochodzi do zgonów. Od niedawna wiadomo, że w krajach rozwiniętych szerzą się zakażenia genotypem 3, którego źródłem są przede wszystkim świnie. Częstość anti-HEV IgG waha się od 5% w Anglii do 56% w pld-zach Francji. Ostatnio przeprowadzone badania na reprezentatywnej grupie krwiodawców wykazały wysoką, w porównaniu do innych krajów częstość anti-HEV IgG w Polsce. Marker ten wykryto o 43,5% spośród 3000 dawców – częstość wahała się od 30% na Podlasiu do 61% w Wielkopolsce. U dawców oprócz markerów przebytego zakażenia identyfikowano także RNA, podtyp 3e i 3i (częstość 1/2.200 donacji).

Znaczenie kliniczne zakażeń genotypem 3 HEV nie jest w pełni poznane jednak wiadomo, że niektórym przypadkom ostrego zakażenia może towarzyszyć uszkodzenie oraz pogorszenie funkcji wątroby, zaś przewlekłe zakażenia mogą prowadzić do rozwoju marskości wątroby (głównie u chorych z deficytami odporności). Obserwacje z niektórych krajów europejskich wskazują, że nawet u 10-15% chorych hospitalizowanych z powodu uszkodzenia wątroby o niejasnej etiologii stwierdzano zakażenie HEV. Do najbardziej narażonych na powikłania związane z zakażeniem HEV zalicza się chorych po przeszczepach narządów unaczynionych oraz szpiku, z chorobami limfoproliferacyjnymi, poddawanych chemioterapii i leczeniu immunosupresyjnemu oraz osoby z przewlekłymi chorobami wątroby. Zakażenie HEV w tych populacjach może nie tylko powodować ostre uszkodzenie wątroby, potencjalnie prowadzące do jej niewydolności oraz zgonu, lecz również indukować odrzucanie przeszczepu, czy też przechodzić w fazę przewlekłą prowadzącą do postępującego włóknienia i marskości wątroby. Należy również podkreślić, że ostre uszkodzenie wątroby w przebiegu zakażenia HEV często rozpoznawane jest jako polekowe uszkodzenie wątroby. Postawienie nieprawidłowej diagnozy może opóźnić lub nawet uniemożliwić podanie leków przeciwnowotworowych (chemioterapia, leczenie biologiczne) oraz doprowadzić do progresji choroby podstawowej.

Diagnostyka. Badania w kierunku HEV są trudno dostępne w Polsce. O ile badanie swoistych przeciwciał w klasie IgM pozwala na zdiagnozowanie większości ostrych przypadków zakażenia HEV u osób immunokompetentnych, to u pacjentów z deficytami odporności konieczne jest stosowanie metod biologii molekularnej (NAT) do wykrywania RNA HEV. Dostępny standard międzynarodowy WHO, umożliwia miarodajne porównywanie czułości testów NAT oraz wyrażanie wyników badania RNA w IU/ml. W przypadku testów serologicznych nie opracowano dotychczas wystandaryzowanego materiału referencyjnego, w związku z tym porównywanie czułości i swoistości testów jest dużo trudniejsze. Wiadomo jednak, że testy dostępne na rynku istotnie różnią się w zakresie obu tych parametrów. Dostępne są także testy uzupełniające typu Western blot dające możliwość potwierdzenia swoistości wyników reaktywnych badań serologicznych oraz testy do wykrywania antygeny wirusa w osoczu. Czułość tej ostatniej metody jest mniejsza niż NAT, a interpretacja wyniku badania bez rezultatów analizy RNA lub/i IgM jest trudna.

Podsumowanie. Niekorzystna sytuacja epidemiologiczna zakażeń HEV w Polsce oraz istotność kliniczna zakażeń (zwłaszcza u pacjentów z obniżoną odpornością) wskazują na konieczność wprowadzenia do rutynowej diagnostyki badania markerów zakażenia HEV.

#### 10-W-2

#### Niekonwencjonalne zastosowanie składników krwi w leczeniu

*Elżbieta Lachert*

Zakład Transfuzjologii Instytutu Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

W jednostkach organizacyjnych służby krwi od lat wdrażane są zarówno nowe metody pobierania krwi, jak i nowe metody jej preparatyki, umożliwiające przygotowanie bezpiecznych i skutecznych leczniczo składników krwi. Jednocześnie udowodniono, że niektóre elementy krwi otrzymane w trakcie jej preparatyki (m.in. surowica, koncentrat krwinek płytkowych, koncentrat fibrynogenu) mogą stanowić składnik niekonwencjonalnie stosowanych preparatów takich jak np.: sztuczne łyż, kleje fibrynowe lub żele płytkowe stosowane w różnych dziedzinach medycyny, a szczególnie w okulistyce i medycynie regeneracyjnej. Obecnie szczególnie duży nacisk kładzie się na przygotowywanie autologicznych preparatów, otrzymanych z krwi pacjenta, których zastosowanie znacznie zmniejsza ryzyko przeniesienia chorobotwórczych czynników zakaźnych. Dodatkowo, preparaty te szybko ulegają biodegradacji i nie wywołują reakcji alergicznych u pacjentów. Jednakże w przypadku przeciwskażeń zdrowotnych i braku możliwości pobrania autologicznej krwi, preparaty te otrzymuje się również z odpowiednio przygotowanej krwi allogenicznej.



Surowica (sztuczne łzy), otrzymana w wyniku odwirowania krwi pobranej bez antykoagulantu, stosowana jest z powodzeniem w leczeniu zespołu suchego oka, spowodowanego niewystarczającym nawilżeniem rogówki i spojówki. Jest to preparat mający istotne znaczenie dla pacjentów, którzy nie tolerują gotowych produktów leczniczych zawierających w swoim składzie także substancje konserwujące. Restrykcyjna kwalifikacja autologicznych dawców do oddania krwi powoduje, że w niektórych przypadkach nie można jej pobrać w celu przygotowania autologicznej surowicy. Przeciwwskazaniem do pobrania krwi w celu jej autologicznego zastosowania są zakażenia, niedokrwistość, zaburzenia czynności ośrodkowego układu nerwowego i choroby układu sercowo-naczyniowego. W takich przypadkach rozwiązaniem może być stosowanie krwi allogenicznej. Krople allogeniczne (zgodne w układzie AB0) stosowane są u pacjentów z ostrymi uszkodzeniami powierzchni oka, u których wystąpiła oporność na konwencjonalne metody leczenia. Na podstawie oceny klinicznej stwierdzono, że skuteczność leczenia zespołu suchego oka przy użyciu allogenicznej surowicy jest porównywalna ze skutecznością stosowania surowicy autologicznej.

Kolejnym preparatem tkankowym, mającym szerokie zastosowanie jest klej fibrynowy. Preparat ten składa się z: roztworu zawierającego fibrynogen, czynnik XIII, fibronektynę i plazminogen (I) oraz z roztworu trombiny (II). Mechanizm działania kleju fibrynowego jest imitacją końcowego etapu procesu krzepnięcia. Fibronektyna bierze udział w procesie gojenia ran, a tkankowe aktywatory plazminogenu przekształcają plazminogen w plazminę, która lizuje krzyżowe połączenia fibryny w rozpuszczalne produkty degradacji fibrynogenu. Podczas zmieszania roztworów (I i II) trombina przekształca fibrynogen w monomery fibryny. Równoczesna aktywacja czynnika XIII (pod wpływem trombiny) powoduje stabilizację krzyżowych wiązań monomerów fibryny. Klej fibrynowy stosowany jest m.in. jako środek uszczelniający szwy chirurgiczne w przypadku konieczności szczelnego zamknięcia naczynia, w celu klejenia mięszu w chirurgii nerek, wątroby, śledziony lub trzustki oraz w szerokim zakresie w medycynie regeneracyjnej.

Lecnicze właściwości czynników wzrostu wykorzystywane są podczas stosowania żelu płytkowego, który składa się z dwóch komponentów: osocza bogatopłytkowego lub koncentratu krwinek płytkowych (I) oraz roztworu trombiny (II). W czasie aplikacji żelu, krwinki płytkowe pod wpływem trombiny ulegają aktywacji, w wyniku której dochodzi do szybkiego uwalniania z ziarnistości gęstych i z ziarnistości alfa wielu aktywnych leczniczo czynników wzrostu, takich m.in. jak: naskórkowy czynnik wzrostu (EGF), czynnik wzrostu fibroblastów (FGF), płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF), transformujący czynnik wzrostu (TGF), insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF) i naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF). Te polipeptydowe czynniki wzrostu i różnicowania przyspieszają proces gojenia ran, regulują proliferację, chemotaksję oraz biorą udział w różnicowaniu i metabolizmie komórek. Stosowanie czynników wzrostu pochodzenia płytkowego ma na celu spotęgowanie fizjologicznej odpowiedzi, jaka zachodzi podczas gojenia się rany. Z tego względu żel płytkowy stosowany jest przede wszystkim w przypadku trudno gojących się ran (np. stopa cukrzycowa, owrzodzenia podudzi).

## 10-W-3 Leukoredukcja i jej znaczenie w transfuzjologii

Jolanta Antoniewicz-Papis

Zakład Transfuzjologii Instytutu Hematologii

Transfuzjologii, Warszawa

Leukocyty zawarte w krwi i jej składnikach stosowanych w lecznictwie, mogą być odpowiedzialne za występowanie niepożądanych reakcji poprzetoczeniowych. Usuwanie leukocytów zaczęto stosować w latach 80. XX wieku. Pojawienie się doniesień na temat możliwości przeniesienia wariantu choroby Creutzfeldta-Jakoba (vCJD) drogą transfuzji, brak możliwości detekcji prionów oraz przypuszczenia, że stosowanie ubogoleukocytarnych składników może zapobiegać potransfuzyjnemu vCJD, spowodowało wprowadzenie w roku 1998 w niektórych krajach powszechnej leukoredukcji. Obecnie prowadzi ją 19 krajów, a pozostałe stosują w ograniczonym zakresie.

Stosowanie leukoredukcji usuwa od 40% do 70% prionów. Ze względu na to, że priony nie są przenoszone wyłącznie z leukocytami, obecnie do ich usunięcia z krwi do przetoczenia stosowane są specjalne filtry wykorzystujące zjawisko powinowactwa.

Leukoredukcja jest stosowana przede wszystkim w celu zapobiegania niehemolitycznym reakcjom gorączkowym (NHRG). Jednocześnie oceniając podejrzenie wystąpienia NHRG należy wykluczyć inne reakcje poprzetoczeniowe.

Leukoredukcja umożliwia także zapobieganie przeniesieniu przez przetoczenie wirusa cytomegalii u pacjentów, którzy wcześniej nie byli poddani ekspozycji na wirus. Uważa się, że stosowanie uboleukocytarnych składników równie skutecznie zapobiega przeniesieniu zakażenia, co przetaczanie składników otrzymywanych od dawców CMV ujemnych.

W odniesieniu do koncentratów krwinek płytkowych (KKP) można mówić o korzyściach płynących z leukoredukcji do zapobiegania alloimmunizacji antygenami HLA i HPA oraz zapobiegania oporności na przetoczenia krwinek płytkowych.

Szacuje się, że ok. 70% przypadków występowania oporności na przetoczenia KKP wynika z innych przyczyn niż alloimmunizacja wywołana przez leukocyty zawarte w składnikach krwi.

Natomiast na podstawie analizy światowego piśmiennictwa stwierdzono, że w chwili obecnej nie ma jednoznacznych dowodów wspierających lub odrzucających powszechną leukoredukcję u wszystkich pacjentów otrzymujących koncentraty krwinek czerwonych (KKCz).

W krajach, które wprowadziły powszechną leukoredukcję brak jest jednoznacznych dowodów znacząco wspierających takie postępowanie.

Na podstawie silnie udokumentowanych badań, można stwierdzić, że usuwanie leukocytów zapobiega, niehemolitycznym reakcjom gorączkowym, alloimmunizacji antygenami HLA i HPA, oporności na przetoczenia krwinek płytkowych wynikającej z obecności przeciwciał anty HLA i anty HPA, przeniesieniu wirusa cytomegalii. Obecnie ubogoleukocytarne składniki krwi wskazane są do stosowania:

- u pacjentów, u których wystąpiły co najmniej dwie NHRG,
- u kandydatów do przeszczepienia krwiotwórczych komórek macierzystych oraz większości narządów,
- u pacjentów po przeszczepieniach,
- u pacjentów wymagający licznych transfuzji (zwłaszcza KKP),
- do transfuzji dopłodowych i u noworodków,
- w celu zapobiegania przeniesienia CMV,
- u innych chorych z upośledzeniem układu immunologicznego.

#### 10-W-4

### W jakich sytuacjach klinicznych wykonujemy badania immunohematologiczne metodami biologii molekularnej

Agnieszka Orzińska

Zakład Immunologii Instytutu Hematologii  
Transfuzjologii, Warszawa

Wprowadzenie badań opartych o analizę kwasów nukleinowych w immunohematologii stało się możliwe dzięki poznaniu podłoża genetycznego układów grupowych kodujących poszczególne swoistości antygenowe komórek krwi. Badania na poziomie genetycznym wykazały, że najczęściej za powstanie swoistości antygenowej odpowiada zmiana jednego nukleotydu (ang. *single nucleotide polymorphism* – SNP). Stąd do badania antygenów na poziomie DNA najpowszechniej wykorzystywane są techniki wykrywające polimorfizmy jednonukleotydowe oparte na reakcji łańcuchowej polimerazy (ang. *polymerase chain reaction* – PCR) z użyciem starterów lub sond swoistych dla alleli. Już od połowy lat 90-tych badania molekularne stosowano powszechnie do identyfikacji antygenów płytek i granulocytów, ze względu na trudności, jakie napotyka serologia w badaniach tych komórek. Od początku tego milenium metody biologii molekularnej wprowadzono także w badaniach antygenów erytrocytarnych.

Obecnie badania molekularne są stosowane w immunohematologicznych laboratoriach referencyjnych i ośrodkach wysokospecjalistycznych. Wykorzystuje się je w ustalaniu przyczyn rozbieżności oznaczeń serologicznych, uzyskiwanych w laboratoriach prowadzących rutynowe badania immunohematologiczne, a także w przypadkach, gdy laboratoria napotykają na trudności w określeniu grupy krwi lub w doborze krwi do przetoczenia. Oznaczenia genetyczne są szczególnie przydatne do identyfikacji osób z antygenem o słabej ekspresji, nie wykrywalnej metodami serologicznymi lub w identyfikacji wariantów antygenów.

Dzięki wysokiej przepustowości genetyczne badania przeglądowe ułatwiają poszukiwania dawców „antygenowo ujemnych” oraz tworzenie rejestrów dawców o oznaczonych antygenach płytek i granulocytów lub o rzadkich fenotypach antygenów krwinki czerwonej dla chorych zimmunizowanych.

Badania molekularne są niezastąpione w nieinwazyjnej diagnostyce grup krwi płodu u kobiet z ryzykiem wystąpienia konfliktu serologicznego poprzez badanie wolnokrążącego DNA dziecka wyizolowanego z osocza ciężarnej.

Dzięki szybkiemu rozwojowi ogólnodostępnych baz alleli, genotypów i powiązanych z nimi fenotypów biologia molekularna

staje się wysoko wiarygodnym narzędziem przydatnym klinicznie i współodpowiedzialnym za diagnostykę serologiczną.

#### 10-W-5

### Automatyzacja badań w immunohematologii – tak, ale....

Beata Wojciechowska

Zakład Immunologii Instytutu Hematologii  
Transfuzjologii, Warszawa

(nie nadesłano streszczenia)

#### 10-W-6

### Badania przeglądowe i diagnostyczne w kierunku konfliktu HPA -1a w Polsce

Katarzyna Guz, Małgorzata Uhrynowska

Zakład Immunologii Instytutu Hematologii  
Transfuzjologii, Warszawa

Głęboka małopłytkowość (gm; <50 tys. G/L płytek) u noworodków występuje z częstością 15/10000. W około 1/3 przypadków (4/10000) jej przyczyną są matczyne alloprzeciwciała (p-1a), tworzone w wyniku konfliktu płytkowego, najczęściej w antygenie HPA-1a (ok. 85%). W ok. 30% przypadków gm prowadzi do wylewu do ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Choroba ta – alloimmunologiczna małopłytkowość płodów/novorodków (AIMPN) – może wystąpić już w pierwszej ciąży, lecz zwykle diagnozuje się ją dopiero po wystąpieniu objawów klinicznych u płodu/novorodka (ustala się swoistość przeciwciał anti-HPA u matki i niezgodność genotypu HPA matki z ojcem/dzieckiem). Każda kobieta z diagnozą AIMPN otrzymuje wytyczne o wskazaniach transfuzjologicznych i zagrożeniu AIMPN w kolejnej ciąży. AIMPN z powodu konfliktu HPA-1a powinno diagnozować się w Polsce u 300 noworodków, w tym u ok. 90 dzieci z wylewem do OUN, lecz obecnie rozpoznaje się ją w pojedynczych przypadkach. W związku z trwającymi pracami nad wprowadzeniem immunoprofilaktyki konfliktu HPA-1a w ramach programu PREVFNAIT, IHiT opracował system masowych badań przeglądowych antygeny HPA-1a dla identyfikacji cięż kobiet zagrożonych AIMPN. Badania przeprowadzono w grupie 24 259 kobiet w 8-40 tyg ciąży z terenu całego kraju. Antygen HPA-1a oznaczano metodą serologiczną (FACS) lub molekularną (RQ-PCR) – wybór zależał od czasu pobrania krwi. Obie metody zautomatyzowano, co umożliwiło ich masowe stosowanie. Zidentyfikowano 598 kobiet HPA-1a ujemnych (2.4%) i tej grupie badano p-1a w 4x w czasie ciąży i 6 tyg po porodzie, genotypowano HPA-1 ojca dziecka, HPA-1a płodu z osocza matki i zebrano informacje o stanie klinicznym noworodków. Obecność i aktywność przeciwciał anti-HPA-1a badano testem MAIPA oraz testem PAKLx (gdy u dziecka wystąpiła gm a test MAIPA był ujemny). P-1a anti-HPA-1a wykryto u 11% kobiet (26/10000). U 19/40 kobiet z przeciwciałami obecnymi w ciąży i z aktywnością p-1 anti-HPA-1a >20U/ml włączono leczenie prenatalnie (IVIg/steroidy): gm tylko u 2/19 noworodków. Reszty kobiet nie leczono (niski poziom p-1 w ciąży i/lub p-1a dopiero po porodzie): gm u 2/44 dzieci. U pozostałych matek 397 dzieci

wyniki MAIPA były ujemne: gm u 2/397 dzieci (u 1 p-ła anty-HPA-1a wykrywane tylko testem PakLx).

Program PREVFNAIT badań zwiększył wiedzę lekarzy i pacjentek o AIMPN – obserwowaliśmy wzrost liczby przypadków kierowanych do diagnostyki z powodu gm i/lub wylewu do OUN u noworodków. Mogłyby być one leczone prenatalnie, gdyby matki były objęte programem PREVFNAIT.

## Sesja 11

### Medycyna personalizowana – połączenie diagnostyki z terapią

#### 11-W-1

#### Medycyna personalizowana – dziś i jutro

Zbigniew Gaciong

Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Nadciśnienia Tętniczego i Angiologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Współczesna praktyka medyczna posługuje się zasadami medycyny opartej na faktach (EBM; *evidence-based medicine*), która za podstawę do podejmowania decyzji uważa wyniki dużych, kontrolowanych badań klinicznych. Bez wątpienia, przyjęcie zasad EBM, gdzie wnioski z badań przekładają się na zestawy konkretnych zaleceń, ułatwia postępowanie lekarzowi-praktykowi. Jednak z tych samych badań wiemy, że większość leków jest skutecznych jedynie u 40-60% pacjentów, a około 15% chorych doświadcza działań niepożądanych leków. Czyli „średni” pacjent odnosi korzyści ale w dużej grupie chorych znajdują się osoby, które nie zyskują na niejednokrotnie kosztownej terapii lub wręcz są narażone na powikłania. Szacuje się, że w USA ponad 100 000 zgonów można wiązać z działaniami niepożądanymi stosowanych leków.

Zasada medycyny personalizowanej czyli „właściwy lek dla właściwego chorego we właściwym czasie” praktykowana jest nieomal od zarania dziejów. Już Hipokrates (V wiek p.n.e.) opierając się na teorii Empedoklesa, zalecał terapię w zależności od zaburzeń czterech podstawowych humorów organizmu. Współcześnie, medycyna personalizowana, odwołuje się do najnowszych osiągnięć biologii molekularnej i źródeł zmienności organizmów wynikających z różnic w obrębie genomu. Medycyna personalizowana pozwala na precyzyjne określenie podstawowego mechanizmu choroby w oparciu o wyjaśnienie podłoża molekularnego i dobór precyzyjnej terapii. W wielu chorobach nowotworowych wykrycie odpowiedzialnej mutacji pozwala na zastosowanie skutecznej terapii i jednocześnie rokowanie w najbardziej złośliwych guzach, takich jak czerniak, uległo znacznej poprawie dzięki zastosowaniu celowanego – odpowiednio do typu genetycznego, leczenia. Dane z roku 2016 wskazują, że prawie 1/3 nowych terapii jakie zostały wprowadzone w tym czasie, opiera się na zasadach medycyny personalizowanej i należy oczekiwać, że już wkrótce, liczba chorób objętych celowanym leczeniem znacznie się zwiększy. Współcześnie na świecie realizowane są programy badawcze, takie jak „Cancer Moonshot”, które przybliżą do poznania molekularnego podłoża wielu nowotworów. Poszukuje się także genetycznych markerów pozwalających na lepszą terapię innych schorzeń, przewidywanie bezpieczeństwa leczenia czy ocenę ryzyka rozwoju chorób.

Ograniczeniem terapii celowanej mogą być postępujące zmiany w DNA komórek nowotworowych, które powodują oporność na dotychczas stosowane leki, również znamy bardzo mało istotnych genetycznych markerów ryzyka szeregu częstych chorób.

Bez wątpienia jednak medycyna personalizowana opiera się na precyzyjnej diagnostyce molekularnej, stąd proponuje się wprowadzenie nowego terminu – teranostyka (teradiagnostyka) od połączenia słów „terapia” i „diagnostyka” celem podkreślenia znaczenia diagnostyki na poziomie molekularnym dla podejmowania właściwych decyzji terapeutycznych.

#### 11-W-2

#### Personalizowana profilaktyka nowotworów – badanie przesiewowe polskiej populacji

Krzysztof Jażdżewski

Zakład Medycyny Genomowej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Głównym celem Ogólnopolskiego Programu Oceny Ryzyka Zachorowania na Raka Piersi, Jajnika i Prostaty **BADAMYGENY.PL** jest przedstawienie pacjentom zalecanych działań ochronnych (mammografia, USG etc.) zgodnie z ich własnym ryzykiem zachorowania, co można określić na podstawie danych klinicznych i badań genetycznych. Obecnie zalecane działania profilaktyczne nie uwzględniają osobistej sytuacji konkretnego pacjenta np. obciążenia rodzinnego chorobą nowotworową. Stratyfikacja populacji zgodnie z ryzykiem kliniczno-genetycznym pozwoli na skuteczniejszą profilaktykę, również dla osób, które dzisiaj umierają przed osiągnięciem wieku, w którym typowo rozpoczynamy profilaktykę.

W Programie **BADAMYGENY.PL** proponujemy zastosowanie wieloczynnikowych modeli oceny ryzyka, które wykorzystują dane kliniczne podane przez pacjenta (wiek, liczba krewnych z chorobą, wiek urodzenia 1. dziecka, stosowane leki etc.) oraz dane dotyczące występowania mutacji w genach rekomendowanych przez NCCN (National Comprehensive Cancer Network).

U każdego uczestnika badania analizujemy 14 genów, rekomendowanych przez NCCN: ATM, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, NBN, NF1, PALB2, PTEN, RAD51C, RAD51D, STK11, TP53.

Dodatkowo, jeśli osoba badana wyrazi takie życzenie (zaznaczając to w formularzu zgody na badanie), analizujemy 56 genów, zwiększających ryzyko zachorowania na różne nowotwory: AKT1; APC; ATP9B; AXIN2; BARD1; BMPR1A; CDKN2A; CTNNA1; CYP21A2; EPCAM; EXO1; FANCC; FH; FLCN; GALNT12; GDNF; GREM1; HNF1A; HNF1B; KIF1B; MAX; MC1R; MEN1; MET; MITF; MLH1; MLH3; MRE11A; MSH2; MSH6; MUTYH; PIK3CA; PMS1; PMS2; POLD1; POLE; POT1; PRKAR1A; PRSS1; PTCH1; RET; SDHA; SDHAF2; SDHB; SDHC; SDHD; SMAD4; TGFB2; TMEM127; TSC1; TSC2; VHL; WT1; XRCC2; XRCC3. Jeśli w wymienionych 56 genach znaleziony zostanie wariant patogenny, poinformujemy o tym pacjenta i przekazemy stosowne rekomendacje profilaktyczne,



należy jednak pamiętać, że nie dla każdego genu z tej listy istnieją jednoznaczne rekomendacje towarzystw lekarskich odnośnie postępowania profilaktycznego.

Badanie jest wykonywane przy użyciu sekwencjonowania nowej generacji (NGS), dzięki czemu uzyskujemy pełne sekwencje wszystkich analizowanych genów, nie ograniczając się do wybranych loci w *tych genach*. W sumie, w analizowanych 70 genach, opisano ponad 100 tysięcy loci z patogennymi mutacjami.

W każdej rundzie badania analizujemy 600 osób (nie mniej, nie więcej). Oznacza to, że aby wykonać kolejną rundę analizy, trzeba każdorazowo zebrać 600 osób. Taka grupa umożliwi wykonanie pojedynczego badania za 399zł. Obniżenie kosztu wynika z nowatorskiej metody, w której szukając mutacji u konkretnej osoby, wykorzystujemy informację zawartą w całej puli 600 próbek.

Do oceny ryzyka zachorowania na nowotwory dziedziczne wykorzystywane będą jedynie informacje odnoszące się do znalezionych wariantów genetycznych (substytucji, punktowych delecji i insercji), określonych jako patogene i potencjalnie patogene. Stosowana metoda nie daje możliwości zidentyfikowania dużych delecji/insercji i rearanzacji badanych genów.

Program jest realizowany przez Zakład Medycyny Genomowej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego oraz Warsaw Genomics, spółkę diagnostyczną UW.

### 11-W-3

#### Stan diagnostyki genetycznej w Polsce w kontekście medycyny personalizowanej – wnioski i rekomendacje

Joanna Chorostowska-Wynimko

Zakład Genetyki i Immunologii Klinicznej, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, Warszawa

Od kilku lat jesteśmy świadkami wręcz rewolucyjnych zmian w farmakoterapii guzów litych, w tym raka płuca, najczęstszej przyczyny zgonów z przyczyn nowotworowych w Polsce i na świecie. Nowe metody leczenia, zarówno ukierunkowanego molekularnie, jak i immunoterapia raka płuca wymagają jednak odpowiedniej kwalifikacji chorych w oparciu o biomarkery predykcyjne, mutacje genu EGFR, rearanzacje genu ALK, a wkrótce również ekspresję białka PD-L1. Stąd też diagnostyka molekularna jest obecnie standardowym elementem procedury klinicznej u chorych kwalifikowanych do farmakologicznego leczenia raka płuca. Od 2011 jest również dostępna dla polskich chorych za sprawą kilku wysokospecjalistycznych laboratoriów w większości działających w ramach lub we współpracy z ośrodkami pulmonologicznymi lub onkologicznymi. Należy podkreślić, wysoka jakość i profesjonalizm tych ośrodków poświadczony między innymi międzynarodowymi certyfikatami jakości. Równocześnie dynamiczny wzrost liczby diagnozowanych chorych nie przekładał się na adekwatne powiększenie grupy leczonych nowoczesnymi terapiami, co w dużym stopniu wynikało ze słabej koordynacji procesów diagnostyczno-terapeutycznych w naszym kraju i dalece nieadekwatnym przepływem informacji pomiędzy kolejnymi ośrodkami sprawującymi opiekę nad chorymi. Szybki wzrost liczby badań

czynników prognostycznych został wyhamowany w bieżącym roku wraz z wprowadzeniem nowych rozwiązań refundacyjnych. Umożliwiają one co prawda znacząco korzystniejszą refundację badań molekularnych w guzach litych, w tym w raku płuca, jednak jedynie w oparciu o materiał biopsyjny pobrany w trakcie aktualnej hospitalizacji, a wykluczają materiały archiwalne, na przykład pooperacyjne. Co więcej, nowe regulacje nie nakładają żadnych wymogów jakościowych na ośrodki realizujące genetyczne procedury diagnostyczne, pomimo iż stosowne kryteria szczegółowo i przystępnie określające wymagania jakościowe dla laboratoriów zostały przygotowane w 2016 roku przez Komisję Standaryzacji Badań Molekularnych powołaną przez Konsultanta Krajowego ds. genetyki klinicznej. W efekcie szpitale odwołują kontraktację bądź wybierają najtańszego, niekoniecznie wiarygodnego oferenta, co w skojarzeniu z brakiem jakiegokolwiek systemu kontroli jakości badań genetycznych w Polsce budzi ogromny niepokój. W nowych regulacjach refundacyjnych brak również kryterium kompleksowości, co sprzyja rozdrobnieniu (każdy biomarker analizowany w innym laboratorium) i niezasadnemu wydłużeniu czasu wykonywania diagnostyki. Powyższe zjawiska należy traktować jako bardzo niepokojące, a nawet alarmujące, prowadzą bowiem do eliminacji wysokospecjalistycznych, a więc i droższych w utrzymaniu laboratoriów na rzecz działalności „prowizorycznej” i przypadkowej, a przede wszystkim znacząco ograniczają dostępność chorych do nowoczesnych terapii.

### 11-W-4

#### Wyroby medyczne do diagnostyki *in vitro* w medycynie personalizowanej – nowe regulacje w Unii Europejskiej

Józef L. Jakubiec

Izba Producentów i Dystrybutorów Diagnostyki Laboratoryjnej, Warszawa

Wyroby medyczne (MD) stosowane w ochronie zdrowie podlegają wielu regulacjom na każdym etapie ich powstawania. Od projektowania do wprowadzenia do użytkowania. Podlegają też różnej, szczegółowej kontroli w zależności od ryzyka jakie niesie ich użycie przez personel medyczny oraz rodzaju i czasu kontaktu z pacjentem. Specyficzną grupą wyrobów medycznych są wyroby medyczne do diagnostyki *in vitro* (IVD). Odrębność tej grupy wyrobów opiera się o:

– brak kontaktu z pacjentem, brak funkcji leczniczej; zastosowanie IVD pozwala otrzymać informację diagnostyczną, służącą wspieraniu decyzji i procesów profilaktycznych, leczniczych lub samokontroli.

Rozwój technologii medycznych spowodował, że przybywa wyrobów IVD, które posiadają coraz więcej odmiennych technologicznych cech odróżniających je od MD. Długo oczekiwane powstanie dwóch odrębnych regulacji, które będą obowiązywały na całym rynku EU stało się faktem.

Opublikowane w dniu 5 maja 2017 Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady Europy dla wyrobów medycznych do diagnostyki *in vitro* powoduje, że w ciągu najbliższych 5 lat (dla MD 3 lat) stanie się ono głównym regulatorem obszaru wytwarzania

i używania wyrobów medycznych IVD. Niewygodne do praktycznego stosowania połączone lub rozsiane w różnych aktach regulacji dotyczące IVD i MD utracą swoją moc.

Medycyna personalizowana, jako nowa dziedzina działalności leczniczej nie była dotychczas widoczna przez pryzmat regulacji dotyczącej wyrobów IVD. Prawno nie nadążało za szybkim rozwojem technologii medycznych. Brak regulacji podkopywał zasady równej konkurencji oraz tworzył lukę w nadzorze rynku. IVD przeznaczone do badań naukowych wchodzą w konflikt na teren działań klinicznych z wyrobami IVD dedykowanymi dla konkretnych przypadków klinicznych. Świad-

czeniodawcy w imię dobra pacjenta podejmują obarczone ryzykiem działania, stosując wyroby IVD nie spełniające określonych wymagań. Rośnie skala ryzyka, które przejmuje pacjent.

Przez najbliższe 5 lat ostrzejsze regulacje będą wypierały dotychczasowe prawo. Szacuje się, że blisko 80% wyrobów IVD znajdzie się pod nadzorem Podmiotów Notyfikowanych. Wzrost wymagań bezpieczeństwa dla IVD może spowodować spowolnienie wchodzenia na rynek wyrobów stosowanych w medycynie personalizowanej. Aby znaleźć się wśród liderów rynku wyrobów medycznych do terapii celowanej (CDx) trzeba było już dawno wystartować.

## Sesja 12

### Biochemiczna i genetyczna diagnostyka chorób układu nerwowego

#### 12-W-1

#### **Biomarkery niedokrwienia i udaru mózgu**

*Iwona Kurkowska-Jastrzębska*

II Klinika Neurologii, Instytut Psychiatrii i Neurologii,  
Warszawa

Udar jest jedną z najczęstszych przyczyn zgonu i niepełnosprawności na świecie. Dodatkowo, ryzyko ponownego udaru jest bardzo wysokie w ciągu pierwszych 5 lat po zachorowaniu. Szacuje się, że 80% nawrotów incydentów niedokrwienia można by uniknąć stosując odpowiednie strategie prewencyjne. Dotyczy to prawidłowego leczenia przeciwzakrzepowego u chorych z migotaniem przedsionków lub leczenia zwężeń objawowych tętnic szyjnych. Około 20-30% udarów powodowanych jest przez zatory pochodzenia sercowego, tyle samo przez choroby dużych naczyń, w 30% udarów nie udaje się ustalić etiologii. Udary kryptogenne pozostają nieleczone przyczynowo, choć jak pokazują badania w dużej mierze mogą być pochodzenia sercowego.

O wielu lat poszukuje się biomarkerów, które mogłyby pomóc w diagnostyce etiologii udarów niedokrwiennych. Markery zapalenia, jak np. białka ostrej fazy czy cytokiny są związane z miażdżycą dużych naczyń, ale również z udarem serc pochodnym. Zapalenie bierze udział zarówno w rozwoju miażdżycy jak również w procesach prowadzących do migotania przedsionków i tworzenia materiału zakrzepowego. W udarach niedokrwiennych niezależnie od etiologii poziom CRP jest wyższy niż u osób w podobnym wieku, które nie przebyły udaru i najwyższy w udarach serc pochodnych. Poziom homocysteiny jest również wyższy w udarach w porównaniu z osobami bez udaru w wywiadzie i najniższy w udarach serc pochodnych. Inne badane markery, jak np. czynnik von Willebrandta, selektyny P i E, VCAM-1 i ICAM-1 w ostrej fazie udaru są podwyższone, nie różnią się jednak ze względu na etiologię udaru. Oprócz markerów charakterystycznych dla etiologii udaru poszukiwane są markery, które mogłyby wskazać na zwiększone ryzyko incydentu niedokrwienego np. na niestabilność blaszki miażdżycowej. W okresie stabilizacji po udarze poziom większości markerów zapalenia i dysfunkcji śródbłonna spada lub nie różni się od wartości kontrolnych. Prawdopodobnie ocenę ich przydatności można by przeprowadzić monitorując okresowo ich poziom we krwi. Z drugiej strony niespecyficzność większości badanych markerów, ich zmiany w wielu chorobach i stanach, nie sprzyjają ich prawidłowej ocenie. Duże nadzieje związane są również z występowaniem specyficznych mikroRNA. MikroRNA są małymi cząstkami RNA regulującymi ekspresję genów na poziomie mRNA. Są wydzielane do krwi, a ich poziom lub profil kilku rodzajów mikroRNA może mieć charakterystyczny obraz w zależności od choroby lub stanu czynnościowego. Dysregulacja np. mikroRNA 21 jest związana z udarem, miażdżycą, ryzykiem migotania przedsionków i niewydolnością serca.

Obecnie nie ma dobrych biomarkerów dla udaru mózgu i procesów z nim związanych. Utrudnia to diagnostykę przyczyn udaru, nie pozwala na ocenę ryzyka nawrotu udaru czy ocenę jego rokowania. Nadzieje budzą zarówno nowe odkrycia jak np. mikroRNA jak również wielośrodkowe badania pozwalające na ocenę dużych, wyselekcjonowanych grup pacjentów.

#### 12-W-2

#### **Choroby mózgu a homeostaza wapnia**

*Jacek Kuźnicki*

Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej  
i Komórkowej, Warszawa

W związku z wydłużeniem życia ludzi zwiększa się liczba osób dotkniętych chorobami mózgu, w szczególności takimi, jak choroba Alzheimer (AD) i choroba Parkinsona (PD). Ponadto, wzrost tempa życia i ilość czynników stresowych zwiększa liczbę chorych z zaburzeniami psychicznymi. W przypadku wielu takich chorób brakuje nowych i skutecznych leków. Badania prowadzone w celu ich znalezienia są utrudnione, ponieważ z jednej strony brakuje dobrych modeli tych chorób, a z drugiej nie ma dobrych metod diagnostycznych. Do przeprowadzania badań klinicznych oraz opracowania skutecznych terapii dla chorób mózgu kluczowa jest specyficzna diagnostyka, wykraczająca poza rutynowe badania płynów fizjologicznych, np. do diagnozowania AD zaleca się stosowanie kilku typów testów, w tym MRI oraz oznaczenia poziomu trzech biomarkerów w płynie mózgowo-rdzeniowym: beta-amyloidu, ufosforylowanego oraz całkowitego tau. Poszukuje się także nowych markerów we krwi, np. cząsteczek shRNA. Na szeroką skalę prowadzi się również badania molekularne, zmierzające do identyfikacji zestawu polimorfizmów genów, które mogą predestynować do określonych chorób. Ze względu na koszty i konieczność obecności pacjenta w wyspecjalizowanym ośrodku metody takie, jak MRI i PET nie mogą zastąpić bardziej dostępnych analiz, np. krwi i płynu mózgowo-rdzeniowego.

W wielu chorobach mózgu dochodzi do zaburzenia homeostazy wapniowej wewnątrz komórek, np. mutacje w presenilinach, które wywołują rodzinną postać choroby AD (FAD) wpływają na poziom jonów wapnia w endoplazmatycznym retikulum, ich uwalnianie przez receptory IP3R oraz na napływ jonów ze środowiska zewnętrznego w procesie SOCE. Z kolei mutacje w Pink1, wywołujące rodzinną postać PD zwiększają poziom jonów wapnia w mitochondriach. Dzieje się tak najprawdopodobniej na skutek aktywacji Mitochondrialnego Uniportera Wapnia (MCU). Obserwuje się też zmianę poziomu niektórych białek, np. obniżenie białka STIM2 w AD lub podwyższenie białka MICU1 w PD. Te i inne tego typu zjawiska mogą stać się podstawą nowych metod diagnostycznych.

## Literatura

1. Bojarski Ł, Pomorski P, [...], Kuźnicki J. BBA-MCR 2009.
2. Jaworska A, Dzbek J, Styczyńska M, Kuźnicki J. BBA-MCR 2013.
3. Sun S, Zhang H, [...], Bezprozvanny I. Neuron 2014.
4. Soman S, Keatinge M, [...], Bandmann O. Eur J Neurosci 2016.
5. Majewski Ł, Kuźnicki J. BBA-MCR 2015. Review.

## 12-W-3

### Encefalopatie otępienne – wczesne i przewlekłe sygnały neurodegeneracyjne

Andrzej Szutowicz

Zakład Medycyny Laboratoryjnej, Gdański Uniwersytet Medyczny

Inhibicja metabolizmu energetycznego i utrata neuronów w rejonach mózgu objętych zmianami patologicznymi, są charakterystycznymi markerami wielu chorób neurodegeneracyjnych takich jak: choroby Alzheimera i Parkinsona, encefalopatie naczyniowe, dializacyjne, alkoholowe, wątrobowe, niedoborowe, cytotoksyczne czy też immunologiczne. Częstość tych patologii zwiększa się wraz wiekiem. Wynika to między innymi z faktu, że wiele ostrych, przemijających sygnałów neurotoksycznych w mózgu takich jak hipoglikemia, podprogowe niedotlenienia czy też ksenobiotyki wywala ekscytotoksyczność glutaminian-Zn, dyshomeostazę kationów oraz nadmierną produkcję wolnych rodników. Zmiany te, chociaż przejściowe, powodują wtórne, przewlekłe i utrwalające się zaburzenia metaboliczne i strukturalne prowadzące do nieodwracalnych zmian neurodegeneracyjnych. Preferencyjne uszkodzenie neuronów cholinergiczných jąder podstawy mózgu jest przyczyną stanów otępiennych w schyłkowych stadiach tych patologii. Wynikać to może z faktu, że neurony cholinergiczne, w odróżnieniu od innych grup neuronów, zużywają istotną frakcję głównego prekursora energetycznego – acetyl-CoA, nie tylko do syntezy ATP i N-acetylo-asparaginianu, lecz również do wytwarzania neuroprzekaźnika – acetylocholin. Nieinwazyjne techniki obrazowania mózgu za pomocą magnetycznego rezonansu jądrowego czy pozytonowej tomografii emisyjnej pozwalają na stworzenie map metabolicznych charakterystycznych dla różnych patologii. Wykrywają one dynamiczne zmiany poziomu tych i innych metabolitów, oraz akumulację różnych patologicznych białek w poszczególnych regionach mózgu dotkniętych zmianami neurodegeneracyjnymi. W tej sytuacji oznaczanie różnych markerów neurodegeneracji, chociaż dużo tańsze, dostarcza stosunkowo ograniczonych, najczęściej komplementarnych informacji. Umożliwiają one ocenę stopnia zaawansowania choroby lub/i monitorowanie efektów leczenia, mają wartość predykcyjną. I tak akumulacja amyloidu- $\beta$  i jego cytotoksycznej formy A $\beta$ 1-42 w przestrzeni pozakomórkowej mózgu i spadek jego poziomu w płynie mózgowo-rdzeniowym (PMR) mogą być wskaźnikami predykcyjnymi i diagnostycznymi w różnych postaciach choroby Alzheimera (AD), otępienia Lewy'ego czy zespołu Down'a. W połączeniu ze wzrostem poziomu białka tau i P-tau w PMR tworzy to test złożony o zadowalającej sile diagnostycznej. Może to mieć istotne znaczenie, gdy znalezione zostaną skuteczne metody leczenia AD. Analiza mutacji genów kodujących te białka iden-

fikuje rodzinne postaci AD o wczesnym początku. Porównanie różnych komórkowych i zwierzęcych modeli neurodegeneracji z danymi kliniczno-laboratoryjnymi pozwala na identyfikację możliwych mechanizmów łączących wczesne zaburzenia metabolizmu energetycznego/acetylo-CoA z późnymi stadiami encefalopatii cholinergiczných.

## 12-W-4

### Neurodegeneracja oraz markery zapalne retinopatii cukrzycowej

Katarzyna Zorena

Zakład Immunobiologii i Mikrobiologii Środowiska, Instytut Medycyny Morskiej i Tropikalnej, Gdański Uniwersytet Medyczny

W obliczu wzrostu częstości występowania cukrzycy, wzrasta liczba pacjentów z powikłaniami naczyniowymi. Przewlekłe powikłania cukrzycowe stanowią pogorszenie jakości życia jak też są główną przyczynę inwalidztwa pacjentów chorujących na cukrzycę. Pomimo zaangażowania wielu zespołów badawczych, wciąż standardowym wyznacznikiem ryzyka rozwoju retinopatii cukrzycowej są zmiany na dnie oka oraz dobowe wydalanie albuminy z moczem, uznany wskaźnik nefropatii cukrzycowej. Jednakże zmiany obserwowane na dnie oka oraz występowanie albuminurii są późnym etapem zmian patologicznych toczących się w obrębie narządu wzroku oraz nerki. W diagnostyce laboratoryjnej, istnieje coraz większa potrzeba opracowania przydatnych narzędzi wskazujących na zagrożenie rozwojem retinopatii i nefropatii pacjentów chorujących na cukrzycę. Obecnie nie ma zadowalającej terapii retinopatii cukrzycowej a metody leczenia farmakologicznego oraz terapii laserowej mają na celu ograniczenie postępującego schorzenia a nie na jej zapobiegania. Wczesne wykrycie tendencji do rozwoju retinopatii na etapie, kiedy nie są jeszcze widoczne zmiany na dnie oka, pozostają ogromnym wyzwaniem dla diagnostów, immunologów, okulistów jak też diabetologów. Złożona patogeneza retinopatii cukrzycowej nie jest w pełni wyjaśniona. Przez wiele lat uznawano, że retinopatia cukrzycowa objawia się jedynie zmianami mikronaczyniowymi i to one są w pełni odpowiedzialne za spadki widzenia u pacjentów chorujących na cukrzycę. W świetle obecnej wiedzy wiadomo, że zmiany na dnie oka o charakterze mikroangiopatii, przyczyniły się do uznania retinopatii cukrzycowej za chorobę neurodegeneracyjną. Dotychczasowe badania wykazały, że wolne rodniki tlenowe przyczyniają się do zmian immunologicznych w obrębie gleju, które towarzyszą procesom neurodegeneracji a obejmują nasilenie aktywacji komórek T oraz wzrost wydzielania czynnika martwicy nowotworu (TNF- $\alpha$ ). U pacjentów chorujących na cukrzycę typu 1 wykrycie surowiczego poziomu TNF- $\alpha$  jako niezależnego wskaźnika ryzyka rozwoju retinopatii i nefropatii cukrzycowej stanowi pierwsze próby wykazania możliwości klinicznie użytecznych dodatkowych wskaźników w przewidywaniu rozwoju mikroangiopatii cukrzycowej.



## Sesja 13

### POCT – inwolucja, rewolucja, ewolucja czy powrót do przeszłości laboratoriów medycznych

#### 13-W-1

#### **Badania laboratoryjne w oddziale intensywnej terapii – czy POCT rozwiązuje wszystko?**

Krystyn Sosada

Katedra i Oddział Kliniczny Chirurgii Ogólnej, Bariatrycznej i Medycyny Ratunkowej, Śląski Uniwersytet Medyczny

(nie nadesłano streszczenia)

#### 13-W-2

#### **Przyszłość monitorowania leczenia cukrzycy – samokontrola i POCT?**

Bogdan Solnica

Katedra Biochemii Klinicznej, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

Osiągnięcie celów leczenia cukrzycy wymaga biochemicznego monitorowania przebiegu tej choroby i skuteczności stosowanej terapii. Monitorowanie to obejmuje bieżącą i retrospektywną (głównie oznaczanie HbA<sub>1c</sub>) ocenę wyrównania gospodarki węglowodanowej, badania w kierunku cukrzycowej choroby nerek (albuminuria, eGFR) oraz profil lipidowy. Samokontrola glikemii, jako narzędzie bieżącej jej oceny, jest uznanym i rekomendowanym elementem leczenia cukrzycy, a doskonalenie glukometrów oraz wdrażanie częściowo inwazyjnych i nieinwazyjnych metod pomiaru stężenia glukozy we krwi zwiększają jej dokładność, co potwierdzają coraz bardziej restrykcyjne zalecenia, i powszechność stosowania. Pozostałe elementy monitorowania leczenia cukrzycy, jako typowe testy *in vitro* wymagają zaangażowania medycznego laboratorium diagnostycznego. Wykonywanie tych badań w laboratorium stwarza jednak ograniczenia dla optymalnej organizacji ambulatoryjnej opieki nad chorymi na cukrzycę. Wizyty w poradniach odbywają się co kilka miesięcy, więc dla bieżącej oceny stanu pacjenta lekarz powinien dysponować aktualnymi wynikami badań, które optymalnie powinny być wykonane bez potrzeby dodatkowego zgłaszania się pacjenta w celu pobrania materiału lub długotrwałego oczekiwania na wyniki badań w materiale pobranym rano w dniu wizyty. Rozwiązaniem może być wykonywanie tych badań w laboratorium, w dniu wizyty w trybie pilnym, z zachowaniem optymalnego czasu oczekiwania na wynik (TAT) lub wykonywanie ich w poradni / gabinecie lekarskim, w trybie POCT. To drugie rozwiązanie może być szczególnie użyteczne dla placówek nieposiadających laboratorium w pobliżu. Metody oznaczania HbA<sub>1c</sub> w trybie POCT, technologicznie zbliżone do metod laboratoryjnych, są używane od dawna i ich charakterystyka analityczna jest uważana za wystarczającą dla

potrzeb monitorowania, ale nie rozpoznawania cukrzycy. Metody te są certyfikowane w amerykańskim *National Glycohemoglobin Standardization Program* (NGSP). Również część metod ilościowego oznaczania stężenia albuminy w moczu, w tym wskaźnika albumina/kreatynina, jest wystarczająco dokładnych dla oceny albuminurii. W trybie POCT nie da się wykonać badania pełnego profilu lipidowego, możliwe jest oznaczenie tylko stężenia cholesterolu całkowitego i triglicerydów. Oznaczanie HbA<sub>1c</sub> i albuminurii w trybie POCT może poprawić efektywność i komfort ambulatoryjnej opieki nad chorymi na cukrzycę. Jednak, podstawowe problemy POCT, szkolenie użytkowników analizatorów oraz wewnętrzna i zewnętrzna kontrola jakości badań, są w tym przypadku jeszcze trudniejsze.

#### 13-W-3

#### **Oznaczanie stężenia potasu w próbkach krwi kapilarnej w trybie POCT – czy wynik jest wiarygodny?**

Olga Ciepiela

Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii Klinicznej Wieku Rozwojowego, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Jednoczesne oznaczanie parametrów gazometrii krwi obwodowej i stężeń elektrolitów – sodu i potasu – we próbce krwi kapilarnej wykonywane jest bardzo często. Wynik oznaczania stężenia potasu w osoczu krwi pełnej stosunkowo często obarczony jest błędem wynikającym z nieprawidłowości w fazie przedanalizacyjnej i analitycznej. Najnowsze badania przeprowadzone w Szpitalu Pediatrycznym Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pokazują, że nawet w ponad 20% próbek krwi kapilarnej obserwowana jest pseudohiperkalemia – fałszywie podwyższone stężenie potasu. Do zafałszowania stężenia potasu mogą przyczynić się: nieprawidłowe pobranie materiału do badania, zanieczyszczenie materiału, niewłaściwy transport próbki (warto szczególną uwagę zwrócić na coraz szerzej rozpowszechniony system transportu próbek za pomocą poczty pneumatycznej), osobnicze cechy pacjenta, leukocytoza – szczególnie w przebiegu chorób rozrostowych układu krwiotwórczego, czy wreszcie interferencje antykoagulantu z elektrodami jonoselektywnymi.

W trakcie prezentacji zostaną przedstawione najczęściej występujące błędy prowadzące do zafałszowania wyniku oraz potencjalne rozwiązania, prowadzące do redukcji odsetka błędów.

### 13-W-4

## Jakość POCT w codziennej praktyce

Arkadiusz Wnuk

Centrum Urazowe Medycyny Ratunkowej i Katastrof  
w Krakowie, Szpital Uniwersytecki w Krakowie

Badania przyłóżkowe, badania rozproszone, badania satelitarne czy badania laboratoryjne, wykonywane w miejscu opieki nad pacjentem, są synonimem rozpowszechnionego w świecie określenia „*point-of-care testing*” – POCT. W medycynie ratunkowej określane są jako „laboratoryjne parametry krytyczne” i powinny być wykonane w pierwszej kolejności po badaniu podmiotowym (jeżeli jest możliwość zebrania wywiadu), zaraz po badaniu przedmiotowym (ocena fizykalna). W oparciu o wyniki tego typu badań, wdrażane są w SOR procedury diagnostyczno–lecnicze. Wyniki badań POCT są pomocne (konieczne) w ustaleniu rozpoznania wstępnego i stabilizacji stanu pacjenta.

Uzasadnieniem dla tworzenia systemów badań POCT w szpitalach, jest potrzeba stworzenia takich procedur diagnostycznych, w których wyeliminowana zostałaby laboratoryjna faza przed-analityczna i skrócony do niezbędnego minimum czas otrzymania wyniku badania (TAT), a tym samym podjęcia decyzji terapeutycznej. Aby system funkcjonował zgodnie z zasadami GLP (*good laboratory practice*) jego organizacją i zarządzaniem

powinien zająć się wyspecjalizowany personel laboratoryjny, do zadań którego należało będzie m.in. zorganizowanie systemu zapewnienia jakości badań POCT, z uwzględnieniem podstaw prawnych i obowiązujących rekomendacji.

W prezentacji przedstawiono zastosowane w codziennej praktyce rozwiązania, w których zaakcentowano problem jakości badań POCT i zgodności z obowiązującymi normami i przepisami. Opisano rolę koordynatora POCT i szpitalnego komitetu ds. POCT. Została podjęta próba przekazania diagnoście laboratoryjnemu, lekarzowi, pielęgniarce, wiedzy, na temat sposobów zapewnienia kontroli jakości badań POCT. Omówione wady i zalety badania POCT, wykonywanego w warunkach SOR (w warunkach nie-laboratoryjnych). Pokazane zagrożenia wynikające z interpretacji wyniku badania obarczonego błędem przed-laboratoryjnym i dokonana szczegółowa analiza tychże błędów.

Ocenia się, że ponad połowa sukcesu uzyskania „dobrego wyniku” badania laboratoryjnego to sposób jego pobrania. Niestety w badaniach POCT, wykonywanych bez udziału laboratorium, nie ma możliwości przeprowadzenia pełnej analizy błędów przed-laboratoryjnych i wdrożenia działań zapobiegawczych i korygujących. Biorąc po uwagę stały rozwój tej dziedziny medycyny laboratoryjnej i wzrastającą liczbę zlecanych badań POCT zwrócono uwagę na nowopowstałe trendy rozwoju i wyspecjalizowanie w odniesieniu do działów szpitala, w których POCT jest wykorzystywane.

## Sesja 14

### Diagnostyka laboratoryjna w chorobach autoimmunizacyjnych

#### 14-W-1

#### Celiakia i nietolerancja glutenu – jak diagnozować?

*Urszula Demkow*

Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii  
Klinicznej Wieku Rozwojowego, Warszawski Uniwersytet  
Medyczny

Złotym standardem w rozpoznawaniu celiakii jest badanie histopatologiczne biopsji jelita cienkiego, natomiast przeciwciała wykrywane testami serologicznymi stanowią ważny marker choroby. Jako metoda nieinwazyjna mogą służyć jako badania przesiewowe pozwalające wybór pacjentów, u których powinna być wykonana biopsja jelita. W diagnostyce choroby trzewnej najczęściej wykorzystuje się przeciwciała przeciwko transglutaminazie tkankowej (tTG) i przeciwko deamidowanemu peptydom gliadyny (GAF-3X) w klasie IgA i IgG oraz endomysium (EMA) w klasie IgA metodą immunofluorescencji pośredniej. Jako substratu do badań immunofluorescencyjnych użyto jelita i wątroby mały. Zgodnie z wytycznymi międzynarodowych grup ekspertów wysoki poziom przeciwciał przeciwko tTG, łącznie z typowymi dla celiakii objawami klinicznymi, pozwala rozpoznać tę chorobę i zalecić dietę bezglutenową bez konieczności kierowania chorego na biopsję jelita.

#### 14-W-2

#### Zespół antyfosfolipidowy – wyzwanie dla diagnostyki laboratoryjnej

*Katarzyna Fischer*

Laboratorium Kliniki Reumatologii Samodzielnego  
Publicznego Szpitala Klinicznego nr 1 Pomorskiego  
Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie

Zespół antyfosfolipidowy (APS), mimo że opisany w latach 80-tych ubiegłego stulecia, wciąż stanowi wyzwanie dla współczesnej medycyny i wciąż jest przedmiotem badań i rozważań ekspertów. APS jest chorobą autoimmunizacyjną charakteryzującą się występowaniem zmian zakrzepowych (tętnicznych lub żylnych) i/lub powikłań położniczych związanych z obecnością przeciwciał antyfosfolipidowych (aPL).

Przeciwciała antyfosfolipidowe stanowią heterogenną grupę przeciwciał, które mogą reagować z białkami osocza wiążącymi fosfolipidy, kompleksami białek i fosfolipidów oraz ujemnie naładowanymi fosfolipidami.

Zgodnie z laboratoryjnymi kryteriami APS w rutynowej diagnostyce oznacza się przeciwciała antykardiolipinowe w klasach IgG i IgM, przeciwciała przeciw beta 2-glikoproteinie I w klasach IgG i IgM, stosując metodę immunoenzymatyczną ELISA oraz antykoagulant tocznia zgodnie z zaleceniami Międzynarodowego

Towarzystwa Zakrzepicy i Hemostazy. Kryteria wymagają potwierdzenia wyników dodatnich po upływie co najmniej 12 tygodni. Z jednej strony, spełnienie co najmniej kryterium laboratoryjnego jest niezbędne do dokonania ostatecznego rozpoznania, z drugiej sama obecność przeciwciał nie przesądza o wystąpieniu zespołu. Dlatego tak istotne jest odpowiednie przeprowadzenie diagnostyki serologicznej i należyta interpretacja wyników badań. Trudności diagnostyczne napotymane w codziennej praktyce klinicznej i laboratoryjnej związane są przede wszystkim z mnogością czynników wpływających na wyniki poszczególnych testów (leki antykoagulacyjne i immunosupresyjne, czynniki endogenne, tło kliniczne, obecność szerokiego profilu aPL, przeciwciała heterofilne, reakcje krzyżowe itp.), czy z wystąpieniem szczególnych sytuacji, jak seronegatywny APS.

Obraz kliniczny zależy od łożyska naczyniowego, w którym doszło do zakrzepicy. Spektrum manifestacji może obejmować m. in. zakrzepicę naczyń obwodowych, objawy ze strony ośrodkowego układu nerwowego, oddechowego, sercowo-naczyniowego, objawy oczne, skórne czy liczne zaburzenia hematologiczne. W nielicznych przypadkach może dojść do rozwoju katastrofalnego APS cechującego się zajęciem wielonarządowym, gwałtownym postępem zmian i dużym odsetkiem śmiertelności > 50. Kluczowe jest więc wczesne rozpoznanie APS, które determinuje skuteczność działań terapeutycznych i prewencyjnych

W ostatnich latach powołano liczne inicjatywy międzynarodowe celem standaryzacji klasycznych testów serologicznych, wprowadzenia nowych parametrów laboratoryjnych, pełnego poznania mechanizmów patogenetycznych APS, czy umożliwienia rozpoznania chorych z grupy ryzyka wystąpienia wspomnianych trudnych sytuacji klinicznych, jak katastrofalny APS.

Eksperci podkreślają, że jedynie kompleksowe podejście z uwzględnieniem szerokiego profilu aPL, właściwym przeprowadzeniem procesu laboratoryjnego oraz wnikliwą analizą towarzyszących objawów klinicznych i zastosowaniem leczenia, dają gwarancję rozpoznania APS i wdrożenia właściwego postępowania terapeutycznego.

#### 14-W-3

#### Autoimmunizacyjne aspekty chorób neurologicznych

*Sławomir Michalak*

Zakład Neurochemii i Neuropatologii, Uniwersytet  
Medyczny w Poznaniu

Wprowadzenie do praktyki klinicznej nowych technik diagnostycznych pozwalających na wykrywanie autoprzeciwciał skierowanych przeciw powierzchniowym antygenom neuronalnym pozwoliło na poprawę możliwości rozpoznawania i różnicowania autoimmunologicznych zapaleń mózgu. Antygenami odpowiedzi

immunologicznej obserwowanej w tej grupie chorób są receptory (NMDA, AMPA, GABA) i kanały jonowe (podjednostki bramkowych napięciem kanałów potasowych – LGI-1 i CASPR).

Wśród autoimmunologicznych zapaleń mózgu częstą patologią ośrodkowego układu nerwowego jest zapalenie układu limbicznego (LE; *limbic encephalitis*), które objawia się szybko postępującym otępieniem, napadami padaczkowymi i zaburzeniami psychicznymi. Nowe kryteria diagnostyczne LE poza obrazem klinicznym uwzględniają neuroobrazowanie i oznaczanie autoprzeciwciał. Wykrycie przeciwciał przeciw neuronalnym antygenom powierzchniowym zwykle nie ma związku z chorobą nowotworową. Natomiast onkoneuronalne przeciwciała skierowane przeciw wewnątrzkomórkowym antygenom wskazują na paranowotworowy charakter LE.

Zapalenie nerwów wzrokowych i rdzenia kręgowego (NMO; *neuromyelitis optica*), znane dawniej jako choroba Devica), od czasu opracowania przez Wingerchuka kryteriów rozpoznania, a zwłaszcza wykrycia istotnych diagnostycznie przeciwciał przeciw akwaporynie-4, uznaje się za odrębną jednostkę chorobową. Nowsze kryteria diagnostyczne wprowadzają pojęcie chorób z kręgu zapalenia nerwów wzrokowych i rdzenia kręgowego (NMOSD; *neuromyelitis optica spectrum disorders*) i dzielą je na seropoztywne i seronegatywne w zakresie przeciwciał przeciw akwaporynie-4. Dzięki identyfikacji przeciwciał przeciw gangliozydowi odkryto nowe aspekty patofizjologii zapalenia pnia mózgu Bickerstaffa oraz zespołu Miller Fishera.

Pomimo znacznego rozwoju metod laboratoryjnych analizy te nadal wymagają standaryzacji oraz ostrożności w interpretacji ich wyników wynikające ze zmienności antygenów stosowanych do wykrywania/wiązania autoprzeciwciał, ograniczonego dostępu do materiału referencyjnego i standaryzacji, zmienności powinowactwa i awidności autoprzeciwciał.

Oznaczenie typu autoprzeciwciał wykrywanych w zapaleniach mózgu i rdzenia kręgowego, NMO i chorób autoimmunizacyjnych obwodowego układu nerwowego stało się obecnie podstawą decyzji dotyczących wyboru leczenia, w którego spektrum znajdują się steroidy, dożylna immunoglobulina, wymiana osocza oraz leki immunosupresyjne.

## 14-W-4 Sieci neutrofilowe – nowa przyczyna chorób autoimmunizacyjnych

Aneta Manda-Handzlik

Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii  
Klinicznej Wieku Rozwojowego, Warszawski Uniwersytet  
Medyczny

Neutrofile stanowiące najliczniejszą populację wśród leukocytów krwi obwodowej u dorosłych są ważnym elementem nieswoistej odpowiedzi immunologicznej. Komórki te, migrując z krwiobiegu do tkanek służą jako pierwsza linia obrony organizmu przed mikroorganizmami. Ich szeroki repertuar strategii służących do zwalczania infekcji obejmuje fagocytozę, degranulację oraz tworzenie zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych (ang. *neutrophil extracellular traps*, NETs).

NETs zostały opisane po raz pierwszy dopiero w 2004 r., kiedy to zaobserwowano, że aktywowane granulocyty mogą uwalniać struktury podobne do pajęczej sieci. Analiza składu NETs wykazała, że są one zbudowane z DNA stanowiącego szkielet, na którym deponowane są liczne białka o właściwościach bójczych, uwalniane z cytoplazmy lub ziarnistości. Do białek tworzących kompleksy z DNA zalicza się między innymi mieloperoksydazę, elastazę neutrofilową, lizozym, laktoferynę czy proteinazę 3. NETs stanowią lepłą pułapkę, w której uwięzione mogą zostać zarówno bakterie, grzyby, jak i pasożyty, co ogranicza ich rozprzestrzenianie się podczas infekcji. Ponadto lokalne wysokie stężenie substancji biobójczych wchodzących w skład NETs umożliwia nieszkodliwienie tych patogenów. Co ciekawe, wykazano, że tworzenie NETs może mieć również negatywne skutki dla organizmu – nasilone tworzenie NETs może być zaangażowane w patomechanizm wielu chorób i zaburzeń, takich jak cukrzyca, mukowiscydoza, stan przedzrzucawkowy czy tworzenie przerzutów nowotworowych. W ciągu ostatnich kilku lat wzrosło zainteresowanie rolą NETs w rozwoju chorób autoimmunizacyjnych. Dotychczas potwierdzono, że zaburzona równowaga między powstawaniem a degradowaniem NETs może przyczyniać się do rozwoju takich chorób, jak toczeń rumieniowaty układowy, reumatoidalne zapalenie stawów, zapalenie małych naczyń krwionośnych oraz łuszczyca. Z jednej strony wykazano nadmierne tworzenie NETs u tych pacjentów, wykazując m.in. obecność depozytów NETs w zapalnie zmienionych tkankach u chorych z RZS i SVV oraz potwierdzając, że istnieje korelacja między stopniem tworzenia NETs oraz poziomem markerów systemowej odpowiedzi zapalnej u chorych z RZS. Udział NETs w patogenezie chorób autoimmunizacyjnych tłumaczy się obecnością w tej strukturze wewnątrzkomórkowych antygenów, które w normalnych warunkach nie są prezentowane komórkom układu immunologicznego. Z drugiej strony podkreśla się również zaburzenia w degradacji NETs, takie jak zmniejszona aktywność DNAzy I i/lub obecność jej inhibitorów w surowicy pacjentów z SVV i toczeniem. Obecnie zagadnienia związane z regulacją tworzenia NETs u chorych cierpiących na choroby autoimmunizacyjne są przedmiotem intensywnych badań naukowych. Ich wyniki dają nadzieję na zaprojektowanie nowych strategii leczenia, opierających się na modulacji szlaków sygnałowych zaangażowanych w proces tworzenia i degradacji NETs.

## 14-U-1 Ocena wartości diagnostycznej i użyteczności klinicznej oznaczeń markerów biochemicznych i immunologicznych w prognozowaniu przebiegu pierwotnej żółciowej marskości wątroby

*Alicja Bauer (1), Paulina Wieszczy (2), Damian Gawęł (1), Andrzej Habior (2)*

(1) Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa, (2) Klinika Gastroenterologii, Hepatologii i Onkologii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego

Wstęp. Pierwotna żółciowa marskość wątroby (PBC) jest przewlekłą chorobą autoimmunizacyjną, przebiegającą z niszczeniem wewnątrzwątrobowych przewodów żółciowych. U ok. 90% pacjentów wykrywane są przeciwciała anty-mitochondrialne (anty-M2), u ok. 50% anty-jądrowe, przeciw antygenom otoczki jądrowej i białkom kompleksu PML. Podwyższone są parametry biochemiczne i stężenie bilirubiny.

Celem pracy było zbadanie korelacji między autoprzeciwciałami i parametrami biochemicznymi w surowicach pacjentów z PBC oraz ocena wiarygodności i użyteczności diagnostycznej otrzymanych wyników. Materiał i metody Pacjenci: PBC – 93, inne autoimmunologiczne choroby wątroby – 60, zdrowi dawcy – 30. Metody: komercyjne testy immunoenzymatyczne (Euroimmun, IMTEC – Niemcy, Inova – USA). Analiza statystyczna – test U Manna-Whitneya, program Prism (wersja 5, Graph Pad) Wyniki. Przeciwciała anty-M2 wykryto u 91% pacjentów z PBC, przeciw antygenom otoczki jądrowej (glikoproteina gp210, nukleoporyna p62, receptor laminy B) i białkom kompleksu PML (Sp100, Sp140, PML) odpowiednio u 26% i 32%. Specyficzność i dodatnia wartość predykcyjna wahały się w granicach 94-99%. Poziom przeciwciał u pacjentów z PBC był znamienne wyższy niż w grupach kontro-

lanych –  $p < 0.0001$ . Analiza krzywych ROC wykazała największą wartość pola pod krzywą dla przeciwciał anty-M2 (AUC=0.99). Pola powierzchni AUC dla przeciwciał przeciwjądrowych wynosiły 0.65-0.74. Obserwowano także wyższe stężenia fosfatazy alkalicznej (AP) – 425,4 IU/l vs 102 IU/L,  $\gamma$ -glutamylotranspeptydazy – 335.5 IU/l vs 55 IU/l, aminotransferaz –  $86.4 \pm 65.9$  IU/ml vs  $20.0 \pm 10.5$  IU/ml i bilirubiny – 2.4 mg/dl vs 1.1 mg/dl. Wyższy poziom bilirubiny korelował z obecnością przeciwciał anty-p62  $3.1 \pm 2.7$  mg/dl vs  $1.2 \pm 0.4$  mg/dl ( $p=0.02$ ). U pacjentów z podwyższonym poziomem AP, bilirubiny i aminotransferazy asparaginianowej niepomysłne rokowania zaobserwowano odpowiednio u 43%, 55% i 43% osób. W grupie z dodatnim wynikiem anty-p62 i anty-Sp100, zgon lub przeszczep wątroby miał miejsce w 46%. Istotnym czynnikiem niepomysłnego rezultatu końcowego jest bilirubina,  $p < 0.001$ . Wnioski Przeciwciała przeciwmitochondrialne i przeciwjądrowe są specyficznymi markerami PBC. Obecność przeciwciał przeciwjądrowych może być czynnikiem ryzyka gorszej czynności wątroby, ale nie zawsze koreluje z krótszym przeżyciem pacjentów. W monitorowaniu i prognozowaniu przebiegu choroby istotne są podwyższone wyniki badań biochemicznych, ale najważniejszym parametrem pozostaje bilirubina.



## Sesja 15

### Farmakologia kliniczna w medycznym laboratorium diagnostycznym

#### 15-W-1

#### Terapeutyczne monitorowanie leków – wymagania dla metod analitycznych

Paweł K. Kunicki

Pracownia Farmakologii Klinicznej i Terapii, Instytut Kardiologii, Warszawa

Terapeutyczne monitorowanie stężenia leku we krwi (TML) nie jest możliwe bez dostępu do wiarygodnych metod analitycznych. Opracowana metodyka powinna być przed zastosowaniem prawidłowo zwalidowana, a podczas rutynowego wykorzystania odpowiednio kontrolowana, co zapewni końcową wiarygodność wyniku. Konieczność walidacji metody analitycznej jest zawarta w standardach obowiązujących dla MLD. Niestety, brak jest wytycznej dedykowanej metodom stosowanym w TML, a jednocześnie należy mieć świadomość, że wymagania dla takiej metody są odmienne niż w przypadku metod używanych w toksykologii klinicznej, czy stosowanych w badaniach farmakokinetycznych z badaniami równowagi biologicznej włącznie. Pomocne mogą być zalecenia m.in. IATDMCT, jednak to na użytkownika spoczywa obciążająca odpowiedzialność zaplanowania i/lub weryfikacji właściwych parametrów walidacji dla stosowanej w laboratorium metody analitycznej.

Szczególnie istotny jest odpowiedni zakres metody dopasowany do stężeń oczekiwanych w próbkach klinicznych (pacjentów). Dolną granicę zakresu stanowi wartość LLOQ określająca najniższe stężenie o akceptowalnej dokładności i precyzji, zarówno wewnątrz-, jak i międzyseryjnej. Wartość LLOQ powinna być 2-3-krotnie niższa od najniższych stężeń, które spodziewane są w próbkach badanych. Z drugiej strony, konieczne jest zwalidowanie rozcieńczania próbki, gdy stężenie przekracza górny zakres metody (*dilution test*).

Kolejnym istotnym aspektem jest specyficzność metody analitycznej. Generalnie, techniki stosowane w TML dzielą się na chromatograficzne oraz immunochemiczne. Prawidłowo opracowana i zwalidowana metoda chromatograficzna (zazwyczaj HPLC z różnymi systemami detekcji) jest specyficznym narzędziem pozwalającym na oznaczenie kilku substancji jednocześnie. Metody immunochemiczne są dostosowane do rutynowych oznaczeń w laboratoriach diagnostycznych, zapewniając dużą automatyzację analiz oraz często satysfakcjonujące parametry walidacji. Nieustannie jednak największym problemem jest brak wystarczającej specyficzności metod immunochemicznych powodujący uzyskiwanie zawyżonych wyników, jak również relatywnie wysoka cena samych odczynników. Różnice w wynikach dla tej samej próbki wymagają, by informacja o stosowanej metodzie analitycznej obligatoryjnie towarzyszyła wynikowi badania.

Innym czynnikiem wpływającym na wiarygodność analiz jest sposób oraz częstotliwość kalibracji metody analitycznej. Badania

zazwyczaj zlecane są nieregularnie, i szczególnie w mniejszych ośrodkach, serie badane bywają mało liczne składając się niekiedy z pojedynczych próbek; jednocześnie TML wymaga wykonywania oznaczeń bez zbędnej zwłoki, ograniczając kuszącą praktykę gromadzenia próbek w większe, oznaczane co kilka-kilkaście dni, serie. Częsta kalibracja metody dla zaledwie kilku próbek znacząco podnosi koszt badania i w wielu przypadkach jest zbędna; z drugiej strony, przy stosowaniu detekcji opartej na spektrometrii mas (np. LC-MS/MS) konieczne jest wykonywanie kalibracji dla każdej analizowanej serii próbek (każdego dnia analiz).

Wreszcie, elementem który musi być uwzględniony jest bieżąca kontrola stosowanych w TML metod. Wartościowe programy zewnątrzlaboratoryjnej kontroli jakości (tzw. badania biegłości) muszą zapewniać zarówno próbki matrycy nastrzykiwane oznaczanym lekiem w znanym stężeniu, jak i spulowane próbki biologiczne pochodzące od osób leczonych. Próbki muszą być zaślepione dla uczestnika, a liczba laboratoriów uczestniczących w programie powinna być wystarczająco duża dla wiarygodnej interpretacji wyników.

#### 15-W-2

#### Terapeutyczne monitorowanie leków – implikacje farmakokinetyczne

Tomasz Pawiński

Zakład Chemii Leków, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Spersonalizowana terapia w dużej mierze oparta jest na terapeutycznym monitorowaniu stężeniem leku (TML). Nie sposób jednak omawiać zagadnień związanych z TML w oderwaniu od procesów farmakokinetycznych zachodzących w organizmie ludzkim. To one decydują o czasie i sposobie oraz rodzaju pobranej próbki do analizy ilościowej leku w płynie ustrojowym. Ponadto mają kluczowe znaczenie we właściwym doborze parametrów farmakokinetycznych dla prawidłowego prognozowania efektów leczenia. Obserwowana zmienność kinetyki leków, zwłaszcza w odniesieniu do leków o krytycznym znaczeniu dawki, może być związana z zaburzeniami procesów ich wchłaniania z miejsca podania, dystrybucją, metabolizmem i wydalaniem. Dlatego uzasadnionym wydaje się być w sposób właściwy powiązanie parametrów farmakokinetycznych z postacią podawanego środka leczniczego, procesami farmakodynamicznymi, patofizjologia narządową i aspektami związanymi z farmakogenomiką i genetycznym polimorfizmem. Najlepszym parametrem farmakokinetycznym obrazującym ogólnoustrojową zawartość leku w organizmie wyznaczanym w trakcie prowadzenia TML jest pole powierzchni pod krzywą stężenie-czas (AUC). Wyznaczenie jego jest jednak kosztowne z punktu widzenia diagnostyki laboratoryjnej i zarazem uciążliwe dla pacjenta ze względu na wielopunktowe pobieranie i analizowanie materiału biologicznego. Dlatego niewątpliwie jedną z ważniejszych metod

optymalizacji TML stało się zastosowanie strategii ograniczonej liczby próbek (LSS). Jej celem jest obliczenie AUC przy użyciu kilku stężeń leku (3 lub mniej) w próbkach krwi pacjentów pobranych w możliwie najkrótszym czasie od przyjęcia leku. Wielokrotna, wieloczynnikowa analiza krzywej regresji pozwala na wygenerowanie algorytmu umożliwiającego obliczenie skróconego AUC, który jako zmienna zależna winien być w swej wartości możliwie maksymalnie zbliżony do całkowitego AUC. Opracowanie optymalnego modelu LSS wymaga jego walidacji oraz przestrzegania szeregu reguł w odniesieniu do praktycznego zastosowania algorytmu w terapii onkologicznej, immunosupresyjnej, antybiotykoterapii czy też terapii antyretrowirusowej. Nie bez znaczenia jest również postać leku użyta w terapii oraz jej tożsamość (lek oryginalny czy odtwórca). Może to mieć poważne konsekwencje w odniesieniu do przebiegu procesów farmakokinetycznych wpływających na procedury stosowane w TML. Postaci leku uwalniające natychmiast substancję czynną do krwioobiegu poprzez niczym nie zakłócony proces wchłaniania będą się różniły od preparatów o zmodyfikowanym uwalnianiu. Skutkiem tego będą inne czynności podejmowane w trakcie prowadzenia rutynowego TML. Podobnie leki generyczne, pomimo swojej udowodnionej biorównoważności w stosunku do leków oryginalnych, mogą posiadać odmienną charakterystykę procesów farmakokinetycznych, co przełoży się na zmiany w procedurach TML.

### 15-W-3 Specyfika diagnostyki toksykologicznej w medycznym laboratorium diagnostycznym

Ewa Gomółka

Katedra Toksykologii i Chorób Środowiskowych,  
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

(nie nadesłano streszczenia)

### 15-W-4 Działania niepożądane leków monitorowanych

Magdalena Hurkacz

Katedra i Zakład Farmakologii Klinicznej, Uniwersytet  
Medyczny we Wrocławiu

Optymalizacja farmakoterapii, mająca na celu zwiększenie skuteczności przy jednoczesnym ograniczeniu liczby powikłań pole-

kowych spowodowała, że zwrócono uwagę na możliwość wykorzystania metod analitycznych do opracowania indywidualnego schematu leczenia. Wykazano, że pewna grupa leków wymaga monitorowania terapii poprzez pomiar ich stężeń w płynach organizmu. Wieloletnie doświadczenie kliniczne i analizy statystyczne oraz znajomość farmakokinetyki pozwoliło określić zakresy terapeutyczne stężeń wielu substancji leczniczych. Należy jednak podkreślić, że metoda terapii monitorowanej stężeniami leków w organizmie (inaczej: terapeutyczne monitorowanie leków, TML) nie jest w Polsce szeroko rozpowszechniona i budzi wiele wątpliwości. Podstawowym problemem jest odpowiedź na pytanie: kiedy monitorować oraz jakie korzyści można uzyskać z takiego działania? Chcąc temu sprostać opracowano wskazania do monitorowania oraz kryteria doboru leków. Najważniejszym powodem zastosowania TML jest występowanie objawów niepożądanych działania substancji leczniczych. Zatem wszystkie leki wymagające monitorowania charakteryzuje duża liczba ewentualnych powikłań, zależnych od stężenia w organizmie. Jest wiele przykładów leków spełniających to kryterium. Należą do nich antybiotyki z grupy aminoglikozydowych, glikopeptydowych, leki przeciw-wirusowe, przeciwgrzybicze z grupy azoli, ponadto większość leków o działaniu immunosupresyjnym, przeciwartymicznym, przeciwpadaczkowym, przeciwdepresyjnym i inne. Można w tym miejscu wymienić jako powikłanie np. brak skuteczności działania antybiotyków, których stężenie w organizmie nie osiągnęło wartości większych niż MIC (*ang. Minimal Inhibitory Concentration*), nefro- i ototoksyczne działanie aminoglikozydów po przekroczeniu stężeń toksycznych, wystąpienie zespołu serotoninowego po stosowaniu niektórych leków przeciwdepresyjnych (inhibitory MAO), nefro- i hepatotoksyczność po leczeniu cyklosporyną A, zaburzenia rytmu serca po podaniu litu. Wprowadzenie do terapii w latach 40-tych XX w. metody TML spowodowało, że wiele powikłań można było wyeliminować lub zmniejszyć ich skutki dla chorego. Przed współczesnym laboratorium stoi wyzwanie w postaci wprowadzenia TML do codziennej praktyki laboratoryjnej i klinicznej jako element współpracy diagnostów z lekarzami i pielęgniarkami.



## Prezentacje plakatowe

## P-01

**Ocena aktywacji komórek śródbłonna u pacjentów z niedoborem C1 inhibitora**

Maria Kapusta (1), Danuta Fedak (1), Krystyna Słowińska-Solnica (1), Paulina Gawęda (1), Krystyna Obtułowicz (2), Bogdan Solnica (1)

(1) Zakład Diagnostyki Katedra Biochemii Klinicznej Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum w Krakowie, (2) Zakład Alergologii Klinicznej i Środowiskowej Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum w Krakowie

**Wstęp.** Obrzęk naczynioruchowy spowodowany niedoborem C1-inh to schorzenie stosunkowo rzadkie, lecz potencjalnie zagrażające życiu. Niedobór C1-inh prowadzi do нефизиologicznej aktywacji procesów krzepnięcia, fibrynolizy i kininogenezy oraz występowania objawów chorobowych pod postacią obrzęków naczynioruchowych. Pomimo obniżonego stężenia C1-inh obrzęki występują nieregularnie, zdarzają się także pacjenci bezobjawowi. Wskazuje to na udział innych czynników niż C1-inh, odpowiedzialnych za występowanie napadów obrzęków naczynioruchowych, których w przyszłości wykorzystanie umożliwiłoby szybkie rozpoznanie i włączenie skutecznego leczenia. Celem badania była ocena aktywacji komórek śródbłonna naczyń u pacjentów z niedoborem C1-inh w ostrym ataku obrzęku oraz w okresie remisji.

**Materiał i metody.** Do badania włączono 49 pacjentów z niedoborem C1-inh (19 z ostrym atakiem obrzęku naczynioruchowego, 30 w remisji; 26 mężczyzn i 23 kobiety, w wieku od 19 do 51 lat oraz 24 zdrowe osoby w wieku od 23 do 52 lat. Stężenie endoteliny 1 (ET-1), pentraksyny 3 (PTX3) i interleukiny 6 (IL-6) oznaczano w osoczu metodą ELISA (R&D Systems). Dodatkowo oznaczono stężenia C1-inh i składnika C4 dopełniacza metodą ELISA (AssayPro).

**Wyniki.** W grupie pacjentów z ostrym atakiem obrzęku naczynioruchowego stężenie ET-1 było znacznie wyższe i wyniosło ( $2,11 \pm 0,49$  pg/ml) w porównaniu z grupą kontrolną ( $1,23 \pm 0,11$  pg/ml,  $p < 0,0001$ ), jak i pacjentami w remisji ( $1,31 \pm 0,14$  pg/ml,  $p < 0,0001$ ). Stężenie PTX3 i IL-6 było wyższe u pacjentów z ostrym atakiem obrzęku ( $2,61 \pm 1,21$  ng/ml) i ( $2,09 \pm 0,98$  pg/ml,  $p < 0,001$ ) niż u pacjentów w remisji i grupie kontrolnej ( $1,11 \pm 0,81$  ng/ml) i ( $1,22 \pm 0,83$  pg/ml); ( $1,26 \pm 0,52$  ng/ml) i ( $1,29 \pm 0,79$  pg/ml,  $p < 0,001$ ). Stężenia C1-inh i składnika C4 były znacznie obniżone w grupie pacjentów z ostrym atakiem obrzęku i stanie remisji ( $0,09 \pm 0,03$ ) i ( $0,08 \pm 0,04$  g/l); ( $0,12 \pm 0,03$ ) i ( $0,09 \pm 0,03$  g/l,  $p < 0,0001$ ) w porównaniu z grupą kontrolną ( $0,32 \pm 0,07$ ) i ( $0,23 \pm 0,07$  g/l,  $p < 0,0001$ ). Zaobserwowano istotne statystycznie korelacje pomiędzy stężeniem ET-1 i PTX3 oraz ET-1 i IL-6 ( $R = 0,44$  i  $R = 0,41$ ).

**Wnioski.** Uzyskane wyniki wskazują, że atak obrzęku naczynioruchowego jest silnie związany z aktywacją komórek śródbłonna. Aktywacja komórek śródbłonna następuje pod wpływem licznych

bodźców, między innymi czynników zapalnych. Tak więc, ET-1, PTX3 i IL-6 mogą być uznane jako markery rozwoju zaostrzenia obrzęku spowodowanego niedoborem C1-inh. Uzyskane wyniki mogą mieć również implikacje terapeutyczne.

## P-02

**Profile białek drobnocząsteczkowych w moczu pacjentów z niewydolnością nerek**

Paulina Pater (1), Aleksandra Maleszka (2), Paulina Dumnicka (1), Maria Rozwadowska (3), Ryszard Drożdż (1), Joanna Tisończyk (1)

(1) Zakład Diagnostyki Medycznej Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum w Krakowie, (2) Szpital Uniwersytecki w Krakowie, (3) Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum w Krakowie

**Wstęp.** Późna diagnoza chorób nerek związana jest z gorszymi rokowaniami, ponieważ w większości przypadków w strukturze nefronu dochodzi do nieodwracalnych uszkodzeń. Zatrzymanie postępującego procesu uszkodzenia nerki ma podstawowe znaczenie i powoduje zmniejszenie odsetka pacjentów osiągających etap terminalnej niewydolności nerek i uzależnionych od kosztownej procedury terapii nerkozastępczej. Przewlekła niewydolność nerek jest światowym problemem opieki zdrowotnej. SDS elektroforeza jest niedocenianym testem do badania białkomoczu. Celem pracy była analiza profilu białek drobnocząsteczkowych u pacjentów ze zmniejszonym wskaźnikiem filtracji kłębuszkowej (GFR).

**Materiał i metody.** Analiza białek moczu dokonywana była na komercyjnych żelach gradientowych (4-20%) (Sigma-Aldrich). Mocz pochodził od pacjentów u których filtracja kłębuszkowa była niższa niż 50ml/(min $\times$ 1,73m<sup>2</sup>).

**Wyniki.** U wielu pacjentów z niskim współczynnikiem filtracji kłębuszkowej obserwujemy charakterystyczny profil drobnocząsteczkowych białek moczu. Zastosowany wariant SDS elektroforezy pozwala na ilościowe oszacowanie wybranych białek drobnocząsteczkowych (w tym b<sub>2</sub>-mikroglobuliny i cystatyny C). Mimo powtarzalności ogólnego obrazu profilu pomiędzy poszczególnymi pacjentami występują wyraźne różnice we wzajemnych proporcjach wybranych białek. Proces absorpcji tych białek jest do pewnego stopnia selektywny i prawdopodobnie związany z specyficznymi zmianami komórkowymi w strukturze nefronu. Korelacja profili białkowych ze zmianami histologicznymi wymaga dalszych badań. Potencjalnie jednak powinna zredukować potrzebę wykonywania inwazyjnych biopsji w wybranych grupach pacjentów.

**Wnioski.** SDS elektroforeza jest doskonałym zbyt rzadko używanym testem do analizy białek moczu. Gradientowe warianty żelu pozwalają na ilościową analizę białek drobnocząsteczkowych których obecność koreluje z upośledzeniem funkcji cewek, oraz białek o średniej masie cząsteczkowej związanych z upośledzeniem błony podstawnej kłębuszka.

## P-03

### Ocena ekspresji wybranych cząsteczek adhezyjnych z rodziny antygenów karcynoembrionalnego (CEACAM) w śródnabłonkowej neoplazji trzustki

Justyna Zińczuk (1), Wioletta Romaniuk (2), Konrad Zaręba (1), Katarzyna Guzińska-Ustymowicz (1), Bogusław Kędra (3), Andrzej Kemono (1), Anna Pryczynicz (1)

(1) Zakład Patomorfologii Ogólnej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, (2) Klinika Hematologii, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, (3) II Klinika Chirurgii Ogólnej i Gastroenterologicznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

**Wstęp.** CEA-podobne cząsteczki adhezyjne (CEACAM) są zaliczane do nadrodziny białek immunoglobulinowych i funkcjonują jako niezależne od jonów wapnia cząsteczki adhezyjne, wykazujące homo- i heterotypowe oddziaływania komórkowe. Białka te mogą uczestniczyć w regulacji adhezji komórkowej, supresji guza czy w angiogenezie. Nadekspresja CEACAM 1, 5 i 6 została szeroko opisana w nowotworach przewodu pokarmowego pochodzenia nabłonkowego, m. in. w gruczolakoraku przewodowym trzustki. Celem pracy była ocena i porównanie ekspresji CEACAM 1, CEACAM 5 i CEACAM 6 w prawidłowej tkance trzustki i w najczęściej występujących zmianach prekursorowych gruczolakoraka przewodowego – w śródnabłonkowej neoplazji trzustki (ang. pancreaticintraepithelialneoplasia – PanIN).

**Materiał i metody.** Grupę badaną stanowiło 72 pacjentów leczonych operacyjnie z powodu zapaleń, torbieli oraz gruczolakoraka przewodowego trzustki, u których dodatkowo stwierdzono obecność śródnabłonkowej neoplazji trzustki. Ekspresja białek CEACAM 1, CEACAM 5, CEACAM 6 została oceniona z wykorzystaniem metody immunohistochemicznej przy użyciu 3-stopniowej skali: 0 – brak reakcji, 1 – (słaba lub umiarkowana) pozytywna reakcja obecna w 1-30% komórek nabłonka 2 – (silna) pozytywna reakcja obecna >30% komórek nabłonka.

**Wyniki.** Analiza statystyczna wykazała dodatnie korelacje pomiędzy ekspresją białek CEACAM 1, CEACAM 5 i CEACAM 6 a obecnością i stopniem zaawansowania śródnabłonkowej neoplazji trzustki ( $p < 0,001$ ). Ekspresja tych białek była nieobecna w prawidłowych przewodach trzustkowych i wzrastała wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania śródnabłonkowej neoplazji trzustki. Różnice w ekspresji białek CEACAM 1, 5 i 6 pomiędzy prawidłowymi przewodami trzustkowymi a różnymi stopniami zaawansowania śródnabłonkowej neoplazji trzustki były istotne statystycznie ( $p < 0,001$ ). Ponadto, zaobserwowano istotne statystycznie zależności pomiędzy ekspresją białka CEACAM 1 a lokalizacją śródnabłonkowej neoplazji trzustki. Znacząco wyższą ekspresję tego białka zaobserwowano w głowie w porównaniu do trzonu i ogona trzustki.

**Wnioski.** Białka CEACAM 1, CEACAM 5 i CEACAM 6 są obecne na etapie powstawania zmian prekursorowych o niskim stopniu zaawansowania i wydają się odgrywać istotną rolę w procesie transformacji nowotworowej w trzustce. Dodatnia ekspresja białek CEACAM 1, 5 i 6 może przysłużyć się do wykorzystania ich jako

potencjalnych biomarkerów do identyfikacji śródnabłonkowej neoplazji trzustki.

## P-04

### Znaczenie ekspresji mucyn w diagnostyce zmian prekursorowych gruczolakoraka przewodowego trzustki

Wioletta Romaniuk (1), Justyna Zińczuk (2), Konrad Zaręba (3), Katarzyna Guzińska-Ustymowicz (2), Bogusław Kędra (3), Anna Pryczynicz (2), Andrzej Kemono (2)

(1) Klinika Hematologii, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, (2) Zakład Patomorfologii Ogólnej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, (3) II Klinika Chirurgii Ogólnej i Gastroenterologicznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

**Wstęp.** Mucyny są to wysokocząsteczkowe glikoproteiny zbudowane z rdzenia białkowego (apomucyny) połączonego z licznymi łańcuchami cukrowymi za pomocą wiązań O-glikozydowych. Zmiany w budowie, zarówno części białkowej jak i cukrowej mucyn są nieodłącznym zjawiskiem towarzyszącym komórkom nowotworowym i powodują wzrost lub spadek ekspresji danej apomucyny lub też zmiany w rodzaju produkowanych mucyn. Dlatego też, celem pracy była ocena i porównanie ekspresji mucyny 1, 4 i 5AC w prawidłowych przewodach trzustkowych oraz w śródnabłonkowej neoplazji trzustki (ang. pancreaticintraepithelialneoplasia – PanIN), zmianie prekursorowej gruczolakoraka przewodowego trzustki.

**Materiał i metody.** Grupę badaną stanowiło 72 pacjentów leczonych operacyjnie z powodu zapaleń, torbieli oraz gruczolakoraka przewodowego trzustki, u których dodatkowo stwierdzono obecność śródnabłonkowej neoplazji trzustki. Ekspresja mucyny 1, 4 i 5AC została oceniona z wykorzystaniem metody immunohistochemicznej przy użyciu poliklonalnych przeciwciał. Reakcję oceniano poprzez zliczenie pozytywnie zabarwionych komórek nabłonka w przewodach trzustkowych i wyrażono ją w odsetku procentowym. Ponadto oceniono intensywność reakcji i wielkość pola powierzchni dodatnio barwiącej się cytoplazmy w komórkach nabłonkowych.

**Wyniki.** Analiza statystyczna wykazała dodatnie korelacje pomiędzy ekspresją białek mucyna 1, 4 i 5AC a obecnością i stopniem zaawansowania śródnabłonkowej neoplazji trzustki ( $p < 0,001$ ). Ekspresja tych białek wzrastała wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania PanIN. Różnice w ekspresji białek MUC 1, 4 i 5AC pomiędzy prawidłowymi przewodami trzustkowymi a różnymi stopniami zaawansowania śródnabłonkowej neoplazji trzustki były istotne statystycznie ( $p < 0,001$ ). Ponadto, zaobserwowano istotny statystycznie wzrost intensywności reakcji i wielkość pola powierzchni pozytywnie zabarwionej cytoplazmy następujący wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania PanIN.

**Wnioski.** Nadekspresja mucyny 1, 4 i 5AC jest związana z obecnością śródnabłonkowej neoplazji trzustki. Sugeruje to, że nadprodukcja śluzu jest wcześniej pojawiającym się zjawiskiem w procesie karcynogenezy w trzustce i ma początek w zmianach przednowotworowych o niskim stopniu zaawansowania.



**P- 05****Profil izoenzymatyczny i aktywność dehydrogenazy alkoholowej (ADH) i dehydrogenazy aldehydowej (ALDH) w surowicy chorych z pierwotną żółciową marskością**

Elżbieta Zasimowicz-Majewska

Afilacja (brak)

**Wstęp.** Poważnym problem są schorzenia autoimmunizacyjne wątroby, gdyż nie dają wyraźnych objawów, a ich rozpoznanie jest trudne. Ważne jest poszukiwanie nowych markerów użytecznych do diagnostyki tych chorób. Dehydrogenaza alkoholowa (ADH) oraz dehydrogenaza aldehydowa (ALDH) są enzymami pełniącymi rolę w metabolizmie alkoholu na drodze oksydacyjnej. W komórkach wątrobowych potwierdzono występowanie głównie izoenzymów ADH klasy I, II, III. Destrukcja hepatocytów będąca wynikiem autoimmunizacji, może mieć swoje odbicie w aktywności tych enzymów i wywalać ich uwalnianie do krwi. Celem pracy była ocena izoenzymatycznego profilu ADH oraz jej diagnostycznej przydatności w rozpoznawaniu pierwotnej żółciowej marskości (PBC).

**Materiał i metody.** Badania wykonano w surowicy 21 pacjentów z PBC (12 mężczyzn i 9 kobiet). Całkowitą aktywność ADH badano metodą kolorymetryczną z użyciem p-nitrozo-N-Ndimetyloaniliny jako substratu. Aktywność izoenzymów ADH I i ADH II oznaczano spektrofotometryczną metodą z zastosowaniem specyficznych fluorogennych substratów (4-metoksy 1-naftaldehydu dla ADH I i 6-metoksy-2-naftaldehydu dla ADH II. Redukcja tych aldehydów doprowadziła do powstania alkoholi, których fluorescencję oznaczano na fluorymetrze RF-5301 (Shimadzu). Aktywność kolejnych klas izoenzymów mierzono metodami spektrofotometrycznymi z alkoholem kaprylowym (ADH III) i m-nitrobenzaldehydem (ADH IV). Całkowitą aktywność ALDH oznaczano również za pomocą metody spektrofotometrycznej z zastosowaniem jako substratu 6-metoksy-2-naftaldehydu.

**Wyniki.** Zaobserwowano istotnie statystycznie wyższą aktywność ADH I w surowicy chorych na pierwotną żółciową marskość wątroby (4,27 mIU/L) w porównaniu z grupą kontrolną (2,15 mIU/L). Statystycznie istotny wzrost zaobserwowano również w przypadku całkowitej aktywności ADH (1,25 mIU/L, grupa kontrolna 0,58 mIU/L). Czułość diagnostyczna ADH I wynosiła 71,42%, natomiast diagnostyczna swoistość 74,66%. Całkowita aktywność ADH wykazała czułość na poziomie 63,28%, a swoistość 69,01%. Wyższe wartości predykcyjne wyniku ujemnego i dodatniego uzyskano dla ADH klasy I i wynosiły (NPV 75,54 % oraz PPV 79,16%). Wartości te, w przypadku całkowitej ADH były nieco niższe i wynosiły NPV 68,14% i PPV 72,21%. Moc diagnostyczna analizowana przy pomocy pola pod krzywą ROC wynosiła dla ADH I 0,751, natomiast dla całkowitej ADH było nieco niższe i miało wartość 0,714.

**Wnioski.** Uzyskane wyniki wskazują na przydatność diagnostyczną aktywności szczególnie ADH I w surowicy pacjentów z PBC.

**P-06****Anty-DFS70 (Anti-Dens Fine Speckled70) – nowy parametr w diagnostyce przeciwciał przeciwjądrowych ANA**

Ahmed Manasar, Beata Boruta, Kinga Myczkowska,

Henryka Gwarda, Eugenia Bujniewicz

Zakład Analiz Medycznych „Śląskie Laboratoria

Analityczne”, Katowice

**Wstęp.** Przeciwciała anty-DFS70 są wykrywane u około połowy pacjentów zdrowych, u których stwierdzono obecność przeciwciał przeciw jądrowym ANA. Sugeruje się, że przy braku objawów klinicznych izolowana obecność anty-DFS70 pozwala wykluczyć układową autoimmunologiczną chorobę reumatyczną (SARD), tym samym uniknąć niosącej liczne skutki uboczne terapii (Herold, Febris). Cel pracy: Analiza częstości występowania przeciwciał anty-DFS70 u pacjentów ambulatoryjnych badanych w kierunku wykrycia przeciwciał przeciwjądrowych ANA. Ocena rodzajów i intensywności świecenia u pacjentów z izolowaną i współistniejącą z innymi przeciwciałami obecnością anty-DFS70.

**Materiał i metody.** U 358 pacjentów ambulatoryjnych wykonano zgodnie ze skierowaniem badania IFT i Euroline ANA profil3 DFS70 testami firmy Euroimmun. Dla 86 wyników, w których stwierdzono obecność anty-DFS70 (Euroline ANA profil3 DFS70) oceniano typ i intensywność świecenia (miano przeciwciał-IFT) oraz ewentualną współobecność innych przeciwciał.

**Wyniki.** Przeciwciała anty-DFS70 stwierdzono u 24% (N=86) badanych, w tym 16,5% (N=59) stanowiły wyniki z izolowaną obecnością anty-DFS70, a pozostałym (7,5%) towarzyszyły inne przeciwciała, najczęściej SS-A, Ro52, dsDNA i przeciw histonom. U badanych z izolowaną obecnością anty-DFS70 w IFT występował przede wszystkim typ świecenia drobnoziarnisty i pozytywne chromosomy jądra komórek Hep-2 w mianie od 1:1000 do 1:10 000.

**Wnioski.** 1. Obecność izolowanych przeciwciał anty-DFS70 stwierdzono u 16,5% badanych, u około połowy z nich obserwowano wysoką intensywność w Euroline ANA profil 3 DFS70, a w teście IFT występował przede wszystkim typ świecenia drobnoziarnisty i pozytywne chromosomy jądra komórek Hep-2 w mianie korelującym z intensywnością w Euroline ANA profil 3 DFS70. 2. Wśród badanych z współobecnością anty-DFS70 i innych przeciwciał, wysokiej intensywności anty-DFS70 w Euroline ANA profil 3 DFS70 najczęściej towarzyszą przeciwciała anty SS-A, Ro 52 i dsDNA. 3. U badanych ze słabą intensywnością świecenia zarówno przeciwciał anty-DFS 70, jak i większości pojedynczych przeciwciał w teście Euroline ANA profil 3 DFS70 obserwowano w IFT głównie typ świecenia ziarnisty lub drobnoziarnisty. Jedynie homogeny typ świecenia przeciwciał anty-dsDNA i anty histonom przystania świecenie drobnoziarniste i pozytywne chromosomy nawet przy wysokim mianie przeciwciał anty-DFS70.

## P-07

### Całkowity status antyoksydacyjny u kobiet chorujących na ŁZS i RZS – badanie pilotażowe

Izabela Kokot (1), Sylwia Płaczowska (2), Katarzyna Sołkiewicz (1), Renata Sokolik (3), Lucyna Korman (3), Lilla Pawlik-Sobecka (1)

(1) Zakład Praktycznej Nauki Zawodu Analityka, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, (2) Diagnostyczne Laboratorium Naukowo-Dydaktyczne, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, (3) Katedra i Klinika Reumatologii i Chorób Wewnętrznych, Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

**Wstęp.** Reaktywne formy tlenu powodujące zaburzenie równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej, są jednym z głównych czynników etiopatogenezy przewlekłych chorób zapalnych o podłożu autoimmunologicznym, takich jak łuszczycowe (ŁZS) i reumatoidalne zapalenie stawów (RZS). Celem pracy było porównanie poziomu całkowitego statusu antyoksydacyjnego (TAS), stężenia niskocząsteczkowych antyoksydantów (albumina, kwas moczowy) w surowicy krwi u pacjentów chorujących na RZS i ŁZS względem grupy kontrolnej osób zdrowych oraz weryfikacja zależności pomiędzy parametrami układu antyoksydacyjnego organizmu a wykładnikami stanu zapalnego, tj.: stężeniem białka CRP i liczbą leukocytów (WBC).

**Materiał i metody.** Grupę badaną stanowiło 9 kobiet chorujących na ŁZS (średnia wieku  $\pm$ SD,  $43 \pm 11$  lat), 12 z RZS (średnia wieku  $38 \pm 10$  lat) oraz 5 zdrowych kobiet w grupie kontrolnej (średnia wieku  $41 \pm 11$  lat). Od wszystkich osób w warunkach czczo pobierano krew żylną. W surowicy krwi oznaczono stężenie TAS, albuminy, kwasu moczowego, CRP. W krwi pobranej na EDTA wykonano morfologię, w celu określenia liczby WBC. Do porównania grup zastosowano test ANOVA Kruskala-Wallisa, ocenę zależności wybranych parametrów testem korelacji rang Spearmana ( $p < 0,05$ ).

**Wyniki.** Nie zaobserwowano istotnej różnicy dla wartości TAS pomiędzy poszczególnymi grupami, których odpowiednio mediana i wartości (min-max), wynosiły dla grupy kontrolnej: 1,37 mmol/l (Trolox) (1,23-1,61), ŁZS: 1,39 mmol/l (Trolox) (1,05-1,62) i RZS: 1,37 mmol/l (Trolox) (1,24-1,64). Różnice istotne statystycznie wykazano dla CRP pomiędzy grupą kontrolną a pacjentkami: z RZS ( $p=0,026$ ), odpowiednio 0,1mg/l (0,1 1,85) vs. 4,62 mg/l (0,66-32,54) i ŁZS ( $P=0,046$ ) odpowiednio 0,1mg/l (0,1 1,85) vs. 4,85mg/l (0,71-18,13). Nie zaobserwowano żadnej korelacji pomiędzy wykładnikami stanu zapalnego a TAS oraz stężeniami niskocząsteczkowych antyoksydantów. Stwierdzono istotny wzrost stężenia albumin w grupie pacjentek z RZS względem grupy kontrolnej ( $p=0,029$ ), odpowiednio mediana (min.-max): 4,98mg/dl (4,26-5,49) vs. 4,37mg/dl (4,17-4,57).

**Wnioski.** Pomimo istotnej różnicy między wartościami CRP w grupach badanych w porównaniu do grupy kontrolnej, całkowity status antyoksydacyjny u osób chorujących na ŁZS i RZS

jest porównywalny do wartości u osób z grupy kontrolnej. Brak różnicy wartości TAS, może być powodowany przyjmowanych leków modyfikujących przebieg choroby, które poprawiają status antyoksydacyjny organizmu.

## P-08

### Porównanie wartości dwóch komercyjnie dostępnych metod wykrywania przeciwciał przeciw C1q w odniesieniu do aktywności immunologicznej i klinicznej toczniowego zapalenia nerek

Magdalena Polcyn-Adamczak, Zofia Niemir, Aleksandra Rochowiak-Pajzderska, Katarzyna Smykał-Jankowiak Pracownia Nefrologii Molekularnej, Katedra i Klinika Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu

**Materiał i metody.** Badaniami objęto 91 chorych na TZN, w tym 66 z aktywnym (aTZN) i 25 z nieaktywnym TZN (nTZN) oraz 81 osób zdrowych (grupa K). Mediany wartości SLEDAI i SLEDAI-N oraz stężeń przeciwciał przeciw dsDNA (adsDNA), C3 i C4 w aTZN i nTZN wynosiły odpowiednio: 16,5 (12-20,25) i 3 (0-4punktów), 8 (8-16) i 0 punktów, 377 (192-694) i 24 (20-124 IU/mL), 0,64 (0,46-0,84) i 0,99 (0,89-1,2 g/L), 0,08 (0,06-0,14) i 0,18 (0,12-0,26 g/L). Do oznaczenia aC1q w surowicy wykorzystano dwa testy ELISA, określone jako A i B. Punkty odcięcia dla określenia wartości pozytywnych w obu testach określono przy pomocy analiz krzywych ROC.

**Wyniki.** Częstości wykrywania aC1qA i aC1qB w całej grupie chorych wynosiły 63,7% (aTZN-78,8%, nTZN-24%;  $p < 0,0001$ ) i 58,8% (aTZN-75,9%, nTZN-13,6%;  $p < 0,0001$ ) i różniły się wysoce statystycznie w stosunku do grupy K ( $p < 0,0001$  dla obu testów), w której aC1qA wykryto u 7,4%, a aC1qB u 5,4% osób. U chorych z TZN wyniki obu testów korelowały istotnie statystycznie ( $r=0,78$ ;  $p < 0,0001$ ). Dobrą zgodność testów potwierdziły wysokie wartości współczynnika Kappa (0,74) i zadowalające współczynnika kontyngencji (0,60;  $p < 0,0001$ ). Porównanie pól pod krzywymi ROC dla obu metod nie wykazało statystycznie istotnych różnic (0,84 i 0,82;  $p=0,4010$ ). Obserwowano istotne statystycznie korelacje między aktywnością ogólną TRU (SLEDAI) a stężeniami aC1qA ( $r=0,46$ ;  $p < 0,0001$ ) i aC1qB ( $r=0,53$ ;  $p < 0,0001$ ), jak również między aktywnością TZN (SLEDAI-N) a aC1qA ( $r=0,31$ ;  $p=0,0057$ ) i aC1qB ( $r=0,43$ ;  $p < 0,0001$ ). W kontekście SLEDAI-N, wyższe wartości korelacji dla obu testów obserwowano dla erytrocyturii (Ue) ( $r=0,45$  i  $0,43$ ;  $p < 0,0001$ ) niż dla białkomoczu (Up). Wieloczynnikowe analizy regresji wstecznej dla Up i Ue jako wartości zależnych, uwzględniające aC1q, adsDNA, C3 i C4 jako wartości niezależne, wykazały powiązanie między adsDNA i Up ( $\beta=0,41$ ;  $p=0,0001$ ) oraz aC1q i Ue ( $\beta=0,25$ ;  $p=0,0187$ ).

**Wnioski.** Wyniki naszych badań wskazują, że wprowadzenie oznaczania aC1q do codziennej praktyki klinicznej byłoby cennym uzupełnieniem w diagnostyce TRU/TZN.

**P-09****Ocena stężenia cytokin prozapalnych (IL-1 $\beta$  i IL-6) u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów w zależności od stopnia zaawansowania choroby**

Joanna Matowicka-Karna, Beata Gawrońska, Olga Martyna Koper, Joanna Kamińska, Halina Kemonia  
Zakład Laboratoryjnej Diagnostyki Klinicznej,  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

**Wstęp.** Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) jest przewlekłą, układową chorobą tkanki łącznej o podłożu autoimmunologicznym. RZS charakteryzuje się nieswoistym zapaleniem głównie symetrycznych stawów z towarzyszącymi zmianami pozastawowymi i objawami układowymi, które prowadzą do zmniejszenia ruchomości stawów, inwalidztwa i przedwczesnej śmierci. Rozpoznanie RZS opiera się na klinicznych, immunologicznych i radiologicznych kryteriach klasyfikacyjnych opracowanych przez ACR i ELUAR. U chorych na RZS występuje zwiększone uwalnianie cytokin prozapalnych, m.in. IL-1 $\beta$  i IL-6, które inicjują oraz nasilają i podtrzymują proces zapalny.

Celem: badania była ocena stężenia IL-1 $\beta$  i IL-6 u chorych na RZS w zależności od stopnia zaawansowania choroby.

**Materiał i metody.** Przebadano 42 chorych na RZS – w tym 32 osoby z II° i 10 osób z III° zaawansowania klinicznego choroby według Steinbrockera. U wszystkich chorych oznaczono p/ciała anty-CCP, OB, RF, CRP. Oceniano u tych chorych również indeks aktywności choroby DAS. Grupę kontrolną stanowiło 40 zdrowych osób. Wszystkie badania w grupie badanej i kontrolnej wykonywano równolegle. Do ilościowego oznaczenia stężenia IL-1 $\beta$  i IL-6 wykorzystano wysokiej czułości zestawy odczynnikowe ELISA Kit R&D Systems.

**Wyniki.** Analizę statystyczną wykonano w oparciu o program STATISTICA 10.0 PL. Wyniki uznano za znamienne statystycznie przy poziomie istotności  $p < 0,05$ . Nie stwierdzono występowania różnic istotnych statystycznie (w badanych parametrach) pomiędzy chorymi z II° i III° zaawansowania choroby, dlatego też chorzy stanowili jedną grupę badaną. Średnie stężenia IL-1 $\beta$  w grupie chorych na RZS i w grupie kontrolnej wynosiły odpowiednio:  $1,34 \pm 2,17$  pg/mL i  $1,07 \pm 0,42$  pg/mL. Uzyskana różnica była znamieną statystycznie ( $p < 0,01^*$ ). Średnie stężenie IL-6 w grupie badanej było prawie 3-krotnie wyższe ( $6,91 \pm 5,34$  pg/mL) w porównaniu do grupy osób zdrowych ( $2,452 \pm 1,44$  pg/mL). Była to różnica istotna statystycznie ( $p < 0,001^*$ ).

**Wnioski.** Stężenie badanych cytokin (IL-1 $\beta$  i IL-6) nie zależy od stopnia zaawansowania choroby. Uzyskane wyniki wskazują, że IL-6 jest potencjalnie lepszym wykładnikiem toczącego się stanu zapalnego u chorych na RZS.

**P-10****Markery obrotu kostnego w surowicy dzieci chorych na młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów**

Katarzyna Winsz-Szczotka, Kornelia Kuźnik-Trocha,  
Katarzyna Komosińska-Vassev, Krystyna Olczyk  
Katedra i Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki  
Laboratoryjnej Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem  
Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski  
Uniwersytet Medyczny w Katowicach

**Wstęp.** Struktury kostno-stawowe podlegają ciągłemu procesowi przebudowy, obejmującemu – pozostające ze sobą w stanie dynamicznej równowagi – procesy tworzenia i resorpcji. W fazie wzrastania organizmu, tkanka kostna podlega szczególnie intensywnym procesom modelowania strukturalnego, podczas którego dominują procesy kościotworzenia. Zaburzenia tych ostatnich przyczyniają się do rozwoju schorzeń, w tym – krzywiicy czy osteoporozy. Z uwagi na nie do końca poznany metabolizm omawianego typu tkanki łącznej u dzieci z młodzieńczym idiopatycznym zapaleniem stawów (MIZS), oraz na kliniczne konsekwencje zaburzeń struktur kostnych u tych chorych, za cel pracy przyjęto ilościową ocenę markerów obrotu kostnego, tj. N-końcowego propeptydu łańcucha  $\alpha$  kolagenu typu I (PINP), odzwierciedlającego wielkość biosyntezy wymienionej tkanki, oraz N-końcowego telopeptydu łańcucha  $\alpha$  kolagenu typu I (NTX), jako wskaźnika resorpcji struktur kostnych, w surowicy dzieci ze świeżo rozpoznanych, nie leczonych MIZS, oraz u tych samych pacjentów, po zastosowaniu leczenia modyfikującego przebieg choroby, w odniesieniu do stężenia badanych związków w surowicy dzieci zdrowych.

**Materiał i metody.** Oznaczenia stężenia markerów obrotu kostnego, we krwi dzieci zdrowych oraz tych z MIZS, dokonano testami opartymi na technice ELISA.

**Wyniki.** W przebiegu MIZS dochodzi do zaburzenia homeostazy układu kostno-szkieletowego, mającego odzwierciedlenie w znamienne statystycznym obniżeniu stężenia zarówno PINP ( $p=0,021$ ) jak i NTX ( $p=0,041$ ) w surowicy dzieci z MIZS przed zastosowaniem leczenia, w stosunku do stężenia ocenianych markerów w surowicy osób zdrowych. Ponadto wykazano, że zastosowanie leków modyfikujących stan zapalny, doprowadzające u pacjentów do uzyskania klinicznej poprawy, równocześnie przyczynia się do istotnego wzrostu stężeń obu ocenianych związków. Jednakże, jedynie w przypadku PINP wykazaliśmy normalizację jego stężenia. Zmiany stężeń PINP i NTX, stanowiąc wyraz zaburzeń hormonalnych i metabolicznych, współuczestniczących w patogenezie MIZS, pozostawały w zależności od typu schorzenia, płci pacjenta, rodzaju stosowanej terapii oraz nasilenia procesu zapalnego.

**Wniosek.** Wyznaczenie wartości referencyjnych PINP i NTX we krwi dzieci zdrowych mogłoby stać się narzędziem diagnostycznym, pozwalającym na podjęcie bardziej skutecznej walki z istotnym problemem zmian destrukcyjnych w obrębie układu kostno-szkieletowego, które u chorych z MIZS prowadzą do trwałego kalectwa.



## P-11

### Ocena stężenia amin katecholowych oraz ekspresji mikroRNA-29b u pacjentów przewlekle hemodializowanych

Marcin Dziedzic, Ewelina Orłowska-Dziedzic, Tomasz Powrózek, Magdalena Hałabiś-Kalinowska, Kinga Gaweł, Anna Bednarek-Skublewska, Teresa Małecka-Massalska, Janusz Solski

Katedra i Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

**Wstęp.** Przewlekła choroba nerek (PChN) jest zespołem chorobowym rozwijającym się w następstwie wrodzonych lub nabytych schorzeń układu moczowego, jego następstwem jest schyłkowa niewydolność nerek. O ile zachowanie katecholamin (KA) osoczowych w przebiegu niewydolności nerek znalazło szerokie odbicie w piśmiennictwie, to w dostępnej literaturze światowej niewielka jest ilość danych na temat ekspresji i roli cząsteczek mikroRNA (miRNA) w tym miRNA-29b w rozwoju i przebiegu tego schorzenia. miRNA są 18-23-nukleotydowymi jednoniciowymi sekwencjami niekodującego RNA. Regulują one ekspresję genów na poziomie potranskrypcyjnym (mRNA) przez co wpływają na degradację mRNA i hamowanie bądź całkowite zatrzymanie translacji, odgrywając znaczącą rolę w procesach komórkowych. Poziom ekspresji miRNA-29b jest zróżnicowana, zależy od wielu czynników oraz zmian patofizjologicznych zachodzących w komórkach. Celem pracy była ocena stężenia KA oraz ekspresji miRNA-29b w badanej grupie chorych hemodializowanych (HD).

**Materiał i metody.** Badaniami objęto 50 pacjentów przewlekle hemodializowanych w Stacji Dializ DIAVERUM w Lublinie, w wieku od 45 do 81 lat. Oznaczenia stężenia KA wykonano za pomocą zestawu firmy ChromSystem-HPLC. miRNA-29b wyizolowano z użyciem zestawu QiagenmiRNEasy zgodnie z protokołem producenta. Wyizolowane miRNA analizowano stosując ilościową technikę reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkrypcją (qRT-PCR). Do opracowania wyników badań stosowano program statystyczny Statistica 10.0 firmy StatSoft. Obserwowane różnice oraz zależności uznano za statystycznie istotne przy poziomie istotności  $p < 0,05$ .

**Wyniki.** W badanej grupie chorych średnie stężenie noradrenaliny (NA) wynosiło  $713,9 \pm 489,1$  pg/mL, adrenaliny (A)  $44,04 \pm 29,6$  pg/mL, dopaminy (DA)  $11,6 \pm 7,7$  pg/mL oraz średnia wartość ekspresji miRNA-29b  $0,28 \pm 0,57$ . Przeprowadzona analiza korelacji rang Spearmana wykazała, iż wartości stężeń DA ujemnie korelowały z ekspresją miRNA-29b ( $R_s = -0,3$ ;  $p = 0,02$ ). Nie zaobserwowano w teście korelacji rang Spearmana zależności między NA vs. miRNA-29b ( $R_s = -0,006$ ;  $p = 0,96$ ), A vs. miRNA-29b ( $R_s = -0,17$ ;  $p = -0,21$ ), miRNA-29b vs. Kt/V ( $R_s = -0,12$ ;  $p = 0,36$ ), miRNA-29b vs. wiek pacjentów ( $R_s = -0,31$ ;  $p = 0,82$ ), miRNA-29b vs. liczba miesięcy zabiegu HD ( $R_s = 0,1$ ;  $p = 0,45$ ).

**Wnioski.** W badanej grupie chorych hemodializowanych niska ekspresja miRNA-29b może oddziaływać na stężenia dopaminy nasilając proces włóknienia w nerkach poprzez obniżenie aktywność kolagenu i wzrostu macierzy pozakomórkowej.

## P-12

### Znaczenie biomarkerów aktywności choroby w długofalowej ocenie chorych na stwardnienie rozsiane leczonych interferonem beta

Sławomir Michalak (1), Anna Pietrzak (2), Krystyna Osztynowicz (1), Elżbieta Tokarz-Kupczyk (2), Halina Wyglądalska-Jernas (2), Wojciech Kozubski (2)

(1) Zakład Neurochemii i Neuropatologii Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, (2) Katedra i Klinika Neurologii Uniwersytet Medyczny w Poznaniu

**Wstęp.** Stwardnienie rozsiane (ang. sclerosismultiplex, SM) jest najczęściej występującą zapalno-neurodegeneracyjną chorobą, której monitorowanie w praktyce klinicznej opiera się obecnie przede wszystkim na ocenie niesprawności oraz tomografii jądrowego rezonansu magnetycznego (MRI). Indywidualna zmienność przebiegu SM, rzutowo-remitujący przebieg większości przypadków oraz niejednorodność odpowiedzi na leczenie immunomodulujące sprawiają, że konieczne jest wdrożenie obiektywnych metod monitorowania choroby. Celem niniejszego badania była długofalowa, prospektywna ocena znaczenia biomarkerów związanych z odpowiedzią na leczenie interferonem beta (INFb) oraz regulacją aktywności odpowiedzi immunologicznej u chorych na SM.

**Materiał i metody.** Do badania włączono 61 chorych na SM poddawanych leczeniu INFb w ramach programu terapeutycznego NFZ w Klinice Neurologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Chorzy byli badani neurologicznie podczas comiesięcznych wizyt przez okres do 8 lat, a co rok wykonywano badanie MRI głowy. Przed włączeniem INFb oraz po 2 latach leczenia pobierano krew. W surowicy chorych oznaczano obecność przeciwciał wiążących INFb (BAB) metodą pośrednią ELISA, przeciwciał neutralizujących (NAb) metodą z wykorzystaniem komórek transfekowanych genem lucyferazy z promotorem zależnym od IFN, stężenie USP-18 (UbiquitinSpecificProtease 18), wiperyny oraz SOCS-3 (Supressor of CytokineSignalling -3).

**Wyniki.** Obecność BAB stwierdzono u 33%, a NAb u 46% leczonych INFb, a u 8% obecność NAb utrzymywała się przynajmniej w oznaczeniach wykonanych w przynajmniej 2 punktach czasowych (przetrwale NAb). Stężenie SOCS-3 zmniejsza się ( $P = 0,0001$ ) po 2 latach leczenia INFb ( $0,0$ ;  $0,0-1,21$  pg/ml; mediana; zakres międzykwartylowy) w porównaniu z wartościami wyjściowymi ( $3,98$ ;  $1,21-13,63$  pg/ml). U chorych z przetrwałymi NAb stężenie SOCS-3 po 2 latach leczenia INFb jest wyższe ( $12,74$ ;  $6,44-129,46$  pg/ml;  $P = 0,0045$ ) niż u chorych bez przetrwałych NAb ( $0,0$ ;  $0,0-15,53$  pg/ml). Stężenie wiperyny po 2 latach leczenia INFb jest niższe ( $P = 0,0117$ ) u chorych bez wykładników aktywności choroby po 7 latach leczenia ( $0,32$ ;  $0,19-0,46$  ng/ml) w porównaniu z chorymi, u których choroba jest aktywna ( $0,61$ ;  $0,53-0,77$  ng/ml).

**Wnioski.** Białka regulujące odpowiedź immunologiczną oraz związane z biologicznymi efektami działania INFb *in vivo* mogą stanowić biomarkery przydatne w długofalowej ocenie aktywności stwardnienia rozsianego u chorych poddawanych leczeniu immunomodulującemu.

**P-13****Aktywność i profil izoenzymatyczny dehydrogenazy alkoholowej (ADH) i dehydrogenazy aldehydowej (ALDH) w surowicy chorych z alkoholowym stłuszczeniem wątroby**

Blanka Wolszczak-Biedrzycka (1), Wojciech Jelski (2), Marek Jurkowski (1), Elżbieta Zasimowicz-Majewska (3)  
(1) Katedra Analityki Medycznej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, (2) Zakład Diagnostyki Biochemicznej Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, (3) Szpital „Olmedica” Olecko

**Wstęp.** Wątroba jest głównym narządem metabolizującym alkohol etylowy na drodze oksydacyjnej z udziałem dehydrogenazy alkoholowej (ADH) i dehydrogenazy aldehydowej (ALDH). W hepatocytach wykazano obecność głównie izoenzymów klasy I, II, III ADH. Poziom aktywności enzymów w surowicy uzależniony jest od stopnia uszkodzenia komórki wątrobowej w wyniku toksycznego działania alkoholu etylowego. Celem pracy była ocena przydatności oznaczeń całkowitej dehydrogenazy alkoholowej i jej izoenzymów oraz dehydrogenazy aldehydowej w surowicy pacjentów z alkoholowym stłuszczeniem wątroby.

**Materiał i metody.** Badania wykonano w surowicy 36 pacjentów z alkoholowym stłuszczeniem wątroby (24 mężczyzn i 12 kobiet, 31-75 lat). Aktywność całkowitą ADH oznaczano metodą kolorymetryczną z p-nitrozo-N-N-dimetyloaniliną (NDMA) jako substratem. Aktywność ADH I i ADH II oznaczano metodą spektrofotometryczną z użyciem fluorogennych, specyficznych substratów (4-metoksy-1-naftaldehyd dla ADH I i 6-metoksy-2-naftaldehyd dla ADH II). W wyniku redukcji tych aldehydów powstają alkohole, których fluorescencję mierzono na fluorymetrze RF-5301 (Shimadzu). Aktywność izoenzymów pozostałych klas oznaczano metodami spektrofotometrycznymi z substratami – alkoholem kaprylowym (ADH III) i m-nitrobenzaldehydem (ADH IV). Aktywność całkowitą ALDH oznaczano również metodą spektrofotometryczną z 6-metoksy-2-naftaldehydem jako substratem.

**Wyniki.** Stwierdzono istotną statystycznie wyższą aktywność ADH I w surowicy chorych na alkoholowe stłuszczenie (4.35 mIU/L) w porównaniu z grupą kontrolną (2.04 mIU/L). Istotny statystycznie wzrost aktywności stwierdzono także w przypadku izoenzymu klasy II dehydrogenazy alkoholowej (27.21 mIU/L, grupa kontrolna 14.56 mIU/L) oraz całkowitej ADH (1.31 mIU/L, grupa kontrolna 0.65 IU/L). Czułość diagnostyczna ADH I wynosiła 74,56%, a swoistość diagnostyczna 78,35%. Czułość i swoistość diagnostyczna dla ADH II wynosiła odpowiednio 70,15% i 75,72%, a dla całkowitej ADH 66,42% i 70,33%. Najwyższe wartości predykcyjne wyniku dodatniego i ujemnego otrzymano dla izoenzymu klasy I ADH (PPV 82,15%, NPV 79,14%). Natomiast PPV i NPV dla ADH II i total ADH wyniosły odpowiednio 76,65% i 72,53% oraz 74,16% i 71,04%. Moc diagnostyczna oceniana na podstawie pola pod krzywą ROC wynosi dla ADH I 0,784, ADH II 0,758, a dla całkowitej ADH 0,706.

**Wnioski.** Otrzymane wyniki sugerują przydatność diagnostyczną oznaczania aktywności zwłaszcza ADH I w surowicy pacjentów z alkoholowym stłuszczeniem wątroby.

**P-14****Grelina, wisfatyna i irisina u dzieci z zespołem krótkiego jelita**

Barbara Kościelniak (1), Mikołaj Spodaryk (2), Julita Pabisek-Miernik (2), Krystyna Sztefko (1), Przemysław Tomasik (1)  
(1) Zakład Biochemii Klinicznej, Wydział Lekarski, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie, (2) Oddział Leczenia Żywnieniowego, Uniwersytecki Szpital Dziecięcy w Krakowie

**Wstęp.** Dzieci z zespołem krótkiego jelita żywione są przede wszystkim lub wyłącznie pozajelitowo. Wyłączenie lub znaczne ograniczenie karmienia doustnego może mieć istotny wpływ na wydzielanie peptydów z zachowanych odcinków przewodu pokarmowego jak np. z żołądka. Zaburzenia w wydzielaniu greliny jak również niedobór innych peptydów regulatorowych na skutek resekcji znaczących części jelit mogą powodować zaburzenia regulacji wydzielania adipokin. Celem pracy była analiza osoczowych stężeń greliny, oraz adipokin – wisfatyny i irisiny u dzieci z zespołem krótkiego jelita.

**Materiał i metody.** Grupę badaną stanowiło 25 dzieci z zespołem krótkiego jelita żywionych pozajelitowo powyżej 2 tygodni, średnia wieku 14 miesięcy  $\pm$  5 miesięcy, przyjęte do Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego w Krakowie. Grupę kontrolną reprezentowało 20 zdrowych niemowląt o podobnym SDS-BMI, żywionych doustnie mlekiem matki bądź mlekiem sztucznym. W osoczu krwi żyłnej wykonano pomiar stężenia irisiny, wisfatyny oraz greliny metodami immunoenzymatycznymi.

**Wyniki.** Zaobserwowaliśmy niższe stężenie wisfatyny w grupie badanej w porównaniu do pacjentów z grupy kontrolnej (mediana: 0.79  $\mu$ g/ml vs. 6,44  $\mu$ g/ml;  $p=0.000$ ). Ponadto, odnotowaliśmy niższe stężenie greliny w badanej grupie w porównaniu do kontroli (mediana: 71,35 pg/ml vs. 169,34 pg/ml;  $p=0.000$ ). Stężenie irisiny w porównywanych grupach nie różniło się.

**Wnioski.** Słabe wypełnienie żołądka u dzieci z zespołem krótkiego jelita nie wywoływało wzrostu wydzielania greliny. Jelitowe peptydy regulatorowe prawdopodobnie regulują wydzielanie greliny jak i adipokin.

**P-15****Zmiany w proteinogramie surowicy krwi szczurów szczepu Wistar w czasie zaburzonego odpływu chłonki z wątroby**

Brygida Beck  
Medyczne Centrum Naukowo-Diagnostyczne BB-Med Opole, Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej, Mazowiecki Szpital Specjalistyczny Sp. z o.o. Radom

**Wstęp.** Jednym z najpoważniejszych współczesnych problemów, spotykanych w praktyce medycznej, są schorzenia wątroby prowadzące do jej włóknienia i marskości. Włóknienie może być spowodowane różnorodnymi czynnikami etiologicznymi. Według najnowszych doniesień jedną z przyczyn włóknienia wątroby jest zaburzony odpływ chłonki z tego narządu. Większość chorób wątroby przebiega ze zmianami stężeń białek pochodzenia wątrobowego w osoczu.



**Materiał i metody.** Badania przeprowadzono na samcach szczurów szczepu Wistar. Zwierzęta podzielono na 9 grup eksperymentalnych. W każdej grupie wyróżniono 3 podgrupy: grupa badana – zaburzony odpływ chłonki z wątroby (grupa B), grupa kontrolna pozornie operowana – prosta laparotomia (grupa K) oraz grupa kontrolna, która nie była poddana zabiegowi operacyjnemu (grupa 0). Każda podgrupa liczyła 18 szczurów. Badania zwierząt przeprowadzono w 1, 3, 7, 14, 21, 28, 35, 56 i 103 dobie po zabiegu operacyjnym. Zaburzony odpływ chłonki z wątroby wywoływano przez podwiązanie i przecięcie pnia chłonnego wątrobowego (naczynie limfatyczne w przeważającej części odprowadzające chłonek z wątroby szczurów szczepu Wistar). Rozdział elektroforetyczny białek surowicy krwi wykonano przy użyciu zestawów GEL PROTEIN 100 firmy Cormay

**Wyniki.** W czasie trwania eksperymentu obserwowano, w pierwszych dniach po operacji, znamienne statystycznie spadek stężenia albuminy w surowicy krwi zwierząt grupy badanej i kontrolnej, w porównaniu do grupy zerowej. W 7 dobie po zabiegu stężenie albuminy w surowicy zwierząt wszystkich grup było porównywalne. W grupie badanej, w kolejnych dniach eksperymentu, doszło do ponownego znamienne statystycznego spadku stężenia albuminy. Obserwowano też wzrost stężenia gamma-globulin w surowicy krwi zwierząt grup badanych, który był znamienne statystycznie od 35 doby po zabiegu. Od 28 dnia po zabiegu obserwowano w surowicy krwi zwierząt grupy badanej stopniowy, znamienne statystycznie wzrost stężenia  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$ -globulin oraz przejściowy wzrost stężenia  $\beta$ -globulin. W trakcie trwania eksperymentu obserwowano też znamienne statystycznie wzrost stężenia białka całkowitego w surowicy krwi zwierząt.

**Wnioski.** W czasie zaburzonego odpływu chłonki z wątroby dochodzi do utrudnionego transportu wszystkich białek z wątroby do krwiobiegu, a następnie, wskutek procesu włóknienia tego narządu, do zaburzeń w ich produkcji.

## P-16

### Znaczenie białka śladowego beta (BTP) w ocenie uszkodzenia nerek we wczesnej fazie ostrego zapalenia trzustki

Beata Kuśnierz-Cabala (1), Paulina Dumnicka (2), Małgorzata Mazur-Laskowska (3), Anna Ząbek-Adamska (3), Mateusz Sporek (4), Justyna Wajda (5), Piotr Ceranowicz (6), Marek Kuźniewski (7), Agnieszka Gala-Błądzińska (8), Barbara Maziarz (3), Bogdan Solnica (1)

(1) Zakład Diagnostyki Katedra Biochemii Klinicznej, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, (2) Zakład Diagnostyki Medycznej, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, (3) Zakład Diagnostyki, Szpital Uniwersytecki w Krakowie, (4) Oddział Chirurgiczny Szpitala Powiatowego w Suchej Beskidzkiej; Katedra Anatomii, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, (5) Katedra Anatomii, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, (6) Katedra Fizjologii, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, (7) Katedra i Klinika Nefrologii, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, (8) Kliniczny Szpital Wojewódzki Nr 2 im. Św. Jadwigi Królowej, Rzeszów

**Wstęp.** Rozwijające się we wczesnej fazie ostrego zapalenia trzustki (OZT), ostre uszkodzenie nerek (AKI) stanowi jedno z najpoważniejszych powikłań, które znacząco pogarsza rokowanie i wpływa na wzrost śmiertelności chorych z OZT (nawet do 70-80%). Celem badania była ocena możliwości wykorzystania pomiarów śladowego białka beta (BTP) w przewidywaniu rozwoju AKI u chorych z OZT w okresie pierwszych 48 godzin trwania choroby.

**Materiał i metody.** Grupę badaną stanowiło 50 chorych (17 mężczyzn i 26 kobiet) w wieku średnim  $61 \pm 18$  lat, leczonych w Oddziale Chirurgicznym Szpitala Powiatowego w Suchej Beskidzkiej. OZT rozpoznawano zgodnie z kryteriami Atlanta 2012, a AKI wg wytycznych KidneyDisease: Improving Global Outcomes (KDIGO). Badania rutynowe wykonano na analizatorze Cobas 6000 (Roche Diagnostics), natomiast stężenie BTP oraz cystatynę C zmierzono immunonefelometrycznie (Nephelometer BN II, Siemens). Stężenie lipokaliny związanej z żelatyną neutrofilii w surowicy (NGAL) oznaczono zestawem ELISA firmy BioVendor (Brno, Czechy).

**Wyniki.** Stężenia BTP w ciągu całego badania były wyższe u 7 pacjentów, u których doszło do rozwoju AKI: mediana (Q1-Q3) w pierwszej dobie 1,11 (0,90-1,50) vs. 0,45 (0,33-0,68) mg/l;  $p < 0,001$ . Wykazano silne dodatnie korelacje między BTP a stężeniem kreatyniny ( $R=0,73$ ;  $p < 0,001$ ), mocznika ( $R=0,62$ ;  $p < 0,001$ ), cystatyny C ( $R=0,85$ ;  $p < 0,001$ ) i NGAL ( $R=0,43$ ;  $p=0,006$ ) w surowicy. Stężenia BTP były również wyższe u chorych z ciężkim OZT: w pierwszej dobie 1,11 (1,06-1,50) vs. 0,50 (0,34-0,75) mg/l;  $p=0,011$ . Stężenia BTP w pierwszej dobie korelowały dodatnio ze skalą Bedside Indeks of Severity in AcutePancreatitis ( $R=0,69$ ;  $p < 0,001$ ).

**Wnioski.** Wyniki wstępnych badań wskazują, że stężenie BTP w surowicy jest wczesnym markerem uszkodzenia nerek w przebiegu OZT oraz ciężkości przebiegu tego schorzenia.

## P-17

### Nieinwazyjne badanie HPA-1a płodu w osoczu kobiet ciężarnych HPA-1a ujemnych zidentyfikowanych w badaniach przeglądowych w ramach programu PREVFNAIT

Agnieszka Orzińska (1), Katarzyna Guz (1), Małgorzata Uhrynowska (1), Marzena Dębska (2), Anne Husebekk (3), Ewa Brojer (1)

(1) Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa, (2) Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, II Klinika Położnictwa i Ginekologii, Warszawa, (3) Institute of Medical Biology, University of Tromsø The Arctic University of Norway, Tromsø, Norway

**Wstęp.** Najczęstszym podłożem alloimmunologicznej małopłytkowości płodów/novorodków (AIMPN) są przeciwciała anty-HPA-1a wytworzone przez kobiety HPA-1a ujemne w czasie ciąży lub po porodzie, jeśli płód jest HPA-1a dodatni. Przeciwciała nie są groźne, jeśli płód nie odziedziczył antygeny HPA-1a. Nieinwazyjne badania antygeny HPA-1a płodu wykonywane z DNA izolowanego z osocza matki są istotne, bo pozwalają przewidzieć status dziecka i podjąć decyzję dotyczącą dalszego prowadzenia ciąży.

Cel: Podsumowanie badań nieinwazyjnych antygeny HPA-1a płodu u ciężarnych HPA-1a ujemnych, badanych w ramach programu badań przesiewowych HPA-1a „PREVFNAIT” (Pol-Nor / 203111/69/2013).

**Materiał i metody.** DNA z 328 próbek osocza od 299 HPA-1a ujemnych kobiet izolowano automatycznie (easyMag, Biomerieux), trawiono enzymem MspI w celu usunięcia DNA matczyngo (HPA-1bb) i badano metodą real-time PCR na obecność allelu ITGB3 (HPA-1a) oraz genu kontrolnego – CCR5 na aparacie LC480II (Roche Diagnostics). Otrzymane wyniki porównano z genotypem HPA-1 noworodków.

**Wyniki.** W 281/299 przypadkach określono status HPA-1 noworodków. W jednym przypadku wykonanie badania nieinwazyjnego było niemożliwe, bo genotyp matki był HPA-1ab mimo, że na jej płytkach nie wykryto antygeny HPA-1a. W 228/229 przypadkach kobiet noszących HPA-1a dodatnie dziecko uzyskano wynik HPA-1a dodatni we wszystkich trzech powtórzeniach reakcji (średnia Ct 36,0 + 1,7SD), a w jednym przypadku w 2/3 powtórzeniach. W 44/51 przypadkach ciężarnych noszących płód HPA-1a ujemny nie uzyskano amplifikacji w co najmniej dwóch na trzy powtórzenia (średnia Ct 44,0 + 1,9SD), w 5/51 wyniki amplifikacji były rozbieżne, a w 2/51 fałszywie dodatnie. W 22 przypadkach pobranych dwukrotnie około 16 i 28 tygodnia ciąży otrzymano wynik HPA-1a dodatni na poziomie średnich Ct 37,45+ 1,5SD i 35,39+ 1,0SD ( $p < 0,001$ , test Whitney-Mann). W 2/21 przypadkach (10%) ciężarnych z przeciwciałami anti-HPA-1a badanie nieinwazyjne oceniło genotyp płodu jako HPA-1a ujemny – zgodny z matką.

**Wnioski.** Zastosowany algorytm badań nieinwazyjnych antygeny HPA-1a pozwolił na prawidłowe ustalenie HPA-1a płodu u wszystkich kobiet noszących płód HPA-1a dodatni; u kobiet noszących płód HPA-1a ujemny w 2/51 (4%) uzyskano fałszywie dodatnie wyniki, które skutkowałyby traktowaniem ciąży jako zagrożonej AIMP/N. W związku z koniecznością podejmowania decyzji o leczeniu AIMP/N na wczesnym etapie ciąży konieczne jest udoskonalanie badania antygeny HPA-1a w 20 tygodniu ciąży.

## P-18

### Nieinwazyjne ustalanie grupy krwi płodu u kobiet ciężarnych z ryzykiem konfliktu serologicznego poprzez analizę wolnokrzążącego DNA płodu w osoczu matki

Agnieszka Orzińska (1), Katarzyna Guz (1), Izabela Kopeć (1), Mirosław Wielgoś (2), Marzena Dębska (3), Katarzyna Luterek (2), Romuald Dębski (3), Zbigniew Celewicz (4), Ewa Brojer (1)

(1) Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa, (2) I Katedra i Klinika Położnictwa i Ginekologii, I Wydział Lekarski, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa, (3) Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, II Klinika Położnictwa i Ginekologii, Warszawa, (4) Klinika Perinatologii, Położnictwa i Ginekologii, Pomorski Uniwersytet Medyczny, Szczecin

**Wstęp.** Wytworzenie przeciwciał odpornościowych do antygenów obecnych na krwinkach czerwonych dziecka w trakcie ciąży,

szczególnie z układu Rh lub Kell, może prowadzić do choroby hemolitycznej płodu i noworodka (ChHP/N). Przeciwciała, które są wykrywane u ciężarnej, mogą pochodzić z poprzedniej ciąży lub być wynikiem alloimmunizacji poprzetoczeniowej. Jeśli płód nie odziedziczył po ojcu antygeny, przeciwciała nie są groźne w obecnej ciąży. Nieinwazyjna diagnostyka genów kodujących antygeny krwinek czerwonych pozwala ustalić czy płód jest zgodny z matką. Badanie jest też przydatne do ustalenia u ciężarnych RhD ujemnych wskazań do śródciążowego podawania immunoglobuliny anti-D (Ig). Jeśli płód jest RhD ujemny, podanie Ig jest niepotrzebne. Celem doniesienia jest przedstawianie 16-letnich doświadczeń IHiT w badaniach nieinwazyjnych dotyczących konfliktów serologicznych i immunoprofilaktyki RhD.

**Materiał i metody.** Badanie DNA z osocza kobiet ciężarnych wykonano u 552 kobiet z przeciwciałami: anti-D (319), anti-D+C+E (3), anti-D+E+K (1), anti-D+C (93), anti-G (10), anti-D+E (20), anti-E (14), anti-c (25), anti-K (67); oraz 219 kobiet RhD ujemnych bez przeciwciał. Izolacje DNA z osocza prowadzono na aparacie easyMag (Biomerieux), a detekcję genu RHD, RHCE\*C, RHCE\*E, RHCE\*c, KEL\*1, CCR5, SRY lub polimorfizmów insercja/delecja metodą real-time PCR (ABIPrism 7700; LC480II). W 660/712 przypadków dysponowano wynikami serologicznymi urodzonych dzieci.

**Wyniki.** Porównanie oznaczeń genotypu płodu z fenotypem noworodka wykazało pełną zgodność wyników dla antygenów D, c, E i C, a odsetek ciąż zgodnych antygenowo z matką wynosił: 24% (117/477 kobiet RhD ujemnych), 28% (7/25 kobiet Rhc ujemnych), 45% (17/38 kobiet RhE ujemnych) i 44% (38/86 kobiet RhC ujemnych). Porównanie oznaczeń dla antygeny K z układu Kell wykazało jeden przypadek fałszywego wykrycia antygeny K mimo, że płód go nie posiadał; odsetek ciąż zgodnych wynosił 51% (34/68 kobiet K ujemnych).

**Wnioski.** W 693/694 (99,8%) przypadkach nieinwazyjna diagnostyka grupy krwi płodu prawidłowo przewidziała fenotyp dziecka. W 24% – 51% badanych ciąż u płodu nie występował antygen, do którego skierowane były przeciwciała wykryte u matki; płód nie był zagrożony ChHP/N. W 27% przypadków ciężarnych RhD ujemnych bez przeciwciał, u których przeprowadzono badanie nieinwazyjne genu RHD płodu, zalecono odstępnie od podania immunoglobuliny anti-D w ciąży ze względu na RhD ujemny status dziecka.

## P-19

### Zautomatyzowane badania przeglądowe antygeny HPA-1a u kobiet w ciąży dla identyfikacji ciąż zagrożonych ryzykiem alloimmunologicznej małopłytkowości płodów i noworodków (AIMPN)

Katarzyna Guz (1), Agnieszka Gierszon (1), Agnieszka Orzińska (1), Małgorzata Uhrynowska (1), Patrycja Łopacz (1), Marzena Dębska (2), Izabella Kopeć (1), Ewa Brojer (1)

(1) Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa, (2) Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, II Klinika Położnictwa i Ginekologii, Warszawa

**Wstęp.** Badania antygeny HPA-1a u kobiet w ciąży służą identyfikacji matek HPA-1a ujemnych z ryzykiem wytworzenia przeciwciał

anty-HPA-1a, które są najczęstszą przyczyną alloimmunologicznej małopłytkowości płodu/novorodka (AIMP/N). AIMP/N występuje z częstością 1/1000–2000 urodzeń, a u 1/12500 dzieci dochodzi do wylewu do OUN, co może prowadzić do śmierci lub niepełnosprawności. Cel: Przedstawienie systemu i wyników badań przeglądowych antygeny HPA-1a u kobiet w ciąży opracowanego w ramach programu PREVFNAIT.

**Materiał i metody.** Próbkę krwi (4-5ml na EDTA) kobiet w ciąży pobierano w 260 punktach i dostarczano do IHiT. Badania HPA-1a wykonywano metodą serologiczną (FACS wg Killle i wsp.) lub molekularną (RQ-PCR wg Fičko i wsp.). Wybór metody zależał od czasu dostarczenia (FACS  $\leq 7$  dni; RQ-PCR  $> 7$  dni). Badania FACS wykonywano manualnie (cytometr Canto II, BD) lub automatycznie (pipetor MagNASTARlet, Hamilton + przystawka HTS do Canto II). DNA izolowano na płytkach 96 (Genomic Mini AX BLOOD 96-well Kit lub Chemagic DNA Blood Kit LH) pipetorem Janus (Perkin-Elmer). W badaniach przyjęto algorytm weryfikacji automatycznego wyniku HPA-1a ujemnego metodą manualną, a następnie potwierdzania go metodą genetyczną. Wyniki genetyczne HPA-1bb weryfikowano metodą FACS z kolejnego pobrania krwi.

**Wyniki.** 1) Po zbadaniu 24251 kobiet, zidentyfikowano 591 (2.4%) kobiet o fenotypie HPA-1a ujemnym lub genotypie HPA-1bb. Metodą FACS oznaczono 71% kobiet (17224/24251), z 2.4% (420/17224) kobiet HPA-1a ujemnych, a genetyczną – 7027 kobiet z też 2.4% (171/7027) kobiet HPA-1bb. 2) Przyjęty algorytm potwierdził zgodność wyników fenotypowania i genotypowania u 589/591 kobiet; u 2 fenotyp był HPA-1a ujemny, genotyp HPA-1a/b (sekwencjonowanie w toku). Weryfikacja manualna i genetyczna wyników HPA-1a ujemnych z automatycznego oznaczania antygeny HPA-1a była przydatna w 2.3% próbek, w których metodą automatyczną uzyskano wyniki fałszywie HPA-1a ujemne z powodu silniej hemolizy próbki lub zbyt niskiej liczby płytek krwi w PRP.

**Wnioski.** 1) Automatyzacja badań antygeny HPA-1a umożliwia badania o dużej skali i identyfikację kobiet z ryzykiem konfliktu płytkowego HPA-1a, które stanowią ~2.4% populacji polskiej; badania takie są obecnie dostępne w IHiT 2) Kobiety HPA-1a ujemne muszą być objęte dalszymi badaniami dla oceny ryzyka immunizacji, tak by te z przeciwciałami anty-HPA-1a kierować do leczenia w ośrodku specjalistycznym.

## P-20

### Ocena wybranych wykładników stanu zapalnego u kobiet ciężarnych

Anna Blacha (1), Maria Pioruńska-Stolzmann (1), Mariusz Machczyński (2), Marcin Nowicki (1), Alicja Brożek (1), Alicja Płóciniczak (1), Miłostawa Zowczak-Drabarczyk (1), Kalina Maćkowiak (1), Dorota Formanowicz (1)

(1) Zakład Biochemii Klinicznej i Medycyny Laboratoryjnej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, (2) Poradnia Położniczo-Ginekologiczna Poznań

**Wstęp.** W okresie ciąży dochodzi do częstych zmian składu mikroflory dróg rodnych kobiety. Zmiany te mogą stać się przyczyną

powikłań ginekologiczno-położniczych. Wśród drobnoustrojów powszechnie bytujących w przewodzie pokarmowym i układzie moczowo-płciowym kobiet wskazuje się paciorkowce z grupy B (*Streptococcusagalactiae*, GBS). Kolonizacja GBS dróg rodnych stanowi istotny czynnik ryzyka okołoporodowego zakażenia noworodków, sepsy i zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych.

**Materiał i metody.** Badanie objęło 118 zdrowych kobiet w 35-37 tyg. prawidłowo przebiegającej ciąży. U kobiet wykonano wymaz z przedsionka pochwy i odbytu oraz pobrano krew. Na podstawie wyniku badania mikrobiologicznego podzielono pacjentki na grupy wg klasyfikacji Pawlaczyka (I– z prawidłową czystością pochwy, II– z pośrednią czystością pochwy, III– z nieprawidłową czystością pochwy) oraz ze względu na nosicielstwo GBS (nosicielki (GBS+), brak nosicielstwa (GBS-)). We krwi pacjentek oznaczono: WBC, hsCRP, IL-17, IL-6, TNF- $\alpha$ .

**Wyniki.** Nosicielkami GBS było 19,5% przebadanych kobiet (nosicielstwo GBS w pochwie wynosiło 17,8%, w odbycie 11,0%). Poziom parametrów stanu zapalnego przedstawiono jako medianę (pierwszy-trzeci kwartyl). W grupie I stężenia oznaczanych parametrów wynosiły: WBC  $10^9/L$  8,70 (7,70-10,55), hsCRP mg/L 3,17 (1,93-4,75), IL-17 pg/mL 0,87 (0,81-1,05), IL-6 pg/mL 2,36 (1,66-4,33), TNF $\alpha$  pg/mL 2,19 (1,71-2,66); w grupie II: WBC  $10^9/L$  9,10 (8,40-10,80), hsCRP mg/L 4,15 (2,73-4,80), IL-17 pg/mL 0,76 (0,76-0,95), IL-6 pg/mL 3,88 (2,18-10,36), TNF $\alpha$  pg/mL 2,72 (2,31-2,97); w grupie III: WBC  $10^9/L$  8,90 (8,10-10,20), hsCRP mg/L 2,75 (1,63-4,96), IL-17 pg/mL 0,88 (0,81-1,14), IL-6 pg/mL 1,84 (1,42-3,66), TNF $\alpha$  pg/mL 2,04 (1,66-2,39). Analizując poziom parametrów stanu zapalnego nie wykazano istotnych różnic pomiędzy kobietami GBS+ vs GBS-. Istotna różnica ( $p=0,034$ ) została wykazana pomiędzy grupą II i III w zakresie stężenia IL-6.

**Wnioski.** 1. Stężenia IL-6 we krwi mogłyby być użytecznym parametrem różnicującym pacjentki z pośrednią czystością pochwy od pacjentek z nieprawidłową czystością pochwy. 2. Stwierdzone w badaniu nosicielstwo GBS u zdrowych ciężarnych wskazuje na konieczność wykonywania mikrobiologicznych badań przesiewowych w celu zapobiegania zakażeniom noworodków.

## P-21

### Częstość występowania wybranych mutacji w genach BRCA1 i BRCA2 u kobiet chorych na genetycznie uwarunkowanego raka piersi lub jajnika

Ewa Kwiatkowska, Olga Szczypińska, Joanna Mitura, Aneta Janiec-Jankowska, Dorota Nowakowska, Andrzej Tysarowski

Pracownia Diagnostyki Genetycznej i Molekularnej Nowotworów, Zakład Patologii i Diagnostyki Laboratoryjnej, Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie

**Wstęp.** W 2015 roku w Polsce odnotowano około 17 tys. zachorowań na raka piersi i 3,5 tys. zachorowań na raka jajnika; prawie 6 tys. kobiet zmarło z powodu raka piersi i 2,4 tys. z powodu raka jajnika. Szacuje się, że około 3-5% raków piersi i około 10% raków jajnika jest związanych z nosicielstwem mutacji w genach BRCA1



i BRCA2. Geny te należą do genów supresorowych, kodujących białka biorące udział w naprawie DNA. Celem pracy było porównanie częstości występowania wybranych mutacji genów BRCA1/2 u kobiet chorych na raka piersi i raka jajnika, które zgłosiły się do Poradni Genetycznej Centrum Onkologii w Warszawie w latach 2013-2017.

**Materiał i metody.** Analizę molekularną w kierunku obecności ośmiu mutacji genu BRCA1, nazwy zwyczajowe mutacji: 185delAG, 300T>G, Q563X, 3819del5, 3875del4, 4153delA, 5370C>T, 5382insC oraz mutacji 6174delT genu BRCA2, wykonano u 1001 kobiet chorych na raka piersi (mediana 60 lat, przedział 20–89 lat) i 311 chorych na raka jajnika (mediana 62 lata, przedział 15–78 lat). Genotypowanie wykonano metodą qPCR z użyciem sond TaqMan® lub metodą PCR-dHPLC. Obecność mutacji potwierdzano sekwencjonowaniem metodą Sanger.

**Wyniki.** W grupie kobiet chorych na raka piersi stwierdzono 48 nosicieli mutacji BRCA1/2 (48/1001; 4,8%), natomiast w grupie kobiet z rakiem jajnika 42 nosicielki (42/311; 13,5%). Mutacje genów BRCA1/2 istotnie statystycznie częściej występują u kobiet z rakiem jajnika ( $\chi^2 = 31,6273$ ; pG – w grupie chorych z rakiem piersi stwierdzono ją u 7 nosicieli (15%), a w grupie z rakiem jajnika u 11 nosicieli (26,2%). Mutacja 4153delA występowała rzadko w obu badanych grupach, stwierdzono ją u 1 nosicielki z rakiem piersi i u 3 nosicieli z rakiem jajnika.

**Wnioski.** Powyższe wyniki sugerują, że wśród kobiet z rakiem jajnika ze względu na dużą częstość występowania mutacji w genie BRCA1 wskazane jest wykonanie przesiewowego badania genetycznego. Wyniki takiego badania mogą stanowić podstawę do wyboru odpowiedniej terapii, ale także stanowić podstawę profilaktyki pierwotnej w rodzinie pacjentki. W przypadku negatywnego wyniku należałoby rozważyć zbadanie statusu całego genu BRCA1 i BRCA2 metodą sekwencjonowania następnej generacji.

## P-22

### Identyfikacja mutacji w genach w klastrze alfa globiny z zastosowaniem gap-PCR, MLPA i sekwencjonowania

*Edyta Klimczak-Jajor, Joanna Skulomowska, Paweł Turowski, Katarzyna Guz, Małgorzata Uhrynowska, Ewa Mendek-Czajkowska, Anna Ejduk, Izabella Kopeć, Anna Adamowicz-Salach, Ewa Brojer*

Instytut Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie

**Wstęp.** Klaster genów alfa globiny znajduje się na krótszym ramieniu chromosomu 16 (16p.13.3). Na każdym chromosomie są tu obecne dwa geny kodujące łańcuch alfa ( $\alpha$ ) hemoglobiny: gen HBA2, gen HBA1, a także gen zeta, pseudogeny, gen teta oraz elementy regulatorowe (m.in.HS-40). Występujące tu mutacje (najczęściej delecje jednego lub większej liczby genów, zdecydowanie rzadziej zmiany punktowe) prowadzą do talasemii alfa lub do powstania wariantów strukturalnych hemoglobin. Pacjenci ze zmianami w genach HBA1 i HBA2 mają prawidłowe lub obniżone stężenie HbA2.co uniemożliwia rozpoznanie choroby metodami biochemicznymi. Tylko zastosowanie badań molekularnych pozwala na rozpoznanie talasemii alfa. Celem pracy było opracowa-

nie algorytmu badań molekularnych do zdiagnozowania chorych z prawidłowym lub obniżonym stężeniem HbA2.

**Materiał i metody.** Badania molekularne wykonano w próbkach krwi pobranych od 240 pacjentów z obniżonym lub pozostającym w granicach normy HbA2. DNA wyizolowane od każdego chorego badano w kierunku najczęściej występujących delecji:  $\alpha 3.7$ ,  $\alpha 4.2$ , SEA; MEDI; FIL;  $\alpha 20.5$ , THAI przy pomocy multiplexowej reakcji gap-PCR. Wszystkie uzyskane wyniki z gap-PCR potwierdzano metodą MLPA. U pacjentów, u których nie znaleziono delecji ani multiplikacji genów alfa globiny, wykonano sekwencjonowanie genów HBA1 i HBA2.

**Wyniki.** Zastosowanie metod biologii molekularnej pozwoliło na wykrycie mutacji w genach klastra alfa globiny u 130 z 240 badanych (54%). Delecje stanowiły 90% (117 badanych) wszystkich wykrytych zmian, mutacje punktowe – 5% i multiplikacje genów HBA1 i HBA2 – 5%. Wśród delecji przeważały te, które obejmują dwa geny – wykryto je u 78/117 osób. U 6 z 42 badanych osób wykryto mutacje punktowe.

**Wnioski.** Wśród kilku rodzajów zmian wykrywanych w klastrze alfa globiny u badanych w Polsce chorych, przeważają mutacje delecyjne, co jest zgodne z danymi literaturowymi. Zastosowanie gap-PCR (potwierdzone dodatkowo MLPA) wykazało, że talasemię alfa warunkuje najczęściej jedna z siedmiu powszechnych na świecie delecji. Wykonanie badań molekularnych u chorych z podejrzeniem talasemii alfa jest konieczne do postawienia diagnozy.

## P-23

### Molekularna diagnostyka wirusa HPV – porównanie zestawów diagnostycznych

*Magdalena Traczyk-Borszyńska, Edyta Borkowska, Maciej Borowiec*

Zakład Genetyki Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

**Wstęp.** Wirus brodawczaka ludzkiego (HPV) jest uznawany za główny czynnik etiologiczny raka szyjki macicy. Zastosowanie diagnostyki molekularnej w wykrywaniu infekcji tym wirusem jest niezwykle cennym i skutecznym narzędziem w skriningu nowotworowym.

**Materiał i metody.** Dokonaliśmy porównania trzech komercyjnych testów diagnostycznych przeznaczonych do diagnostyki zakażeń szyjki macicy wirusem HPV, posiadających oznaczenie CE-IVD. Badanie przeprowadzono w 10 próbkach DNA izolowanego z wymazów z szyjki macicy. Dwa z weryfikowanych zestawów diagnostycznych wykrywały DNA wirusa HPV w oparciu o metodę real-time PCR, trzeci natomiast był testem paskowym opartym o metodę odwrotnej hybrydyzacji.

**Wyniki.** Izolaty DNA pierwotnie badane były zestawem do ilościowego oznaczenia wirusa HPV metodą real-time PCR oraz genotypowania typów 16 i 18 (kit I). Z 10 pozytywnych pod względem obecności wirusa HPV próbek, 4 zakwalifikowano jako HPV 16, 5 jako HPV 18 oraz jedną pozytywną dla obu genotypów. Przy użyciu zestawu II (skrining 24 typów z genotypowaniem typów 16 i 18; real-time PCR) tylko 8/10 badanych próbek dały wynik pozytywny. Co więcej, tylko w 5 przypadkach potwierdzono obecność genotypu 16 lub 18 – w pozostałych 3 próbkach wykryto

obecność innych typów wirusa, niemniej należących do grupy wysokiego ryzyka. Przebadanie tych samych izolatów kitem III (odwrotna hybrydyzacja; detekcja 37 genotypów HPV) w 9/10 przypadków, potwierdziło wyniki uzyskane kitem II. Tylko jedna z badanych próbek, pozytywna w analizach z użyciem kitów I i II okazała się być negatywna w badaniu kitem III.

**Wnioski.** Zestawy diagnostyczne wykorzystujące metodę odwrotnej hybrydyzacji są porównywalnie czułe jak kity oparte o technikę real-time PCR. Real-time PCR jest metodą szybszą i mniej pracochłonną niż metoda odwrotnej hybrydyzacji, nie pozwala jednak na dokładne określenie genotypu wirusa (możliwe tylko genotypowanie tylko wybranych typów; w naszym przypadku 16 i 18). Zasadne jest wybieranie kitów diagnostycznych pozwalających na wykrycie możliwie jak największej liczby genotypów wirusa HPV, unikając się w ten sposób błędnego zakwalifikowania próbki pozytywnej pod względem obecności DNA wirusa HPV jako jednego z dwóch najniebezpieczniejszych typów (16 lub 18), gdy w rzeczywistości jest to inny genotyp. Przytoczona analiza pokazuje potrzebę wykonywania w laboratorium medycznym weryfikacji nowo wprowadzanych komercyjnych testów diagnostycznych, pomimo posiadania przez nie certyfikatów CE-IVD.

## **P-24 pro-SAAS nowy biomarker w diagnostyce biochemicznej guza chromochłonnego (pheochromocytoma) – doniesienie wstępne**

*Piotr Glinicki (1), Agnieszka Łebek-Szatańska (1), Lucyna Bednarek-Papierska (1), Magdalena Ostrowska (2), Aleksandra Kruszyńska (1), Wojciech Jeske (1), Wojciech Zgliczyński (1)*

(1) Klinika Endokrynologii CMKP, Szpital Bielański, Warszawa, (2) Pracownia Radioimmunologii, Szpital Bielański, Warszawa

**Wstęp.** Peptydy pro-SAAS i chromogranina A (CgA) należą do rodziny białek – granin i występują w komórkach neuroendokrynnych rdzenia nadnerczy i razem z katecholaminami wydzielane są do krwi. Celem pracy była wstępna ocena przydatności oznaczania stężenia peptydu pro-SAAS u pacjentów z guzem chromochłonnym nadnercza.

**Materiał i metody.** Grupę badaną stanowiło 9 pacjentów (6 kobiet i 3 mężczyzn, w przedziale wieku 36-62 lat) z guzem pheochromocytoma, natomiast grupę kontrolną 27 krwiodawców. U wszystkich badanych wykonano oznaczenie stężenia CgA, pro-SAAS oraz wolnych metanefryn w osoczu. Oznaczenia wykonano przy użyciu metod immunochemicznych: RIA, IRMA, ELISA.

**Wyniki.** Stężenia pro-SAAS, CgA oraz metanefryny i normetanefryny w osoczu u pacjentów z guzem pheochromocytoma wyniosły odpowiednio: 2,79 ng/ml (0,3 – 16,0), 283,9 ng/ml (29,4 – 953,7), 462,9 pg/ml (36 – 1518,0), 265,2 pg/ml (48 - 1149,5). W grupie kontrolnej, stężenia pro-SAA, CgA oraz stężenie metanefryny i normetanefryny wyniosły: 0,87 ng/ml (0,3 – 7,6), 68,5 pg/ml (28,8 – 93,1), 18,9 pg/ml (0 – 71), 28,3 pg/ml (0 – 67,6). Stężenie białka pro-SAAS u pacjentów z guzem było istotnie statystycznie wyższe ( $p < 0,01$ ) w stosunku do grupy kontrolnej.

**Wnioski.** Wstępne wyniki badania wskazują na potencjalną użyteczność peptydu pro-SAAS jako biomarkera w diagnostyce biochemicznej guza chromochłonnego. Badanie będzie nadal kontynuowane w celu zebrania docelowej liczby pacjentów i w efekcie pozwoli na ocenę wartości diagnostycznej tego parametru.

## **P-25 Chromogranina A i B w diagnostyce biochemicznej guzów hormonalnie czynnych wydzielających katecholaminy – doniesienie wstępne**

*Piotr Glinicki (1), Lucyna Bednarek-Papierska (1), Agnieszka Łebek-Szatańska (1), Magdalena Ostrowska (2), Aleksandra Kruszyńska (1), Wojciech Jeske (1), Wojciech Zgliczyński (1)*  
(1) Klinika Endokrynologii CMKP, Szpital Bielański, Warszawa, (2) Pracownia Radioimmunologii, Szpital Bielański, Warszawa

**Wstęp.** Pheochromocytoma jest rzadkim guzem produkującym wiele substancji biologicznie czynnych, takich jak: hormony, peptydy, neuropeptydy i in. Chromograniny A i B są białkami syntetyzowanymi i wydzielanymi przez komórki chromafinowe rdzenia nadnerczy. Celem pracy była wstępna ocena przydatności oznaczania stężenia chromograniny B w diagnostyce guzów wydzielających katecholaminy.

**Materiał i metody.** Badania przeprowadzono u 9 pacjentów (6 kobiet i 3 mężczyzn, w przedziale wieku 36-62 lat) z pheochromocytoma, oraz w grupie kontrolnej u 27 krwiodawców. W obu grupach wykonano oznaczenia stężenia: chromograniny A i B oraz stężenie wolnych metanefryn w osoczu. Oznaczenia wykonano przy użyciu metod immunochemicznych: RIA, IRMA i ELISA.

**Wyniki.** Stężenia chromograniny A i B oraz stężenie metanefryny i normetanefryny w osoczu pacjentów z guzem pheochromocytoma wyniosły odpowiednio: 283,9 ng/ml (29,4 – 953,7), 310,1 (196,2 – 400,0), 462,9 pg/ml (36 – 1518,0), 265,2 pg/ml (48 - 1149,5). W grupie kontrolnej, stężenia CgA, CgB oraz stężenia metanefryny i normetanefryny wyniosły: 68,5 pg/ml (28,8 – 93,1), 258,6 (121,6 – 382,0), 18,9 pg/ml (0 – 71), 28,3 pg/ml (0 – 67,6). Na tym etapie badania nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic ( $p > 0,05$ ) w stężeniu chromograniny B pomiędzy grupą pacjentów z guzem, a grupą kontrolną.

**Wnioski.** Wstępne wyniki badania wykazały, że tylko u części pacjentów z guzem pheochromocytoma stężenie chromograniny B jest wyższe w porównaniu z grupą kontrolną. Badanie będzie kontynuowane w celu zwiększenia liczebności grup badanych.

## **P-26 Sekretogranina II (Sg II) u pacjentów z guzem pheochromocytoma – doniesienie wstępne**

*Piotr Glinicki (1), Lucyna Bednarek-Papierska (1), Agnieszka Łebek-Szatańska (1), Magdalena Ostrowska (2), Aleksandra Kruszyńska (1), Wojciech Jeske (1), Wojciech Zgliczyński (1)*  
(1) Klinika Endokrynologii CMKP, Szpital Bielański,



Warszawa, (2) Pracownia Radioimmunologii, Szpital Bielański, Warszawa

**Wstęp.** Sekretogranina II (SgII) należy do rodziny białek – granin i występuje w komórkach neuroendokrynnych rdzenia nadnerczy jak i w komórkach guza chromochłonnego. Celem pracy była wstępna ocena przydatności oznaczania stężenia sekretograniny II u pacjentów z guzem pheochromocytoma.

**Materiał i metody.** Badania przeprowadzono u 9 pacjentów (6 kobiet i 3 mężczyzn, w przedziale wieku 36-62 lat) z guzem chromochłonnym nadnercza, oraz w grupie kontrolnej – u 27 krwiodawców. W obu grupach wykonano oznaczenia stężenia: CgA, SgII oraz stężenie wolnych metanefryn w osoczu. Oznaczenia wykonano przy użyciu metod immunochemicznych: RIA, IRMA i ELISA.

**Wyniki.** Stężenia SgII, CgA oraz metanefryny i normetanefryny u pacjentów z guzem pheochromocytoma wyniosły odpowiednio: 543,67 pg/ml (169,6 – 1091,6), 283,9 ng/ml (29,4 – 953,7), 462,9 pg/ml (36 – 1518,0), 265,2 pg/ml (48 – 1149,5). W grupie kontrolnej, stężenia SgII, CgA oraz stężenia metanefryny i normetanefryny wyniosły odpowiednio: 529,2 pg/ml (178,8 – 933,8) 68,5 pg/ml (28,8 – 93,1), 18,9 pg/ml (0 – 71), 28,3 pg/ml (0 – 67,6). Na tym etapie badania nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic ( $p > 0,05$ ) w stężeniu sekretograniny II pomiędzy grupą pacjentów z guzem, a grupą kontrolną.

**Wniosek.** Na tym etapie badania nie można ocenić wartości diagnostycznej oznaczania stężenia SgII. Badanie wymaga dalszej kontynuacji, w celu zwiększenia grupy pacjentów z guzem chromochłonnym.

## P-27

### Monitorowanie błędów przedanalitycznych w MLD, metoda procentowa i metoda six-sigma wg IFCC WG-LEPS

Krzysztof Łangowski, Cecylia Nowicka, Dorota Bejger  
Laboratoria Medyczne Bruss grupa ALAB sp. z o.o.

**Wstęp.** Medyczne Laboratoria Diagnostyczne Bruss monitorują błędy przedanalityczne od 2005 roku metodą procentową. W 2015 roku wprowadzono drugą metodę SIX SIGMA. Celem pracy było porównanie tych dwóch względnych metod i wskazanie czy ocena wg. tych metod jest spójna.

**Materiał i metody.** MLD LMBruss sklasyfikowało błędy przedanalityczne na 20 kategorii. Od 2005 dokonuje się zapisów w LSI odnośnie rejestru błędów. Okresowe raporty pozwalają dokonać oceny ilości i procentowego udziału błędów w poszczególnych MLD i u poszczególnych kontrahentów. Monitoruje się zmiany w ilości i procentowym udziale poszczególnych błędów. W 2015 roku przeanalizowano dodatkowo poszczególne kategorie metodą SIX SIGMA oceniając ich stopień akceptowalności wg. skali ocen:  $\geq 5$  bardzo dobra; 4-5 dobra; 3-4 minimum;  $< 3$  nieakceptowalna.

**Wyniki.** Analiza długookresowa w MLD Gdynia wskazuje na zachowanie proporcjonalności pomiędzy średnią ilości błędów, a średnią ilości zleconych badań w miesiącu. W 2005 roku zarejestrowano 336 błędów na 103043 wykonanych badań, stanowiło

to 0,33% udziału badań z błędami. W 2015 i 2016 roku liczby te wynosiły odpowiednio (864; 236770 i 0,36% dla 2015 roku i 813; 257771 i 0,32% dla roku 2016 roku). Największy udział błędów zanotowano w 2010 roku (0,44%), a najniższy w 2008 (0,31%). W okresie od 2010 do 2016 roku obserwowano stały (poza 2015 rokiem) spadek udziału procentowego błędów ( $p < 0,05$ ). Wyniki w poszczególnych latach w tym okresie wynosiły odpowiednio: 0,44; 0,40; 0,35; 0,34; 0,32; 0,36; 0,32. Najczęściej występujące błędy w 2015 i 2016 roku to: brak próbki lub niewłaściwa identyfikacja (31,4% vs 26,6%); brak moczu (20,8% vs 21,5%); skrzep (18,3% vs 20,6%). Natomiast najrzadziej: kod nieczytelny (0,1 vs 0,3); brak skierowania (0,8 vs 1,6) i niewłaściwa próbówka (2,0 vs 1,4). Przeprowadzona w 2015 analiza SIX SIGMA dla najczęściej występujących błędów dała wyniki odpowiednio: 4,6; 4,7 i 4,8, co wskazywało na osiągnięcie oceny dobrej dla każdego z tych błędów. Dla błędów najrzadziej występujących uzyskano odpowiednio 5,9; 5,6; 5,3 wartości SIX SIGMA.

**Wnioski.** Prowadzenie monitoringu występowania błędów przedanalitycznych pozwala MLD utrzymywać kontrolę nad procesem przedanalitycznym i w przypadku zaobserwowania wskaźników pogorszenia nadzoru podjąć działania korygujące. Porównanie wyników analizy procentowej i SIX SIGMA w 2015 roku wskazuje na uzyskiwanie spójnych i akceptowalnych wyników oceny częstości występowania błędów przedanalitycznych w MLD Gdynia.

## P-28

### Stabilność stężenia glukozy w czasie oraz w zależności od rodzaju materiału biologicznego

Lilla Pawlik-Sobecka

Zakład Praktycznej Nauki Zawodu Analityka, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

**Wstęp.** Duże znaczenie dla uzyskania wiarygodnego wyniku stężenia glukozy ma jakość metody analitycznej, wybór odpowiedniego materiału badanego, a także sposób postępowania laboratoryjnego. Podjęto badania mające na celu ocenę różnic stężenia glukozy oznaczonego w surowicy i osoczu krwi pochodzącej od tego samego pacjenta oraz sprawdzenie stabilności stężenia glukozy w tych materiałach w czasie przechowywania.

**Materiał i metody.** Badaniu poddano próbki krwi pobrane od 48 zdrowych ochotników (35 osób było na czczo, 13 po posiłku). Krew żylną pobierano do próbek z antykoagulantami: z K3EDTA, z K3EDTA i NaF w celu uzyskania osocza, oraz z aktywatorem krzepnięcia w celu uzyskania surowicy. Stężenie glukozy oznaczano trzykrotnie: bezpośrednio po pobraniu krwi żyłnej oraz powtórzono w tych samych materiałach po 4 i 24 godz. od momentu pobrania krwi. Analizy porównawczej stężeń w poszczególnych punktach pomiarowych dokonano przy pomocy testu t-Studenta dla par związanych, przyjmując, jako wartość odniesienia stężenia uzyskane w osoczu fluorkowym oznaczone bezpośrednio po pobraniu próbki. Różnice między badanymi grupami przyjęto

za istotne gdy  $p < 0,05$  z zastrzeżeniem, że jeśli średnie różnice między średnimi z obu analizowanych grup były mniejsze niż błąd metody analitycznej uznawano, że nie ma między nimi różnic diagnostycznych.

**Wyniki.** Oznaczenia wykonane bezpośrednio po pobraniu krwi wykazały istotny spadek stężenia glukozy w surowicy krwi w porównaniu do osocza fluorokowego ( $p < 0,001$ ), nie zaobserwowano takiego spadku dla osocza wersenianowego w odniesieniu do fluorokowego ( $p = 0,085$ ). W osoczu fluorokowym przechowywanym wraz z elementami morfotycznymi krwi, zaobserwowano istotne różnice dla 4 godz. ( $p = 0,001$ ) i dla 24 godz. ( $p < 0,001$ ). Różnice te nie były jednak mniejsze niż błąd stosowanej metody (nieistotne z diagnostycznego punktu widzenia). W osoczu wersenianowym przechowywanym wraz z elementami morfotycznymi krwi, zaobserwowano istotne różnice dla 4 godz. ( $p < 0,001$ ) dla 24 godz. ( $p < 0,001$ ). Różnica ta nie była jednak istotna diagnostycznie dla próbek przechowywanych do 4 godz.

**Wnioski.** Stężenie glukozy bezpośrednio po pobraniu krwi należy oznaczać w osoczu fluorokowym lub wersenianowym. W osoczu fluorokowym przechowywanym wraz z elementami morfotycznymi krwi stężenie glukozy jest stabilne przez 24 godziny. Próbkę osocza bez dodatku inhibitora glikolizy muszą zostać poddane analizie do 4 godz. od momentu pobrania krwi.

## P-29

### Ocena stężenia transformującego czynnika wzrostu beta we krwi osób zdrowych w przebiegu fizjologicznego starzenia się ustroju

Katarzyna Komosińska-Vassev (1), Katarzyna Winsz-Szczotka (1), Paweł Olczyk (2), Krystyna Olczyk (1)

(1) Katedra i Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, (2) Zakład Farmacji Aptecznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

**Wstęp.** Nadrodzina transformującego czynnika wzrostu  $\beta$  należy do jednej z najbardziej uniwersalnych rodzin cząsteczek sygnałowych, uczestniczących w wielu procesach biologicznych, włączając proliferację, różnicowanie komórek oraz apoptozę. Zaburzenia ekspresji TGF, a w szczególności izoformy  $\beta 1$ , odnotowywane są w chorobach towarzyszących procesowi starzenia, takich jak choroby nowotworowe, cukrzyca typu 2, osteoporoza czy też choroby neurodegeneracyjne. Nieliczne dane literaturowe odnoszą się do oceny stężenia TGF- $\beta 1$  w płynach ustrojowych w przebiegu procesu starzenia, a uzyskane wyniki są rozbieżne. Stąd też celem pracy była ocena stężenia TGF- $\beta 1$  w przebiegu fizjologicznego starzenia się ustroju w podziale na dekady życia oraz ocena wpływu płci na stężenie oznaczanego czynnika.

**Materiał i metody.** W badaniach wykonanych w trakcie realizacji niniejszej pracy, zmierzono stężenie TGF- $\beta 1$  metodą immunoenzymatyczną w grupie 99 zdrowych osób, obu płci, w tym 43

mężczyzn oraz 56 kobiet w wieku 1-80 lat. Pobrany materiał został podzielony na osiem grup, odpowiadających kolejnym dekadom życia badanych osób.

**Wyniki.** W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, iż stężenie TGF- $\beta 1$  ulega istotnym zmianom ilościowym w przebiegu fizjologicznego starzenia się ustroju. Zaobserwowano dwa okresy zmian: pierwszy wykazujący silną korelację z wiekiem całej badanej populacji oraz w grupie płci męskiej do 30 roku życia i drugi okres, obejmujący osoby powyżej 30 roku życia, w przebiegu którego stężenie analizowanego markera nie ulega istotnym statystycznie zmianom ilościowym. Płeć okazała się nieistotnym czynnikiem względem stężenia TGF- $\beta 1$  w surowicy krwi u osób po 30 roku życia. Przeprowadzona dodatkowo w niniejszej pracy analiza wariancji ANOVA dla układów dwuczynnikowych w celu oceny równoczesnego wpływu płci i wieku na średnie stężenie TGF- $\beta 1$  mierzone w surowicy krwi wskazała, iż interakcja dwóch czynników – płci oraz wieku – nie miała wpływu na stężenie TGF- $\beta 1$  w surowicy krwi.

**Wnioski.** Zważywszy, iż pomiary stężeń TGF- $\beta 1$  mogą stanowić stosunkowo czuły i specyficzny marker dostarczający informacji o postępie chorób związanych z wiekiem podeszłym, uwzględnienie wpływu wieku i dobrane wiekowo przedziały referencyjne TGF- $\beta 1$  w osoczu, zwłaszcza u osób do 30 roku życia, są istotne dla prawidłowej interpretacji oznaczeń krążącego TGF- $\beta 1$  w diagnostyce i ocenie terapii wspomnianych schorzeń.

## P-30

### Ocena poziomu hepcydyny u pacjentów z chorobami krwi kwalifikowanych do przeszczepienia krwiotwórczych komórek macierzystych

Paulina Dziatkiewicz, Lidia Gila, Maria Kozłowska-Skrzypczak

Katedra i Klinika Hematologii i Transplantacji Szpiku Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu

**Wstęp.** Hepcydina (Hep) syntetyzowana głównie w hepatocytach i stąd uwalniana do krążenia. Hormon ten reguluje gospodarkę żelaza w organizmie. U pacjentów hematologicznych kwalifikowanych do przeszczepienia krwiotwórczych komórek macierzystych, poddawanych długotrwałemu leczeniu wpływ Hep, na gospodarkę żelaza nie został dokładnie zbadany. Celem pracy było określenie korelacji pomiędzy stężeniem hepcydyny i podstawowymi parametrami gospodarki żelazowej u tych pacjentów.

**Materiał i metody.** Badania przeprowadzono w grupie 27 chorych na nowotwory hematologiczne (17 kobiet, 10 mężczyzn). Grupę badaną stanowiło 9 chorych z rozpoznaną chorobą limfoproliferacyjną i 18 ze zdiagnozowaną chorobą mieloproliferacyjną. Wykonano oznaczenie: Hep oraz podstawowych parametrów gospodarki żelazowej (Fe, TIBC, sTfR, ferrytyna). Grupę kontrolną stanowiły 33 osoby (25 kobiet, 8 mężczyzn) z CRP  $< 5,0$  mg/L. Krew pobrano do próbek bez antykoagulantu (9,8 ml). Odwirowany materiał zamrożono i przechowano w temperaturze  $-70^{\circ}\text{C}$  do czasu wykonania oznaczenia. Metoda: wykorzystano kompetycyjny test immunoenzymatyczny Hepcidin25 (bioactive)HS ELISA

(DRG Diagnostics). Pozostałe parametry oznaczono przy użyciu standardowych technik laboratoryjnych. Obliczenia wykonano przy użyciu programu Statistica (StatSoft) oraz StaXact (Cytel). Jako poziom istotności przyjęto  $\alpha=0,05$ . Wynik uznano za istotny statystycznie, gdy  $p<\alpha$ . Z uwagi na brak zgodności zmiennych z rozkładem normalnym obliczono test Manna-Whitneya. Aby zbadać zależność pomiędzy zmiennymi obliczono współczynnik korelacji rangowej RS Spearmana.

**Wyniki.** Mediana stężenia hepcydyny w grupie badanej wynosiła 88,30 mg/ml, u chorych z rozpoznaną chorobą limfoproliferacyjną 47,80 mg/ml, z chorobą mieloproliferacyjną 145,30 mg/ml, w grupie kontrolnej – 10,40 mg/ml. Między stężeniem Hep a Fe (RS=0,443,  $p=0,18$ ), ferrytyną (RS =0,88,  $p<0,001$ ) wykazano dodatnią korelację, natomiast między stężeniem Hep a TIBC (RS=-0,677,  $p<0,001$ ), sTfR (RS =-0,444,  $p=0,016$ ) wykazano ujemną korelację.

**Wnioski.** Wykazano istotne statystycznie różnice w poziomie Hep w grupie badanej ( $p=0,011$ ). Wykazano istotne statystycznie różnice między stężeniem hepcydyny w grupie badanej i kontrolnej ( $p<0,001$ ). Na podstawie wykonanych testów statystycznych zaobserwowano zależności pomiędzy analizowanymi parametrami. Im wyższy poziom hepcydyny tym wyższy poziom żelaza oraz ferrytyny. Im wyższy poziom hepcydyny tym niższy poziom TIBC oraz sTfR.

### P-31

#### Wpływ hiperdiploidii i ekspresji antygenu CD123 na skuteczność leczenia indukującego remisję w ostrej białaczce limfoblastycznej u dzieci

Magdalena Pierzyna-Świtała (1), Łukasz Sędek (2), Magdalena Twardoch-Pyka (2), Alicja Sonsala (2), Jan Kulis (2), Joanna Trelńska (3), Ewa Niedzielska (4), Katarzyna Muszyńska-Roślan (5), Maciej Niedźwiecki (6), Iwona Malinowska (7), Andrzej Kołtan (8), Mariola Woszczyk (9), Grażyna Karolczyk (10), Wanda Badowska (11), Elżbieta Kamińska (12), Grażyna Sobol-Milejska (13), Katarzyna Derwich (14), Jerzy Kowalczyk (15), Tomasz Szczepański (2), Bogdan Mazur (1)

(1) Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii w Zabrze, Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, (2) Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii Dziecięcej w Zabrze, Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, (3) Klinika Pediatrii, Onkologii, Hematologii i Diabetologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, (4) Klinika Transplantacji Szpiku, Hematologii i Onkologii Dzieci UM, Wrocław, (5) Klinika Onkologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, (6) Klinika Pediatrii, Hematologii, Onkologii i Endokrynologii UM w Gdańsku, (7) Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii Warszawskiego UM, (8) Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii Collegium Medicum UMK, Bydgoszcz, (9) Oddział Hematologii i Onkologii Chorzowskiego Centrum Pediatrii i Onkologii, (10) Oddział Hematologiczno-Onkologiczny Wojewódzkiego Specjalistycznego Szpitala

Dziecięcego w Kielcach, (11) Oddział Pediatriczny i Hematologiczno-Onkologiczny Wojewódzkiego Specjalistycznego Szpitala Dziecięcego w Olsztynie, (12) Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii Dziecięcej Pomorskiego UM w Szczecinie, (13) Oddział Onkologii, Hematologii i Chemioterapii Kliniki Pediatrii Śląskiego UM, Katowice, (14) Klinika Onkologii, Hematologii i Transplantologii Pediatricznej UM w Poznaniu, (15) Klinika Hematologii i Onkologii Dziecięcej UM w Lublinie

**Wstęp.** CD123 to łańcuch alfa receptora IL-3, którego zwiększoną ekspresję obserwuje się w wielu nowotworach układu krwiotwórczego. Nadekspresja CD123 często występuje w ostrej białaczce limfoblastycznej wywodzącej się z komórek prekursorowych limfocytów B (BCP-ALL) z hiperdiploidią. Cytometryczna metoda oceny liczby chromosomów (ploidii) oraz ekspresji antygenu CD123 w dniu rozpoznania pozwala wyodrębnić grupę pacjentów o lepszym rokowaniu, u których możliwe jest zastosowanie mniej intensywnej terapii.

Cel pracy: Ocena związku między występowaniem hiperdiploidii i ekspresją CD123 na komórkach białaczkowych. Ocena wpływu hiperdiploidii i ekspresji antygenu CD123 na skuteczność leczenia indukującego remisję mierzoną poziomem minimalnej choroby resztkowej (MRD) w BCP-ALL.

**Materiał i metody.** Grupę badaną stanowiło 106 dzieci BCP-ALL w wieku 0-18 lat (mediana 4,3 lata) leczonych w ośrodkach polskiej Grupy ds. Leczenia Białaczki i Chłoniaków. Immunofenotyp badanych komórek został określony przy pomocy 8-kolorowej cytometrii przepływowej zgodnie z protokołem barwienia opracowanym przez konsorcjum Euro-Flow. Barwienie jodkiem propidyny umożliwiło identyfikację komórek o nieprawidłowej ploidiu oraz wyznaczenie indeksu DNA (DI).

**Wyniki.** Nieprawidłową ploidię w postaci hiperdiploidii wykazano u 22/106 dzieci, w tym u 20 pacjentów stwierdzono wysoką hiperdiploidię ( $DI\geq 1,16$ ). Hiperdiploidię zaobserwowano wyłącznie w podtypie common-B-ALL ( $n=15$ ; DI w zakresie 1,11-1,96) oraz pre-B-ALL ( $n=7$ ; DI w zakresie 1,15-1,41). Hiperdiploidii nie zaobserwowano natomiast w podtypie pro-B-ALL. Pacjenci z hiperdiploidią charakteryzowali się wyższą ekspresją antygenu CD123 ( $p<0,001$ ), niższym odsetkiem blastów w szpiku ( $p=0,01$ ) oraz niższym poziomem białych krwinek ( $p=0,003$ ) w dniu rozpoznania względem pacjentów u których nie wykryto zaburzeń w liczbie chromosomów. Nie zaobserwowano związku między ekspresją CD123 w dniu rozpoznania a poziomem MRD w dniu 15.

**Wnioski.** Ekspresja CD123 charakteryzuje się znaczną heterogennością w BCP-ALL. Nadekspresja CD123 często towarzyszy BCP-ALL z hiperdiploidią chromosomów, dzięki czemu CD123 może stanowić istotny czynnik predykcyjny dla pacjentów z BCP-ALL o korzystnym rokowaniu.



## P-32

### Badanie mechanizmu przeciwbiałaczkowego działania statyn

Justyna Chlebowska-Tuz

Zakład Immunologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, Laboratorium Medycyny Doświadczalnej Centrum Nowych Technologii

**Wstęp.** Statyny (inhibitory HMG-CoA) stosowane w leczeniu zaburzeń lipidowych hamują proliferację i indukują apoptozę komórek nowotworowych m.in. ostrej białaczki szpikowej (OBSz). Mechanizm odpowiedzialny za przeciwbiałaczkową aktywność statyn nie został dotąd wyjaśniony, wiadomo jednak, że mogą one różnicować blasty w dojrzałe komórki szeregu mielopoezy. W obliczu doniesień o przeciwbiałaczkowym działaniu związków aktywujących AMPK (kinaza aktywowana przez AMP), jednego z głównych białek odpowiedzialnych za homeostazę energetyczną organizmu, sprawdzono, czy w wyniku inkubacji komórek OBSz ze statynami dochodzi do aktywacji AMPK i wyjaśniono rolę tego enzymu w procesie różnicowania.

**Materiał i metody.** Badania prowadzono z wykorzystaniem hodowli ustalonych linii komórkowych OBSz: KG1 i MOLM14 – odpowiednio: M1 i M5a wg FAB). Ocenę cytotoksycznego działania atorwastatyny i simwastatyny, przeprowadzono za pomocą barwienia 7AAD z odczytem cytometrycznym. Ocenę aktywacji kinazy AMPK (fosforylację treoniny 172) wykonano za pomocą techniki Western Blotting. Różnicowanie komórek OBSz pod wpływem statyn zbadano za pomocą oceny morfologii komórek w preparatach mikroskopowych zabarwionych metodą MGG, sprawdzono także błonową ekspresję CD11b, CD14 i CD15 oraz oceniono aktywność oksydazy NADPH. W części eksperymentów zastosowano związek AICAR – analog AMP.

**Wyniki.** W badaniach stosowano stężenia leków, które są osiągnięte w surowicy pacjentów leczonych inhibitorami reduktazy HMG-CoA. Wykazano, że statyny zwiększają aktywność kinazy AMPK w komórkach OBSz. Wykazano cytotoksyczne oraz indukujące różnicowanie działanie atorwastatyny w stężeniu 20  $\mu$ M i simwastatyny w stężeniu 15  $\mu$ M na komórki linii MOLM14. Linia KG1, była niewrażliwa na cytotoksyczne i różnicujące działanie statyn. Dla linii MOLM14 wykazano potęgowanie działania cytotoksycznego simwastatyny przy nasilonej przez zastosowanie związku AICAR aktywacji AMPK (żywołność komórek 70% vs 10%). Aktywacja AMPK związkiem AICAR indukowała różnicowanie komórek linii KG1 jednak kombinacja statyn ze związkiem ACAR nie nasilała tego zjawiska.

**Wnioski.** Wrażliwość komórek OBSz na cytotoksyczne działanie statyn jest zależna od ich stopnia zróżnicowania. Aktywacja AMPK w komórkach OBSz jest jednym z mechanizmów przeciwbiałaczkowego działania statyn. Jednoczesna inkubacja statyn z analogiem AMP znacząco zmniejsza przeżycie komórek OBSz wrażliwych na cytotoksyczne działanie statyn, jednak nie nasila procesu różnicowania.

## P-33

### Ocena fagocytozy krwinek czerwonych dawców krwi i pacjentów z wrodzonymi niedokrwistościami hemolitycznymi z zastosowaniem cytometrii przepływowej

Anna Stachurska, Adrianna Łoniewska-Lwowska, Katarzyna Koza, Katarzyna Gmerek, Jadwiga Fabijańska-Mitek  
Zakład Immunohematologii, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

**Wstęp.** Nieprawidłowe lub opłaszczone przeciwciałami krwinki czerwone są niszczone wewnątrznaczyniowo przez układ dopełniacza lub pozanaczyniowo w śledzionie przez makrofagi. We wrodzonych niedokrwistościach hemolitycznych: membranopatiach i hemoglobinopatiach oraz w wyniku starzenia się krwinek czerwonych mechanizm ich usuwania z krążenia nie jest ostatecznie poznany. Podjęto badania nad immunologicznym podłożem hemolizy w wymienionych przypadkach.

**Materiał i metody.** Wdrożono badanie erytrofagocytozy metodą cytometrii przepływowej. Badano próbki krwi pacjentów z wrodzoną mikrocytozą ( $n = 15$ ) i sferocytozą ( $n = 14$ ) oraz dawców ( $n = 30$ ) świeże oraz przechowywane przez 42 dni w postaci koncentratów krwinek czerwonych (KKCz) w banku krwi. Erytrocyty znakowano swoistymi przeciwciałami anti-CD235a, monocyty izolowane z krwi dawców, odpowiadające makrofagom, przeciwciałami anti-CD14. Dodatkowo badano krwinki czerwone po opłaszczeniu ich autoprzeciwciałami typu ciepłego klasy IgG uzyskanymi drogą elucji z krwinek pacjentów. Po inkubacji krwinek czerwonych z monocytami przeprowadzano ocenę cytometryczną z użyciem FACSCanto II i oprogramowania FACSDiva (BD, USA). Mierzono liczbę krwinek czerwonych i monocytów, które weszły w reakcję. Do analizy statystycznej zastosowano programy: Graph Pad, Statistica 9.0 (Statsoft), test t-Studenta.

**Wyniki.** Stwierdzono statystycznie istotne różnice w odsetku pochłoniętych przez monocyty opłaszczonych przeciwciałami sferocytów:  $32,1 \pm 6,7\%$  w stosunku do prawidłowych erytrocytów:  $7,8 \pm 2,5\%$  ( $p < 0,05$ ). Odsetek monocytów z pochłoniętymi przechowywanymi 2 dni i następnie uczulonymi krwinkami wynosił średnio:  $16,5 \pm 1,3\%$  i był statystycznie istotnie mniejszy niż krwinek w ostatnim dniu przechowywania KKCz, czyli  $30,0 \pm 3,3\%$ . W przypadku erytrocytów nieopłaszczonych autoprzeciwciałami stwierdzono silniejsze oddziaływanie monocytów ze sferocytami oraz przechowywanymi 42 dni krwinkami dawców w stosunku do kontrolnych prawidłowych krwinek, odpowiednio:  $17,4 \pm 5,0\%$  vs  $2,6 \pm 0,5\%$  oraz  $18,1 \pm 2,0$  vs  $4,5 \pm 0,9\%$ .

**Wnioski.** Ocena erytrofagocytozy nowoczesną metodą cytometryczną może być przydatna w badaniach mechanizmów hemolizy, w diagnostyce laboratoryjnej wrodzonych niedokrwistości hemolitycznych oraz starzenia się krwinek czerwonych przeznaczonych do przetoczenia.



**P-34****Pierwszy przypadek nieimmunologicznego obrzęku płodu (HbBart's) w wyniku alfa talasemii zdiagnozowany w Polsce**

Joanna Skulimowska, Paweł Turowski, Edyta Klimczak-Jajor, Marzena Dębska, Hanna Pyl, Katarzyna Guz, Małgorzata Uhrynowska, Ewa Brojer

Instytut Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie

**Wstęp.** HbBart'shydropsfetalis (HbBart's HF) to najcięższa postać alfa-talasemii, występująca u homozygot, u których doszło do delecji genów HBA1 i HBA2. Może to być spowodowane mutacją FIL, THAI, 20.5 czy SEA. Ta ostatnia jest najbardziej rozpowszechniona w południowo-wschodniej Azji. Całkowity brak genów HBA1 i HBA2 skutkuje brakiem HbF w życiu płodowym, a po urodzeniu brakiem HbA. Transfuzje dopłodowe są konieczne, aby utrzymać płód przy życiu. Po narodzinach dziecko nadal jest zależne od transfuzji aż do momentu przeprowadzenia przeszczepu komórek macierzystych. Przedstawiamy opis pierwszego przypadku obrzęku płodu będącego wynikiem delecji genów alfa globiny zdiagnozowanego w Polsce przy zastosowaniu metod genetycznych.

**Materiał i metody.** Krew do badań pobrano w trakcie kordocentezy po zdiagnozowaniu u płodu w czasie rutynowych badań USG niedokrwiistości wymagającej wykonania transfuzji dopłodowej. Było to dziecko rodziców pochodzenia wietnamskiego. Wykonano badania biochemiczne (elektroforeza hemoglobin na żelach agarozowych w środowisku w kwaśnym i zasadowym, rozdział hemoglobin metodą HPLC) oraz badania genetyczne: MLPA i gap-PCR.

**Wyniki.** Wykazano, że u płodu dominującą hemoglobina jest HbBart's, a pozostałą frakcją stanowi HbA; HbA stanowiło ok. 33%, natomiast HbBart's ok. 65%. Frakcje HbA2 i HbF stanowiły razem mniej niż 2%. Prawidłowe hemoglobiny pochodziły z przeprowadzonej transfuzji dopłodowej. Dzięki badaniom genetycznym: gap-PCR oraz MLPA wykryto, że badany płód ma homozygotyczną postać delecji SEA (-SEA/-SEA).

**Wnioski.** Wraz z migracją ludności, alfa-talasemia jest obecna na całym świecie, w tym w Polsce i musi być uwzględniona w diagnostyce różnicowej niedokrwiistości w naszym kraju. Skuteczna diagnostyka HbBart's HF powinna prowadzić do wdrożenia odpowiednich metod terapii u płodu i u narodzonego dziecka.

**P-35****Wpływ lipoprotein wysokiej gęstości (HDL) na uwalnianie materiału powierzchniowego z lipoprotein bardzo niskiej gęstości (VLDL) podczas ich lipolizy pod wpływem lipazy lipoproteinowej**

Ewa Wieczorek, Agnieszka Ćwiklińska, Agnieszka Kuchta, Barbara Kortas-Stempak, Anna Gliwińska, Kamil Dąbkowski, Maciej Jankowski

Zakład Chemii Klinicznej, Gdański Uniwersytet Medyczny

**Wstęp.** Zmniejszona wydajność lipolizy VLDL pod wpływem lipazy lipoproteinowej (LPL) jest jednym z głównych mechanizmów rozwoju hipertriglicydemii, niezależnego czynnika ryzyka zgonu

z przyczyn sercowo-naczyniowych. W poprzednich badaniach wykazaliśmy, że wydajność lipolizy VLDL zależy od stężenia triglicerydów (TG) w VLDL oraz obecności HDL. Celem prezentowanej pracy była ocena wpływu HDL na stopień uwalniania materiału powierzchniowego z VLDL, tj. fosfolipidów (FL) i cholesterolu wolnego (CHW), podczas lipolizy VLDL pod wpływem LPL.

**Materiał i metody.** W badaniu użyto surowice pozostające po wykonaniu zleconych badań laboratoryjnych w Laboratorium Centralnym Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku. Z surowic o stężeniu TG > 200 mg/dl metodą ultrawierowania izolowano VLDL, z surowic o stężeniu cholesterolu HDL (HDL-CH) > 50 mg/dl metodą precypitacji i ultrawierowania izolowano HDL. VLDL inkubowano z LPL (1 godz., 37°C, stężenie VLDL-TG w mieszaninach reakcyjnych 50 mg/dl lub 100 mg/dl, VLDL-TG:LPL 90:0,48 mg/dl, albumina 2%), bez lub w obecności HDL (VLDL CH:HDL-CH 1:1). Po inkubacji VLDL oddzielano od HDL i pozostałych produktów reakcji metodą immunoprecypitacji z przeciwciałami anty-apo B, a następnie oznaczano stężenie TG, FL i CHW oraz wyliczano odsetek (%) zhydrolizowanych TG i % pozostałych składników lipidowych uwolnionych z VLDL. Wyniki dla poszczególnych grup porównano testem t-Studenta dla prób zależnych. Znamienność statystyczną przyjęto na poziomie  $p < 0,05$ .

**Wyniki.** Dla VLDL o stężeniu TG równym 50 mg/dl odsetek zhydrolizowanych TG nie zależał od obecności HDL i wyniósł średnio 93%. Odsetek FL i CHW uwolnionych z VLDL podczas lipolizy wyniósł 41% i 46% ( $p > 0,05$ ) oraz 5% i 16% ( $p > 0,05$ ), odpowiednio dla mieszanin reakcyjnych bez i z HDL. Dla VLDL o stężeniu TG równym 100 mg/dl, w obecności HDL odsetek zhydrolizowanych VLDL-TG wyniósł średnio 83% i był o 25% wyższy, w porównaniu do mieszanin bez HDL ( $p < 0,001$ ). Wyższej wydajności lipolizy VLDL w obecności HDL towarzyszył wyższy odsetek uwolnionych składników lipidowych: dla FL było to średnio 18% i 42% ( $p < 0,01$ ), dla CHW – 3% i 25% ( $p < 0,001$ ), odpowiednio dla mieszanin bez i z HDL.

**Wnioski.** Wydajność lipolizy TG oraz stopień uwalniania materiału powierzchniowego VLDL są ze sobą powiązane i zależą od obecności HDL i stężenia TG. HDL pełnią ważną rolę w katabolizmie VLDL, a ich niedobór we krwi może być związany z rozwojem hipertriglicydemii.

**P-36****Wpływ statyn na stężenie apolipoproteiny E u chorych z przewlekłą chorobą nerek leczonych zachowawczo**

Agnieszka Ćwiklińska (1), Monika Cackowska (2), Ewa Wieczorek (1), Agnieszka Kuchta (1), Ewa Król (2), Barbara Kortas-Stempak (1), Anna Gliwińska (1), Kamil Dąbkowski (1), Maciej Jankowski (1)

(1) Zakład Chemii Klinicznej, Gdański Uniwersytet Medyczny, (2) Katedra i Klinika Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych, Gdański Uniwersytet Medyczny

**Wstęp.** Inhibitory reduktazy HMG-CoA (statyny) obniżają stężenie cholesterolu całkowitego (ChC) oraz cholesterolu LDL a w mniejszym stopniu wpływają na stężenie triglicerydów (TG) w surowicy.

Statyny zmniejszają śmiertelność sercowo-naczyniową u chorych z przewlekłą chorobą nerek (PChN) leczonych zachowawczo. Mechanizm korzystnego działania statyn w PChN nie jest w pełni poznany. Szczególnie zainteresowanie budzi wpływ statyn na stężenie i metabolizm apolipoprotein, m.in. apolipoproteiny E. ApoE nie jest obecna w LDL, ale jest składnikiem lipoprotein transportujących TG (chylomikronów, VLDL i IDL) oraz HDL. Wykazuje działanie przeciwmiażdżycowe, ale stwierdzono, że jej podwyższone stężenie może być związane ze zwiększonym ryzykiem sercowo-naczyniowym. Celem badania była ocena wpływu statyn na stężenie apoE u chorych z PChN leczonych zachowawczo.

**Materiał i metody.** W badaniu wzięło udział 91 chorych z PChN w stadium G3a-4. Stężenie apoE oznaczano w surowicy oraz w HDL (HDL-apoE). ApoE w lipoproteinach zawierających apoB (nie-HDL apoE) wyznaczano jako różnicę: apoE – HDL-apoE. Na podstawie stężenia ChC w surowicy oraz deklaracji przyjmowania statyny (S) chorych sklasyfikowano w 4 grupach: (1) ChC < 190 mg/dl, S (-), n=9; (2) ChC < 190 mg/dl, S (+), n=32; (3) ChC > 190 mg/dl, S (-), n=34; (4) ChC > 190 mg/dl, S (+), n=16. Wyniki przedstawiono jako medianę i zakres: 5-95 percentyl. Różnice między grupami oceniono testem Kruskala-Wallisa. Znamienność statystyczną przyjęto na poziomie p < 0,05.

**Wyniki.** Stężenie apoE w surowicy wyniosło 3,3 (2,6-4,8), 3,4 (2,2-6,0), 4,2 (3,0-7,7) i 4,3 (2,5-8,1) mg/dl, odpowiednio dla grup 1, 2, 3 i 4. Stężenie nie-HDL apoE wyniosło 2,2 (1,3-3,6), 2,1 (1,4-3,9), 2,7 (1,6-4,4) i 2,8 (1,6-6,1) mg/dl. Dla osób przyjmujących statyny z ChC < 190 mg/dl (grupa 2) mediany stężenia apoE i nie-HDL apoE były niższe, w porównaniu do chorych z hipercholesterolemią nieprzyjmujących statyn (grupa 3) (p < 0,01). Dla stężenia HDL-apoE nie stwierdzono różnic pomiędzy grupami. 32% chorych deklarujących przyjmowanie statyn nie uzyskało pożądanego stężenia ChC, co mogło być związane z niestosowaniem i/lub zbyt niską dawką leku.

**Wnioski.** Uzyskaniu pożądanego stężenia ChC pod wpływem statyn towarzyszyło obniżenie stężenia apoE, poprzez obniżenie jego stężenia w lipoproteinach zawierających apoB, co wskazuje na korzystny wpływ statyn na metabolizm lipoprotein bogatych w TG.

## P-37

### Ocena wpływu statyn na stężenie i dystrybucję apolipoproteiny A-I i apolipoproteiny A-II u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek leczonych zachowawczo

Agnieszka Kuchta (1), Agnieszka Ćwiklińska (1), Monika Cackowska (2), Ewa Wieczorek (1), Ewa Król (2), Barbara Kortas-Stempak (1), Anna Gliwińska (1), Kamil Dąbkowski (1), Maciej Jankowski (1)

(1) Zakład Chemii Klinicznej, Gdański Uniwersytet Medyczny, (2) Katedra i Klinika Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych, Gdański Uniwersytet Medyczny

**Wstęp.** Dyslipidemia to jeden z podstawowych czynników zwiększających ryzyko incydentów sercowo-naczyniowych u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek (PChN), co tłumaczy powszechność

stosowania terapii hipolipemizującej w tej grupie chorych. Uznane korzyści terapii statynami wiążą się przede wszystkim z obniżeniem stężenia lipoprotein niskiej gęstości (LDL). Wiele badań wskazuje jednak dodatkowe korzystne efekty terapii inhibitorami reduktazy HMG-CoA, między innymi jakościowe zmiany w cząstkach lipoprotein wysokiej gęstości (HDL). W PChN obok typowych nieprawidłowości takich jak hipercholesterolemia, hipertriglicerydemia obserwuje się dysfunkcyjność cząstek HDL, które wraz z postępem choroby tracą swoje kardioprotekcyjne właściwości. Mechanizmy prowadzące do zaburzeń składu i funkcji cząstek HDL w PChN nie zostały w pełni poznane, uważa się jednak, że istotną rolę mogą odgrywać zamiany dystrybucji i metabolizmu podstawowych białek tej frakcji lipoprotein – apolipoproteiny A-I (apoA-I) i apolipoproteiny A-II (apoA-II). Celem prezentowanego projektu była ocena wpływu terapii statynami na stężenie i dystrybucję apoA-I i apoA-II u pacjentów z PChN leczonych zachowawczo.

**Materiał i metody.** W badaniu wzięło udział 65 chorych z PChN w stadium G3a-4 i hipercholesterolemią sklasyfikowanych w dwóch grupach: grupa I – pacjenci nie przyjmujący leków hipolipemizujących (n=34) oraz grupa II – pacjenci podlegający terapii statynami (n=31). U wszystkich badanych oznaczono całkowite stężenie apoA-I, apoA-II, stężenie frakcji HDL zawierającej apoA-I a nie zawierającej apoA-II (LpA-I) a także oceniono stężenie frakcji HDL zawierającej apoA-I i apoA-II (LpA-I:A-II). Dane przedstawiono jako średnią ± odchylenie standardowe. Różnice między grupami oceniono testem t-Studenta dla prób niezależnych. Znamienność statystyczną przyjęto na poziomie istotności p < 0,05.

**Wyniki.** Analizowane grupy mimo znaczących różnic w stężeniu cholesterolu całkowitego (244±35 vs 163±20 mg/dl; p < 0,05), cholesterolu LDL (164±37 vs 94±17 mg/dl; p < 0,05) nie różniły się znamienne stężeniem cholesterolu HDL (51±12 vs 47±12 mg/dl). Nie wykazano także różnic w stężeniu apoA-I (171±30 vs 163±23 g/l) i apoA-II (33±7 vs 32±6 g/l). Brak istotnego wpływu statyn odnotowano także analizując stężenie frakcji LpA-I (56±21 vs 54±15 g/l) i LpA-I:A-II (114±21 vs 109±18 g/l).

**Wnioski.** Uzyskane wyniki nie potwierdzają istotnego wpływu statyn na dystrybucję i stężenie apoA-I i apoA-II u pacjentów z PChN leczonych zachowawczo.

## P-38

### Rozkład populacji cząstek HDL u pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek na podstawie rozdziału elektroforetycznego PAGE

Anna Gliwińska (1), Agnieszka Ćwiklińska (1), Monika Cackowska (2), Ewa Król (2), Barbara Kortas-Stempak (1), Ewa Wieczorek (1), Agnieszka Kuchta (1), Kamil Dąbkowski (1), Maciej Jankowski (1)

(1) Zakład Chemii Klinicznej, Gdański Uniwersytet Medyczny, (2) Katedra i Klinika Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych, Gdański Uniwersytet Medyczny

**Wstęp.** W przewlekłej chorobie nerek (PChN) wraz z progresją choroby wzrasta ryzyko rozwoju miażdżycy i jej powikłań, głównych przy-

czyn zgonów w tej grupie chorych. Najnowsze badania pokazują, że w PChN dochodzi do zaburzeń w obrębie lipoprotein wysokiej gęstości (HDL). HDL są heterogenną grupą cząstek, różniących się m.in. wielkością i ruchliwością elektroforetyczną, jak również potencjałem działania przeciwmiażdżycowego. Celem pracy było porównanie wielkości cząstek HDL u chorych w różnych stadiach PChN.

**Materiał i metody.** W badaniu wzięło udział 28 chorych z PChN leczonych zachowawczo, w stadium PChN 3a-4. HDL rozdzielano metodą elektroforezy dwukierunkowej (2D-PAGE); I kierunek: żel agarozowy 0,75%; II kierunek: żel poliakrylamidowy 2-25%, warunki niedenaturujące. Po rozdziale 2D-PAGE przeprowadzano elektrotransfer oraz immunodetekcję apolipoproteiny AI. Normalność rozkładu oceniano za pomocą testu Shapiro-Wilka, wyniki przedstawiają medianę średnicy cząstek. Znamienność różnicy między grupami oceniano testem Kruskala-Wallisa. Znamienność statystyczną przyjęto na poziomie  $p < 0,05$ . W rozdziałach 2D-PAGE wyodrębniono subpopulacje HDL o ruchliwości  $\text{pre}\beta$  oraz  $\alpha$ .

**Wyniki.** U 36% chorych wykazano obecność małych cząstek  $\text{pre}\beta_1$ -HDL (6,9 nm). U 61% chorych stwierdzono obecność dużych cząstek  $\text{pre}\beta_2$ -HDL, wśród których wyodrębniono subpopulacje:  $\text{pre}\beta_2$ -1 (12,6 nm),  $\text{pre}\beta_2$ -2 (11,4 nm) oraz  $\text{pre}\beta_2$ -3 (10,2 nm). U wszystkich chorych stwierdzono obecność 4 subpopulacji HDL o ruchliwości  $\alpha$ , tj.  $\alpha_1$ -HDL (10,2 nm),  $\alpha_2$ -HDL (8,7 nm),  $\alpha_3$ -HDL (8,0 nm) oraz  $\alpha_4$ -HDL (7,6 nm). Średnica HDL u chorych w stadium 4 PChN była znamiennej mniejsza od średnicy HDL u chorych w stadium 3a ( $p < 0,05$ ). Różnice wielkości były najwyraźniej widoczne w obrębie największych cząstek, tj.  $\text{pre}\beta_2$ -HDL, dla których mediany średnic HDL wyniosły 11,8; 11,3 i 11,2 nm, odpowiednio dla stadium PChN 3a, 3b i 4 ( $p = 0,03$ ). W przypadku  $\alpha$ -HDL, dla chorych w stadium 4 mediana średnicy cząstek była niższa w porównaniu do pozostałych grup (8,4 nm vs 8,5 i 8,9 nm), ale nie osiągnięto poziomu znamienności statystycznej ( $p = 0,08$ ).

**Wnioski.** Wraz z zaawansowaniem PChN następuje obniżenie wielkości frakcji  $\alpha$ -HDL i  $\text{pre}\beta_2$ -HDL, co może być związane ze zmniejszeniem potencjału przeciwmiażdżycowego HDL i zwiększonym ryzykiem rozwoju miażdżycy w tej grupie chorych.

### P-39

#### Porównanie skuteczności leczenia dyslipidemii wśród kobiet i mężczyzn w ogólnopolskiej populacji 13 727 pacjentów pozostających pod opieką 440 lekarzy POZ. Wyniki badania LIPIDOGRAM2015

Jacek Józwiak (1), Beata Boruta (1), Agnieszka Boruta (1), Ahmed Manasar (1), Eugenia Bielińska-Bujniewicz (1), Mirosław Mastej (2), Maciej Banach (3)

(1) Śląskie Laboratoria Analityczne; Instytut Nauk o Zdrowiu i Żywieniu, Politechnika Częstochowska, (2) Komitet Sterujący badania LIPIDOGRAM2015 & LIPIDOGEN2015, (3) Zakład Nadciśnienia Tętniczego, Katedra Nefrologii i Nadciśnienia Tętniczego, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

**Wstęp.** Zaburzenia lipidowe w Polsce i na świecie często nie są traktowane przez pacjentów z należytą uwagą, zaś efekty tera-

peutyczne, wynikające z zalecania właściwej diety i zmiany stylu życia oraz wdrażania przez lekarzy leczenia farmakologicznego mogą być różne w zależności od płci.

**Cel:** Ocena i porównanie skuteczności leczenia dyslipidemii w populacji kobiet i mężczyzn w oparciu o wyniki „Ogólnopolskiego badania epidemiologicznego zaburzeń lipidowych oraz wybranych czynników ryzyka chorób sercowo-naczyniowych w warunkach Podstawowej Opieki Zdrowotnej – LIPIDOGRAM2015 & LIPIDOGEN2015”.

**Materiał i metody.** Pacjenci POZ w wieku  $> 18$  r.ż. obojga płci, zgłaszający się z dowolnego powodu medycznego do 440 lekarzy-badaczy w Polsce w 2015/2016 roku. Przesiewowa ocena rozpowszechnienia czynników ryzyka sercowo-naczyniowego wśród pacjentów pozostających w 2015/2016 roku pod opieką lekarzy POZ, połączona z laboratoryjną oceną rozpowszechnienia zaburzeń lipidowych oraz oceną skuteczności leczenia dyslipidemii.

**Wyniki.** Do badania włączono 13 724 pacjentów POZ. Kobiety stanowiły 63% badanych. Średni wiek osób włączonych do obserwacji – 56,3 lat. Średnie stężenia TC wśród kobiet i mężczyzn leczonych z powodu dyslipidemii wyniosły odpowiednio 196 mg/dl i 186 mg/dl ( $p < 0,001$ ). Średnie stężenia LDL dla kobiet i mężczyzn – 120 mg/dl i 115 mg/dl ( $p < 0,001$ ). Średnie stężenia TG w populacji kobiet i mężczyzn – 151 mg/dl i 183 mg/dl ( $p < 0,001$ ). Odsetek pacjentów ze stężeniem TC  $< 190$  mg/dl odpowiednio dla kobiet i mężczyzn wyniósł 52% i 59% ( $p < 0,001$ ). Odsetek kobiet i mężczyzn ze stężeniami LDL  $< 115$  mg/dl wyniósł odpowiednio 54% i 56% ( $p = \text{NS}$ ). Odsetek kobiet i mężczyzn ze stężeniami TG  $< 150$  mg/dl wyniósł odpowiednio 63% i 54% ( $p < 0,001$ ). Wg najnowszych wytycznych ESC/EAS 2016 (PTL/KLRwP/PTK 2016) frakcja HDL nie stanowi celu terapeutycznego.

**Wnioski.** 1. Wśród leczonych z powodu dyslipidemii kobiety w porównaniu do mężczyzn prezentowały wyższe średnie stężenia TC i LDL oraz niższe stężenia TG 2. Odsetek osiągnięcia referencyjnych stężeń LDL był zbliżony w populacji kobiet i mężczyzn (NS). Skuteczność leczenia podwyższonego stężenia TG była wyższa w populacji kobiet.

### P-40

#### Wartość prognostyczna NLR, PLR i LMR u chorych na raka gardła i krtani

Zofia Stasik (1), Anna Mucha-Matecka (2), Ewa Wójcik (1), Urszula Rychlik (1), Jadwiga Tarapacz (1), Jan Kanty Kulpa (1)

(1) Zakład Analityki i Biochemii Klinicznej, Centrum Onkologii-Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Oddział w Krakowie, (2) Klinika Onkologii, Centrum Onkologii-Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Oddział w Krakowie

**Wstęp.** Celem podjętych badań była ocena wartości prognostycznej wskaźników stanu zapalnego u chorych na raka gardła i krtani.

**Materiał i metody.** Badania morfologii krwi wykonano w grupie 145 chorych z histologicznie potwierdzonym rakiem gardła lub krtani. Grupę referencyjną stanowiło 50 osób zdrowych w zbliżonym do chorych przedziale wieku.

**Wyniki.** U chorych na raka gardła i krtani przy braku istotnych różnic dla liczby leukocytów, neutrocytów, limfocytów, monocy-



tów i płytek krwi stwierdzano istotnie wyższe wartości NLR oraz istotnie niższe wartości LMR w porównaniu do grupy kontrolnej ( $p < 0,04$ ;  $p < 0,03$ , odpowiednio) przy braku istotnych różnic dla wskaźnika PLR. Podwyższone wartości NLR obserwowano u 24,8%, PLR u 15,2%, a obniżone wartości LMR u 16,6% chorych. W badanej grupie chorych obserwowano istotną dodatnią korelację pomiędzy NLR a PLR ( $r = 0,6101$ ,  $p = 0,00$ ) oraz istotną odwrotną korelację pomiędzy LMR i NLR jak i LMR i PLR ( $r = -0,4279$ ,  $p = 0,000$ ;  $r = -0,3622$ ,  $p = 0,000$ , odpowiednio). Ze względu na nieporównywalność stopnia zaawansowania chorych na raka gardła i raka krtani nie analizowano istotności różnic pomiędzy badanymi wskaźnikami z uwzględnieniem lokalizacji guza. U chorych w wyższym stadium zaawansowania (III+IV), w porównaniu do pozostałych, stwierdzano istotnie wyższe wartości NLR i PLR ( $p < 0,02$ ;  $p < 0,0009$ , odpowiednio) przy braku istotnych różnic dla LMR. Chorzy z T3+T4 cechowali się istotnie wyższymi wartościami NLR i PLR oraz istotnie niższymi LMR w porównaniu do tych z T1+2 ( $p < 0,003$ ;  $p < 0,0006$ ;  $p < 0,04$ , odpowiednio). U chorych z zajętej przetrutowo węzłami chłonnoymi stwierdzano istotnie wyższe wartości NLR i PLR ( $p < 0,01$ ;  $0,0007$ , odpowiednio) przy braku istotnych różnic dla LMR. Analiza jednoczynnikowa wykazała, że istotny wpływ na czas przeżycia bezobjawowego chorych na raka gardła i krtani miało wyższe stadium zaawansowania, cecha T3+T4, zajęte węzły chłonne, wartość NLR powyżej 2,8, PLR powyżej 150 oraz LMR poniżej 3,7. Na podstawie analizy wieloczynnikowej stwierdzono, że niekorzystnym czynnikiem rokowniczym w tej grupie chorych jest stadium zaawansowania (III+IV) oraz wartość LMR poniżej 3,7. Ponadto, chorzy w stadium zaawansowania I+II z NLR powyżej 2,8 jak i ci z LMR poniżej 3,7 cechowali się istotnie krótszym czasem przeżycia bezobjawowego ( $p < 0,0003$ ;  $p < 0,001$ , odpowiednio).

**Wniosek.** U chorych na raka gardła i krtani niezależnymi, niekorzystnymi czynnikami prognostycznymi przeżycia bezobjawowego są stadium zaawansowania oraz LMR.

## P-41

### Ocena przydatności diagnostycznej MMP-9 i TIMP-1 we wczesnych stadiach raka piersi na podstawie analizy ROC

Monika Zajkowska, Emilia Lubowicka, Sławomir Ławicki  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

**Wstęp.** Rak piersi jest jednym z najbardziej rozpowszechnionych nowotworów wśród kobiet. Rozwój guza zostaje zainicjowany poprzez nieprawidłowe podziały pojedynczych komórek spowodowane mutacjami genów kodujących białka uczestniczące w cyklu komórkowym. Metody wykorzystywane w diagnostyce onkologicznej umożliwiają wykrycie zmiany dopiero wtedy, gdy guz osiągnie masę około 1 grama. Liczba nowych przypadków i zgonów z powodu raka piersi wzrasta nie tylko wśród kobiet w okresie post-menopauzalnym, lecz także u młodszych pacjentek. Jest to najczęściej związane ze zbyt późnym rozpoznaniem choroby, dlatego też wczesna diagnoza rokuje większą skuteczność terapii i znacząco wydłuża czas ich przeżycia. W związku z tym, niezbędne jest poszukiwanie wczesnych markerów zmian

nowotworowych. Przypuszcza się, że niektóre metaloproteiny i ich inhibitory mogą pełnić znaczącą rolę w rozwoju raka sutka, co związane jest z degradacją macierzy zewnątrzkomórkowej. W związku z tym, celem pracy była ocena przydatności diagnostycznej MMP-9 oraz TIMP-1 we wczesnych stadiach zaawansowania raka piersi.

**Materiał i metody.** Grupę badaną stanowiło 60 kobiet ze zdiagnozowanym I lub II stopniem zaawansowania raka piersi. Grupę kontrolną natomiast stanowiło 30 kobiet zdrowych oraz 30 kobiet ze zmianami łagodnymi. Badane parametry zostały oznaczone w osoczu krwi metodą immunoenzymatyczną (ELISA), a marker porównawczy (CA 15-3) metodą chemiluminescencyjną (CMIA). Przydatność diagnostyczna została określona w oparciu o parametry takie jak czułość, swoistość oraz wielkość pola pod krzywą ROC (AUC).

**Wyniki.** Na podstawie analizy otrzymanych wyników badań stwierdzono, że zarówno w I jak i II stadium zaawansowania, oba badane parametry wykazały wyższe wartości czułości (MMP-9: I – 80%; II – 90%; TIMP-1: I – 85%; II – 75%) i AUC (MMP-9: I – 0.602; II – 0.678; TIMP-1: I – 0.566; II – 0.640) niż rutynowo stosowany marker CA 15-3 (czułość I – 65%; II – 75%; AUC: I – 0.494; II – 0.586). W przypadku swoistości, najwyższą wartość osiągnął dotychczas stosowany marker (75%). Łączna analiza badanych parametrów i CA 15-3 wykazała wzrost wartości czułości diagnostycznej i spadek w wartościach swoistości i AUC.

**Wnioski.** Wyniki te sugerują przydatność obu badanych parametrów w diagnostyce raka piersi, co może stanowić cenne badanie kliniczne pod postacią panelu diagnostycznego stosowanego we wczesnej diagnostyce raka piersi.

## P-42

### Prognostyczne znaczenie albuminy i białka C-reaktywnego u chorych na raka regionu głowy i szyi poddanych radioterapii

Dorota Nazorek, Jolanta Mrochem-Kwarciak, Tomasz Rutkowski, Andrzej Wygoda, Aleksandra Chmura, Dominika Leś, Zofia Kołosa, Krzysztof Skłodowski  
Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Oddział Gliwice

**Wstęp.** Powszechnie stosowane czynniki kliniczne często są niewystarczające dla trafnej oceny prognozy i predykcji w radioterapii (RT) chorych na raka regionu głowy i szyi (RRGiSz). Istotny udział wśród markerów agresywności guza nowotworowego, wpływających na rokowanie oraz wybór optymalnego leczenia zajmują białka ostrej fazy. Celem pracy jest ocena stężenia albuminy (ALB), białka C-reaktywnego (CRP) oraz wskaźników wyliczanych tj.: wskaźnik ryzyka niedożywienia (NRI) oraz Glasgow Prognostic Score (GPS) jako czynników prognostycznych radioterapii chorych na RRGiSz.

**Materiał i metody.** Badaną grupę stanowiło 185 pacjentów z rozpoznaniem płaskonabłonkowym rakiem gardła środkowego (43%), gardła dolnego (13%), oraz krtani (43%). Chorych leczono radykalnie z zastosowaniem definitywnej RT (51%) lub jednoznacznej radiochemioterapii (49%). Miejscowe zaawansowanie



guza T1-2 oraz T3-4 stwierdzono odpowiednio u 95 (51%) i 90 (49%) chorych. Przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych (N+) były obecne u 112 (61%) chorych. Skuteczność leczenia oceniano jako całkowitą remisję guza (CR) lub niewyleczenie bądź nawrót lokoregionalny (N/N). Chorzy u których stwierdzono przerzut odległy (11%) lub drugi pierwotny nowotwór (5%) zostali wyłączeni z analizy. Oznaczenia białek wykonano w surowicy chorych przed (CRP, ALB) leczeniem. Dodatkowo dla każdego chorego na podstawie stężenia ALB i CRP wyliczono wartość wskaźnika GPS oraz wykorzystując stężenie ALB i wagę chorego przed i po leczeniu – wartość NRI.

**Wyniki.** Mediana obserwacji wynosiła 40 m-cy, u 53% chorych stwierdzono CR, u 31% N/N. Wykazano ujemną korelację pomiędzy stężeniem ALB i zaawansowaniem T ( $p=0,009$ ). W grupie chorych z N/N obserwowano istotnie niższe stężenie ALB ( $p=0,02$ ) i wskaźnika NRI ( $p=0,03$ ) oraz istotnie wyższe wartości wskaźnika GPS ( $p=0,04$ ) w porównaniu do chorych z CR.

**Wnioski.** Niskie stężenie albuminy przed leczeniem wiąże się z bardziej zaawansowanym nowotworem. Uzyskane wyniki sugerują udział białek ostrej fazy w procesie progresji nowotworu. Hipoalbuminemia, niedożywienie oraz wyższy wskaźnik stanu zapalnego (GPS) są niekorzystnymi czynnikami prognostycznymi, świadczącymi o podwyższonym ryzyku niewyleczenia lub wznowy.

## P-43

### Ocena stężenia selektyny P w surowicy kobiet chorych na raka piersi

*Anna Thielemann (1), Aleksandra Baszczuk (1), Emilia Dybska (1), Lena Bielawska (1), Anna Dżumak (1), Aleksandra Ludziejewska (1), Grażyna Kasprzak (1), Sebastian Żurawski (2), Paweł Kurzawa (2), Sylwia Grodecka-Gazdecka (3), Ewa Wysocka (1)*

(1) Katedra i Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, (2) Zakład Patomorfologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, (3) Katedra i Klinika Onkologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu

**Wstęp.** Selektyna P należy do cząsteczek adhezyjnych wytwarzanych w ziarnistościach a płytek krwi i zaktywowanych komórkach śródbłonna naczyniowego. W warunkach fizjologicznych uczestniczy w procesie przylegania leukocytów do powierzchni endotelium i trombocytów. Odgrywa ważną rolę w patologii chorób sercowo-naczyniowych. Prowadzone obecnie badania naukowe mają na celu określić udział selektyny P w procesach nowotworzenia i powstawania przerzutów. Celem pracy była ocena stężenia rozpuszczalnej formy cząstki adhezyjnej selektyny P (sP-selektyny) w surowicy kobiet chorych na pierwotnego raka piersi z uwzględnieniem uznanych czynników prognostycznych takich jak: zaawansowanie kliniczne choroby, stopień złośliwości histologicznej guza, stan okolicznych węzłów chłonnych pachowych (N0,N1) oraz wielkość guza pierwotnego.

**Materiał i metody.** Badania przeprowadzono u kobiet chorych na raka piersi (RP; n=120) w wieku 29-89 lat (średnia 56 lat) przed

zabiegiem chirurgicznym, leczonych w Katedrze i Klinice Onkologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Grupę kontrolną stanowiły zdrowe kobiety (K; n=40) w wieku 27-87 lat (średnia 52 lata). W oparciu o system klasyfikacji TNM utworzono podgrupy Rp-I stopień (n=53), Rp-II stopień (n=45), Rp-III stopień (n=22). Stężenie sP-selektyny oznaczano w surowicy metodą immunoenzymatyczną ELISA w oparciu o testy firmy R&D Systems (UK), na czytniku mikroplótek Tecan Sunrise (Austria). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programu Statistica v.10. Wyniki przedstawiono jako medianę: zakres międzykwartylowy. Zastosowano testy nieparametryczne U Manna-Whitney'a lub Kruskal-Wallisa, w zależności od ilości porównywanych grup.

**Wyniki.** Wykazano istotnie wyższe stężenie sP-selektyny u pacjentek z rakiem piersi w porównaniu z grupą kontrolną (198,2:126,8-241,6 ng/ml vs 83,7:71,1-95,7 ng/ml;  $p=0,001$ ). Obserwowano istotny wzrost poziomu sP-selektyny wraz ze stopniem zaawansowania klinicznego choroby, w podgrupach od Rp-I do Rp-III stopnia ( $p=0,001$ ). Podobnie, narastające stężenie sP-selektyny uzyskano w badanych podgrupach wraz ze wzrostem złośliwości histologicznej ( $p=0,0016$ ) i wielkości guza ( $p=0,0005$ ). W grupie chorych z przerzutami do węzłów chłonnych pachowych (N1) otrzymano wyższe stężenia selektyny P w porównaniu z grupą kobiet bez przerzutów (N0) ( $p=0,001$ ).

**Wnioski.** Oznaczanie stężenia sP-selektyny u kobiet chorych na raka piersi może stanowić uzupełnienie uznanych czynników prognostycznych stosowanych w tym schorzeniu.

## P-44

### Prognostyczne znaczenie stężenia osteopontyny (OPN) i hemoglobiny (Hb) u chorych na raka regionu głowy i szyi (RRGiSz) poddanych radio i radiochemioterapii

*Jolanta Mrochem-Kwarciak, Tomasz Rutkowski, Andrzej Wygoda, Regina Deja, Łukasz Boguszewicz, Krzysztof Składowski*

Centrum Onkologii – Instytut, Oddział Gliwice

**Wstęp.** Uznane czynniki prognostyczne w RRGiSz nie opisują w sposób dostateczny indywidualnej charakterystyki guza. OPN i Hb przypuszczalnie mogą być związane z hipoksją nowotworową. Ponadto, OPN uznano za istotny marker związany z tworzeniem przerzutów. Celem pracy była ocena wartości prognostycznej tych oznaczeń przed i po terapii u pacjentów z RRGiSz.

**Materiał i metody.** Badaniem objęto 251 chorych hospitalizowanych z powodu raka gardła środkowego (39%), gardła dolnego (13%), krtani (44%) lub jamy ustnej (4%), w okresie od stycznia 2009 do sierpnia 2013 r. Chorych zakwalifikowano do samodzielnej radioterapii (48%) lub radiochemioterapii (52%). Miejsce zaawansowanie guza T1, T2, T3 oraz T4 stwierdzono odpowiednio u 15 (6%), 112 (45%), 74 (29%) i 50 (20%) chorych. Przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych N0, N1 N2 i N3 stwierdzono odpowiednio u 99 (40%), 26 (10%), 105 (42%) i 21 (8%) chorych, (w badanej grupie nie stwierdzono przerzutów odległych). OPN i Hb zostały zmierzone w osoczu lub krwi pełnej przed leczeniem

i natychmiast po zakończeniu leczenia. Wykonano analizę korelacji pomiędzy wskaźnikami i stopniem klinicznego zaawansowania choroby stosując test U Manna-Whitney'a. Dla oceny prawdopodobieństwa przeżycia całkowitego (OS) zastosowano metodę Kaplan-Meier. Analizę jednoczynnikową krzywych przeżycia przeprowadzono testem log-rank.

**Wyniki.** Wykazano dodatnią korelację pomiędzy OPN przed leczeniem i cechą T ( $p=0,024$ ) oraz ujemną korelację pomiędzy Hb i cechą T ( $p=0,001$ ). Nie stwierdzono zależności pomiędzy OPN i cechą N ( $p=0,58$ ), natomiast istniała ujemna korelacja pomiędzy Hb i cechą N ( $p=0,0001$ ). Zaobserwowano istotną różnicę pomiędzy OPN w osoczu mierzonym przed ( $67,9$  ng/ml) i po leczeniu ( $97,8$  ng/ml) ( $p=0,0001$ ), jak i również znaczącą różnicę pomiędzy Hb mierzonym przed ( $13,9$  g/dl) i po terapii ( $12,2$  g/dl) ( $p=0,0001$ ). Wykazano istotnie statystycznie niekorzystny wpływ wysokiego wyjściowego OPN ( $p=0,019$ ) i niskiej wyjściowo Hb ( $p=0,04$ ) na OS. Również po leczeniu OPN ( $p=0,02$ ) i Hb ( $p=0,001$ ) były związane z OS. Dodatkowo stwierdzono, że OPN po leczeniu było istotnie większe u chorych z stwierdzonymi przerzutami odległymi ( $p=0,015$ ).

**Wnioski.** Podwyższone stężenie OPN i obniżone stężenie Hb przed leczeniem wiąże się z bardziej zaawansowanym nowotworem. OPN po leczeniu może odgrywać ważną rolę w progresji guza i w tworzeniu przerzutów. Wysokie stężenie OPN i niskie stężenie Hb przed i po leczeniu predysponują do zwiększonego ryzyka zgonu.

## P-45

### Przydatność wskaźników stanu zapalnego dla predykcji i prognozy u chorych na raka regionu głowy i szyi

*Magdalena Latos, Jolanta Mrochem-Kwarciak, Tomasz Rutkowski, Andrzej Wygoda, Aleksandra Chmura, Zofia Kołosa, Agata Celejewska, Krzysztof Skłodowski*  
Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

**Wstęp.** Pomimo widocznego postępu metod diagnostycznych i terapeutycznych stosowanych u chorych na płaskonabłonkowego raka regionu głowy i szyi (RRGiSz) u dużego odsetka chorych dochodzi do niepowodzenia leczenia związanego z: niewyleczeniem lub wznową miejscową i/lub regionalną, przerzutami do narządów odległych czy powstaniem wtórnego, pierwotnego nowotworu. Dodatkowym problemem w tej grupie chorych jest nasilenie podczas radioterapii ostrego popromiennego odczynu błony śluzowej. Duże znaczenie w aspekcie rokowania chorych ma toczący się stan zapalny, dlatego celem pracy była weryfikacja użyteczności wskaźników zapalnych u chorych na RRGiSz.

**Materiał i metody.** Analizowaną grupę 185 chorych, z rozpoznaniem płaskonabłonkowym rakiem gardła środkowego (43%), gardła dolnego (14%), oraz krtani (43%), zakwalifikowano do radio- lub chemio-radioterapii. U 51% badanych stwierdzono guza w stopniu zaawansowania T1-2, u pozostałych 49% w stopniu T3-4. Cechę N0 stwierdzono u 39% chorych, cechę N+ u 61%. Oznaczenia morfologii krwi wraz z wzorem odsetkowym krwinek

białych wykonano przed i po leczeniu. Dla każdego chorego na podstawie wartości bezwzględnej liczby neutrofilii do limfocytów uzyskano parametr NLR (neutrophil to lymphocyte ratio).

**Wyniki.** Mediana obserwacji wynosiła 40 m-cy, u 53% chorych stwierdzono całkowitą remisję choroby (CR), u 31% chorych – niepowodzenie lokoregionalne, u 11% chorych – przerzuty odległe, a u 5% drugi wtórny nowotwór. Analiza jednoczynnikowa wykazała istotnie niekorzystny wpływ na czas przeżycia wolnego od choroby (DFS) podwyższonego wskaźnika NLR oznaczonego po leczeniu ( $p=0,02$ ). Ponadto analiza wieloczynnikowa potwierdziła, że w badanej grupie chorych wysoka wartość NLR ( $p=0,01$ ) oraz podwyższona liczba krwinek białych ( $p=0,04$ ) oznaczone po leczeniu są niezależnymi niekorzystnymi czynnikami czasu przeżycia całkowitego (OS).

**Wnioski.** NLR oznaczone po leczeniu jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym, świadczącymi o podwyższonym ryzyku niewyleczenia, wznowy lub wystąpienia przerzutu odległego. Zmiany wskaźników zapalnych tj. wzrost liczby leukocytów, neutrofilii, a spadek limfocytów po zastosowanym leczeniu pozwalają na wyselekcjonowanie grupy chorych o szczególnie złym rokowaniu.

## P-46

### Bcl-2 jako partner białkowy galektyny-3 w komórkach czerniaka

*Małgorzata Pokrywka (1), Anna Lityńska (2)*

(1) Katedra Biochemii Klinicznej CMUJ w Krakowie, (2) Zakład Biochemii Glikokoniuugatów, Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych UJ w Krakowie

**Wstęp.** Czerniak jest jednym z najgroźniejszych nowotworów skóry. Trwają badania nad znalezieniem nowych markerów prognostycznych przydatnych w jego diagnostyce. Galektyna-3 (gal-3) bierze udział w adhezji międzykomórkowej i adhezji komórek do macierzy zewnątrzkomórkowej, w cyklu komórkowym, różnicowaniu komórek, obróbce mRNA i apoptozie. Gal-3 wpływa również na rozwój nowotworów i ich zdolność do przerzutowania. Poprzez aktywność antyapoptotyczną wpływa również na oporność komórek nowotworowych na stosowane terapie. Gal-3 jest wskazywana jako potencjalny prognostyczny marker pierwotnego czerniaka, jednak nieznanne są mechanizmy działania gal-3 w komórkach tego nowotworu. Celem badań było wykazanie bezpośredniego oddziaływania pomiędzy gal-3 a znanym supresorem apoptozy, białkiem bcl-2, w komórkach ludzkiego czerniaka i poszerzenie wiedzy na temat mechanizmów działania gal-3 w komórkach czerniaka.

**Materiał i metody.** Do badań wykorzystano komórki linii WM-266-4 ludzkiego czerniaka traktowane i nie traktowane cisplatyną ( $25$   $\mu$ M/24 h) oraz uzyskane z nich homogenaty białkowe. W celu wykazania występowania bezpośredniego oddziaływania pomiędzy gal-3 i bcl-2 przeprowadzono immunoprecypitację białek przeciwciałami przeciwko gal-3 oraz przeciwciałami przeciwko bcl-2 a następnie immunodetekcję gal-3 i bcl-2 w otrzymanych immunoprecypitatach (IP) i supernatantach (SN). W mikroskopie konfokalnym zaprezentowano komórkową lokalizację obu białek.

**Wyniki.** W IP anty gal-3 metodą immunodetekcji wykazano obecność białka bcl-2 a w IP anty bcl-2 wykazano obecność gal-3. Dodatkowo zmierzono stosunek intensywności prążków dla gal-3 w IP anty bcl-2 do intensywności prążków dla gal-3 w SN i uzyskano wyniki: średnia stosunków intensywności prążków dla gal-3 z dwóch eksperymentów dla komórek nie traktowanych cisplatyną – 1,2 (SD 0,38), dla komórek traktowanych cisplatyną 2,42 (SD 0,9). W mikroskopie konfokalnym wykazano obecność gal-3 i bcl-2 zarówno w cytoplazmie jak i jądrach komórkowych.

**Wnioski.** W komórkach WM-266-4 ludzkiego metastatycznego czerniaka skóry dochodzi do bezpośredniego oddziaływania pomiędzy gal-3 a bcl-2. Różnice w stosunkach intensywności prążków dla gal-3 świadczą o zwiększeniu oddziaływania pomiędzy gal-3 a bcl-2, białkiem supresorowym apoptozy, w komórkach WM-266-4 traktowanych cisplatyną. Do interakcji pomiędzy tymi białkami może dochodzić zarówno w cytoplazmie jak i jądrze komórkowym badanych komórek.

## P-47

### The role of IL-6 and sCD40l as biomarkers in colorectal cancer advancement

*Violetta Dymicka – Piekarska*

Zakład Laboratoryjnej Diagnostyki Klinicznej Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

**Introduction.** The participation of inflammation in the progression of cancer has been the subject of research for many years. The purpose of the study was to establish whether IL-6, CD40L concentrations may be independent biomarkers of colorectal cancer and whether they may reflect a clinical advancement. We also assess the potential correlations of the inflammatory parameters tested with tumor size and the presence of metastasis.

**Material i methods.** We used enzyme-linked immunosorbent assay to assess plasma concentrations of IL-6 and sCD40L in 53 patients with colorectal cancer (CRC) and in 25 healthy subjects. The study group was divided into subgroups according to TNM classification.

**Results.** We observed a statistical significant increase of IL-6 and sCD40L in CRC patients as compared to control group ( $p < 0.001$ ). We also found much higher sCD40L concentration in patients with metastasis as compared to patients without metastasis, with cancer limited to intestinal wall ( $p = 0.005$ ). The IL-6 concentration correlated with tumor size and weak with PLT count ( $R = 0.277$ ,  $p = 0.05$ ). The sCD40L concentration moderately correlated with PLT count ( $R = 0.465$ ,  $p = 0.01$ ), and also with tumor size and presence of metastasis. Interestingly, the highest area under the ROC curve was observed for IL-6 (0.906) as compared for sCD40L (0.895), however both values indicate their high diagnostic usefulness.

**Conclusions.** Our findings show a possible involvement inflammation in colorectal cancer development and indicators of the presence of inflammation in colorectal cancer patients, and sCD40L could be associated with CRC advancement.

## P-48

### Stężenia CEA, CA 15-3 i sHER2 u chorych na raka piersi w zależności od ekspresji receptorów steroidowych i receptora typu 2 naskórkowego czynnika wzrostu

*Ewa Wójcik, Wojciech Kamzol, Jadwiga Tarapacz, Beata Sas-Korczyńska, Urszula Rychlik, Jan Kanty Kulpa*  
Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Krakowie

**Wstęp.** W ocenie rokowania chorych na raka piersi istotne zależności przypisuje się m.in. ekspresji receptorów steroidowych oraz receptora typu 2 naskórkowego czynnika wzrostu. Celem podjętych badań była ocena częstości podwyższonych stężeń CEA, CA 15-3 i sHER2 u chorych na raka piersi zakwalifikowanych do leczenia operacyjnego.

**Material i metody.** Badania stężenia CEA, CA 15-3 i sHER2 przeprowadzono w grupie chorych na raka piersi w różnych stadiach zaawansowania, zakwalifikowanych do leczenia operacyjnego oraz w grupie referencyjnej 40 zdrowych kobiet. Ze względu na ekspresję receptorów steroidowych i HER2 wyodrębniono 4 podgrupy tj. podgrupa A. ER [+], PgR [+/-] i HER2 [-]; podgrupa B. ER [+], PgR [+/-] i HER2 [+]; podgrupa C. ER [-], PgR [-] i HER2 [+]; podgrupa D. ER [+], PgR [-] i HER2 [-].

**Wyniki.** W badanej grupie chorych na raka piersi w porównaniu do grupy referencyjnej stwierdzono istotne wyższe stężenia CEA, CA 15-3 i sHER2, jednak wartości AUC wyznaczonymi dla tych markerów krzywych ROC były zbliżone i relatywnie niskie. Wyższe od wartości odcinających stężenie CEA miało 9 (5,1%), CA 15-3 25 (22,5%) i sHER2 13 (11,7%) chorych. Analiza jednoczynnikowa wykazała istotny wpływ na przeżycie chorych stanu węzłów chłonnych i stężenia CA 15-3. Ocena za okres 10 lat przebiegu krzywych przeżycia chorych pomiędzy grupami wyodrębnionymi ze względu na ekspresję receptorów steroidowych i HER2 potwierdziła istotnie gorsze rokowanie chorych zarówno z potrójnie dodatnią jak i potrójnie ujemną ekspresją analizowanych receptorów w porównaniu do pozostałych. Jednak odsetki 5-cio letnich przeżyć dla grupy A i C były zbliżone i relatywnie lepsze w porównaniu do grupy B i D. W podgrupie chorych z ER [-], PgR [-] i HER2 [+] (C) obserwowano istotnie wyższe stężenie sHER2 a także częstość podwyższonych wyników markera w porównaniu do podgrupy ER [+], PgR [+/-] i HER2 [-] (A). W podgrupie ER [+], PgR [-] i HER2 [-] (D) odsetek podwyższonych wyników CA 15-3 był istotnie wyższy w porównaniu do podgrupy A jak i C.

**Wnioski.** Istotnie gorszym rokowaniem cechują się chore zarówno z potrójnie dodatnią jak i potrójnie ujemną ekspresją analizowanych receptorów. O ile podwyższone stężenie CA 15-3 jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym w badanej grupie chorych na raka piersi to dla stężenia sHER2 nie obserwowano takiej zależności.



## P-49

### Wpływ wieku i masy ciała (BMI) na nasilenie reakcji zapalnej u chorych na raka piersi

Jadwiga Tarapacz (1), Ewa Wójcik (1), Jerzy W. Mituś (2), Urszula Rychlik (1), Zofia Stasik (1), Jan Kanty Kulpa (1)

(1) Zakład Analityki i Biochemii Klinicznej Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Krakowie, (2) Klinika Chirurgii Onkologicznej Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Krakowie

**Wstęp.** Rak piersi należy do najczęstszych nowotworów złośliwych u kobiet. Częstość zachorowań wykazuje tendencję do wzrostu wraz z wiekiem a także istotne znaczenie przypisuje się tendencjom do otyłości. Zarówno otyłość jak i zaawansowany wiek uznawane są równocześnie za czynniki sprzyjające rozwojowi stanu zapalnego. Celem podjętych badań u chorych na raka piersi była ocena wpływu wieku i masy ciała na poziom wybranych wskaźników stanu zapalnego tj. suPAR, CRP, IL-6.

**Materiał i metody.** Badania stężenia suPAR, CRP i IL-6 przeprowadzono w grupie 217 chorych na raka piersi zakwalifikowanych do leczenia operacyjnego, w tym 78 przed (35,9%) i 139 po 55 roku życia (64,1%) a także w grupie referencyjnej 47 zdrowych kobiet. W badanej grupie chorych na raka piersi wartości BMI niższe od 30 miało 142 (65,4%) a wyższe 75 chorych (34,6%). U 87 chorych (40,1%) wykazano obecność przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych.

**Wyniki.** U chorych na raka piersi w porównaniu do grupy referencyjnej stwierdzano istotnie wyższe stężenia suPAR i IL-6 przy braku istotnych różnic w poziomie CRP. U chorych obserwowano istotne zależności pomiędzy wiekiem a stężeniem suPAR ( $p=0,0001$ ), IL-6 ( $p=0,0010$ ) i wartościami BMI ( $p=0,0001$ ) oraz pomiędzy BMI i stężeniem suPAR ( $p=0,021$ ), CRP ( $p=0,014$ ), IL-6 ( $p=0,003$ ). U chorych w wieku  $>55$  lat w porównaniu do chorych młodszych stwierdzano istotnie wyższe stężenie suPAR, CRP i IL-6 oraz wartości BMI. W grupie chorych z BMI  $>30$  w porównaniu do chorych z BMI 30 w porównaniu do chorych z niższymi wartościami tego wskaźnika. U chorych w wieku  $>55$  lat pomiędzy grupami wyodrębnionymi ze względu na wartości BMI obserwowano istotnie wyższe stężenia CRP i IL-6 u chorych z BMI  $>30$ . Brak było istotnych różnic w stężeniach badanych wskaźników stanu zapalnego pomiędzy grupą młodszych i starszych od 55 lat chorych z wartościami BMI  $>30$ . W grupie chorych w wieku  $>55$  lat i z wartościami BMI  $>30$  obserwowano istotnie wyższy aniżeli w pozostałych grupach odsetek badanych z zajętej regionalnymi węzłami chłonnymi.

**Wnioski.** U chorych na raka piersi zarówno wiek jak i BMI wydają się mieć istotny wpływ na nasilenie reakcji zapalnej. Jednak czynnik wieku wydaje się w tym zakresie mieć silniejszy wpływ aniżeli BMI.

## P-50

### Przydatność diagnostyczna metaloproteinazy 2. i 9. (MMP-2, MMP-9) oraz cytokiny VEGF u pacjentek z rakiem endometrium

Sławomir Ławicki (1), Emilia Lubowicka (2), Monika Sobolewska (1), Ewa Gacuta, (3), Ewa Będowska (4), Sylwia Kozłowska (5), Maciej Szmitkowski (1), Lech Chrostek (1)

(1) Zakład Diagnostyki Biochemicznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, (2) Samodzielna Pracownia Kosmetologii, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, (3) Klinika Perinatologii, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, (4) Zakład Diagnostyki Hematologicznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, (5) Laboratorium Wojewódzkiego Szpitala Zespołonego w Białymstoku

**Wstęp.** Cytokiny i metaloproteinazy (MMPs) regulują procesy wzrostu oraz proliferacji komórek nowotworowych, a także ułatwiają tworzenie przerzutów, stymulując dalszą progresję nowotworu. Stwarza to możliwość ich wykorzystania w diagnostyce różnych nowotworów, tj. raka piersi, a także nowotworów złośliwych narządu rodowego, w tym raka endometrium. Celem badań była ocena stężenia oraz przydatności diagnostycznej wybranych metaloproteinaz (MMP-2 i MMP-9) oraz cytokiny VEGF u pacjentek z rakiem endometrium.

**Materiał i metody.** Badaniem objęto 70 chorych z gruczolakorakiem endometrium (*carcinoma endometrioides*). Grupę kontrolną stanowiło 40 zdrowych kobiet. Materiałem do badań było osocze ubogopłytkowe. Oznaczenia badanych parametrów wykonano metodą ELISA, a markera CA 125 – metodą chemiluminescencyjną CMIA. Określono przydatność diagnostyczną poprzez wyliczenie czułości i swoistości diagnostycznej, wartości predykcyjnych wyniku dodatniego i ujemnego (PPV, NPV) oraz mocy diagnostycznej badań (AUC, funkcja ROC).

**Wyniki.** Wykazano znamienne wyższe stężenia MMP-9 i VEGF oraz markera porównawczego (CA 125) u chorych na raka endometrium ( $p=0,024$ ;  $p=0,014$ ;  $p=0,0084$ ). Wszystkie badane parametry wykazywały wysoką swoistość diagnostyczną, podobnie jak CA 125 (po 90%). Najwyższą czułość diagnostyczną (68%), PPV (91%) i NPV (61%) oraz moc diagnostyczną badań (AUC=0,821) wykazał VEGF i były to wartości wyższe lub podobne jak CA 125 (66%, 90%, 60%, 0,814). Czułość diagnostyczna, NPV i AUC wyraźnie wzrastały przy jednoczesnej analizie badanych parametrów z CA 125, a zwłaszcza przy łącznej analizie wszystkich parametrów (89%, 78%, 0,891).

**Wnioski.** Uzyskane wyniki sugerują możliwość zastosowania badanych parametrów w diagnostyce raka endometrium, jednakże tylko przy łącznej analizie z CA 125, jako nowy panel diagnostyczny w diagnostyce tego nowotworu.



**P-51****Ocena przydatności klinicznej markera neoangiogenezy – VEGF u chorych na płaskonabłonkowego raka płuca**

Malwina Czech, Monika Giglok, Bożena Jochymek, Regina Deja, Barbara Masłyk, Jolanta Mrochem-Kwarciak  
Centrum Onkologii – Instytut Im. M. Skłodowskiej – Curie, Oddział W Gliwicach

**Wstęp.** Jedną z istotnych kwestii we współczesnej onkologii jest poszukiwanie biomarkerów agresywności nowotworu, które umożliwiłyby wskazanie fenotypu związanego z większą inwazyjnością guza. VEGF (naczyniowo-śródbłonkowo czynnik wzrostu) jest czynnikiem, który bierze udział w procesie neoangiogenezy, zwiększając jednocześnie agresywność nowotworu. Celem pracy jest ocena stężenia VEGF jako czynnika prognostycznego u chorych na płaskonabłonkowego raka płuca, poddanych radio- i radio-chemioterapii.

**Materiał i metody.** Badaną grupę stanowiło 146 pacjentów z rozpoznaniem płaskonabłonkowym rakiem płuca, leczonych w latach 2009-2014. Chorych leczono radykalnie z zastosowaniem definitywnej radioterapii (30%) lub jednoczesnej radio-chemioterapii (70%). U 5% chorych przed radioterapią zastosowano brachyterapię śródoskrzelową. Miejscowe zaawansowanie guza T1-2 oraz T3-4 stwierdzono odpowiednio u 51 (35%) i 95 (65%) chorych. Przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych (N+) były obecne u 126 (86%) chorych, a przerzuty odległe (M+) u 33 (23%) chorych. Mediana wieku wynosiła 65 lat (zakres 43-84 lata). W analizowanej grupie 82% stanowili mężczyźni, 18% kobiety. Stężenie VEGF oznaczono w osoczu krwi chorych, przed rozpoczęciem leczenia, metodą ELISA. Wpływ poziomu VEGF na przeżycie całkowite (OS) chorych oceniono z użyciem testu log-rank, jako wartość odcięcia przyjmując medianę stężenia białka.

**Wyniki.** Stężenie VEGF w analizowanej grupie mieściło się w zakresie 3,9 – 2680,3 ng/ml (mediana 413 ng/ml). Mediana czasu obserwacji pacjentów wynosiła 14 m-cy (zakres od 1 do 70 m-cy). Nie stwierdzono korelacji pomiędzy stężeniem VEGF a zaawansowaniem T ( $p=0,22$ ), N ( $p=0,36$ ) oraz M ( $p=0,73$ ). U chorych, u których stężenie VEGF przekroczyło 413 ng/ml 3-letnie przeżycie całkowite (OS) wynosiło 46 %. Natomiast u chorych z stężeniem VEGF poniżej 413 ng/ml OS wynosiło 73 %. Wykazano istotnie statystycznie niekorzystny wpływ wysokiego stężenia VEGF, oznaczonego przed leczeniem, na OS ( $p=0,012$ ). W analizie wieloczynnikowej stężenie VEGF pozostało samodzielnym niezależnym od cech T i N czynnikiem istotnie wpływającym na OS ( $p=0,007$ ).

**Wnioski.** Wyniki przeprowadzonego badania wskazują na możliwość wykorzystania oznaczeń stężenia VEGF u chorych leczonych z powodu raka płaskonabłonkowego płuca, jako potencjalnego markera rokowniczego. Wysokie stężenie VEGF przed leczeniem jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznymi, świadczącymi o podwyższonym ryzyku zgonu.

**P-52****Ocena stężenia wybranych chemokin (CCL2, CCL8) w płynie mózgowo-rdzeniowym oraz surowicy pacjentów z glejakami**

Olga Martyna Koper (1), Joanna Kamińska (1), Karol Sawicki (2), Beata Gawrońska (1), Joanna Matowicka-Karna (1), Violetta Dymicka-Piekarska (1), Zenon Mariak (2), Halina Kemon (1)

(1) Zakład Laboratoryjnej Diagnostyki Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, (2) Klinika Neurochirurgii, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

**Wstęp.** Glejaki należą do najbardziej agresywnych nowotworów mózgu. Chemokina CCL2 jest czynnikiem chemotaktycznym dla monocytów/makrofagów, kierując je do miejsca objętego procesem nowotworowym, czego wynikiem jest duża liczba makrofagów towarzyszących nowotworom, co stanowi ujemny czynnik prognostyczny. Chemokina CCL8 bierze udział w karcynogenezie poprzez stymulację proliferacji, migracji i inwazyjności komórek nowotworowych. Celem pracy była ocena stężeń CCL2 oraz CCL8 w surowicy oraz płynie mózgowo-rdzeniowym (PMR) pacjentów z glejakami w porównaniu do grupy kontrolnej.

**Materiał i metody.** Grupę badaną stanowiło 15 pacjentów z glejakami; grupę kontrolną (N=15) stanowili pacjenci bez choroby nowotworowej, z niepełniętymi tętniakami mózgu. Stężenia chemokin w surowicy i PMR oznaczono metodą ELISA. Analizę statystyczną przeprowadzono z użyciem programu STATISTICA 12.0.

**Wyniki.** Mediana (Me) stężenia CCL2 w surowicy pacjentów z glejakami była istotnie statystycznie niższa (153 pg/mL) w porównaniu do grupy kontrolnej (253 pg/mL) ( $P=0,000$ ). Podobnie Me stężenia CCL2 w PMR pacjentów z glejakami była niższa (321 pg/mL) w porównaniu do grupy kontrolnej (427 pg/mL); jednak różnica nie była istotna statystycznie. Me stężenia CCL8 w surowicy pacjentów z glejakami była wyższa (12 pg/mL) w porównaniu do grupy kontrolnej (10 pg/mL); uzyskana różnica nie była istotna statystycznie. Me stężenia CCL8 w PMR pacjentów z glejakami była istotnie statystycznie wyższa (54 pg/mL) w porównaniu do grupy kontrolnej (28 pg/mL) ( $P=0,000$ ). Celem wykluczenia uszkodzenia bariery krew-mózg i/lub zaburzenia funkcjonalności bariery krew-PMR, jako potencjalnych źródeł wpływających na stężenia chemokin, wyliczono indeksy chemokina PMR/chemokina surowica (Index). Index CCL2 był wyższy u chorych na glejaki (Me=3.1) w porównaniu do grupy kontrolnej (Me=1.8); różnica nie była istotna statystycznie. Index CCL8 był istotnie statystycznie wyższy u chorych na glejaki (Me=7.5) w porównaniu do grupy kontrolnej (Me=2.3) ( $P=0,018$ ).

**Wnioski.** Istotnie statystycznie wyższe stężenia CCL8 w PMR pacjentów z glejakami w porównaniu do wartości uzyskanych u osób bez choroby nowotworowej wskazują, że chemokina ta może mieć potencjalne znaczenie jako marker nowotworowy ośrodkowego układu nerwowego. Również ocena Indexu CCL8 może wykazywać znaczenie diagnostyczne. Jednak uzyskane wyniki wymagają weryfikacji na większej grupie badanej i porównaniu do innych nowotworów pierwotnych ośrodkowego układu nerwowego.

## P-53

### Analiza osoczowej obrony antyoksydacyjnej w raku i polipie jelita grubego

Miłostawa Zowczak-Drabczyk (1), Mikołaj Michalik (2), Marcin Nowicki (1), Maria Pioruńska-Stolzmann (1), Dorota Formanowicz, Anna Blacha, Alicja Brożek

(1) Zakład Biochemii Klinicznej i Medycyny Laboratoryjnej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, (2) Studenckie Koło Naukowe Medycyny Laboratoryjnej, Zakład Biochemii Klinicznej i Medycyny Laboratoryjnej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

**Wstęp.** Stres oksydacyjny jest uznanym czynnikiem patogennym w rozwoju raka oraz polipa jelita grubego (j.g.). Całkowity stan antyoksydacyjny osocza (TAS) to parametr oceniający zdolność osocza do usuwania reaktywnych form tlenu uwarunkowany głównie stężeniem kwasu moczowego, bilirubiny, albuminy oraz witamin A, C i E. Celem pracy była analiza stężenia TAS i jego składowych oraz produktów peroksydacji lipidów (LPO) w grupach odpowiednio z rakiem (R), polipem j.g.(P) i porównawczej (K).

**Materiał i metody.** Na podstawie kolonoskopii totalnej i badania histopatologicznego osoby badane podzielono na grupę z R (n=29, wiek 63,0±10,7), P (n=17, wiek 62,5±12,3) i K (n=22, wiek 49,1±16,7). Wykluczono osoby z jawnymi klinicznie procesami zapalnymi, miażdżycą, cukrzycą i innymi chorobami nowotworowymi oraz stosujące antyoksydanty w suplementacji. Przed wdrożeniem jakiegokolwiek leczenia przeciwnowotworowego, krew pobrano rano na czczo i oznaczono stężenia: TAS (test kolorymetryczny, RANDOX Laboratories Ltd), bilirubiny całkowitej (metoda spektrofotometryczna, odczynniki bioMerieux), kwasu moczowego (metoda reflektometrii, paski diagnostyczne Roche Diagnostics), albuminy (Alb), transferryny (TRF) i ceruloplazminy (Cp, metoda nefelometryczna, odczynniki DadeBehring), α-tokoferolu, β-karotenu, retinolu (metody spektrofotometryczne) i kwasu L-askorbinowego (metoda kolorymetryczna, odczynniki Boehringer Mannheim) oraz LPO (MDA+4HNE, test kolorymetryczny Bioxytech LPO 586).

Statystyczną analizę wyników przeprowadzono w programie Statistica 10.0.

**Wyniki.** W badaniu stwierdzono wyższe stężenia TAS w P niż w K (1,62±0,62 vs 1,10±0,21 mmol/l; p<0,01); niższe bilirubiny w R w odniesieniu do P (0,45±0,18 vs 0,62±0,42 mg/dl; p<0,05); niższe Alb w R niż w K (33,5±5,1 vs 38,6±2,7 g/l; p<0,001); niższe retinolu w R niż w K (0,87±0,11 vs 1,08±0,18 μmol/l; p<0,001) oraz wyższe LPO w R niż w P (5,79±3,52 vs 2,65±1,76 μmol/l, p<0,01) i K (2,66±1,42 μmol/l; p<0,001). Wykazano dodatnią korelację pomiędzy stężeniem TAS i kwasu moczowego w R (R=0,4; p<0,05) oraz bilirubiny w P (R=0,54; p<0,05). LPO ujemnie korelowało z Cp (R=-0,47; p<0,05) w R a z TRF (R=-0,62; p<0,01) w P. W K stwierdzono odwrotną zależność LPO i Alb (R=-0,59; p<0,01).

**Wnioski.** 1. W stanie przedrakowym j.g. obserwuje się mobilizację osoczowej obrony antyoksydacyjnej. 2. W raku j.g. następuje wyczerpanie osoczowej obrony antyoksydacyjnej oraz stwierdza się obecność wykładników stresu oksydacyjnego.

## P-54

### Wartość predykcyjna wskaźników stanu zapalnego (NLR, LMR i PLR) u chorych na raka jajnika przed leczeniem I-rzutu

Urszula Rychlik (1), Wiktor Szatkowski (2), Jadwiga Tarapacz (1), Ewa Wójcik (1), Zofia Stasik (1), Katarzyna Brandys (1), Jan Kanty Kulpa (1)

(1) Zakład Analityki i Biochemii Klinicznej Centrum Onkologii, Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Oddział w Krakowie, (2) Klinika Ginekologii Onkologicznej Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Krakowie

**Wstęp.** Nasilenie procesów zapalnych obserwowane u znacznego odsetka chorych na nowotwory złośliwe uznawane jest za niekorzystny czynnik prognostyczny i predykcyjny. Celem prezentowanych badań była analiza kształtowania się wskaźników stanu zapalnego NLR, LMR i PLR wyliczanych w oparciu o liczbę neutrofilii, limfocytów, monocytów i płytek krwi u chorych na surowiczego raka jajnika.

**Materiał i metody.** Badania przeprowadzono u 145 chorych na raka jajnika w różnych stadiach zaawansowania klinicznego oraz w grupie referencyjnej 34 kobiet z niezłośliwymi guzami jajnika (REF).

**Wyniki.** U chorych w porównaniu do REF obserwowano istotnie wyższe NLR i PLR oraz istotnie niższe LMR. Analiza przebiegu krzywych ROC dla NLR, LMR i PLR u chorych względem REF wykazała zbliżoną wielkość pól pod ich powierzchnią a wyznaczone optymalne wartości odcinające, czułości i swoistości diagnostycznej wynosiły odpowiednio dla: NLR=3,26 (76,5 %, 65,5%), LMR=3,73 (79,45%, 69,7%), PLR=176 (64,7%, 77,9%). Wartości badanych wskaźników wykazywały istotne zależności względem stadium zaawansowania procesu nowotworowego przy braku istotnych różnic w grupach wyodrębnionych ze względu na stopień złośliwości histologicznej. Istotnie wyższe PLR miały chore u których stwierdzono przerzuty do węzłów chłonnych. W zależności od stadium zaawansowania choroby obserwowano również istotne różnice w częstości podwyższonych wyników. O ile wysokie NLR miało 43,5% a PLR 65,2% chorych w stadium FIGO I-IIb, to w IIC-IV odpowiednio: 79,7% i 80,3%. Niskie LMR obserwowano u 43,5% chorych w stadiach mniej zaawansowanych i u 73% pozostałych chorych. Stwierdzano ponadto istotne różnice w poziomach badanych wskaźników w zależności od oceny odpowiedzi na leczenie. Całkowitą odpowiedź na leczenie (CR) uzyskano u 48,3%, w tym u 33% chorych z tej grupy w ciągu 12 miesięcy doszło do progresji choroby. Na podstawie analizy przebiegu krzywych ROC wyznaczono wartości dyskryminacyjne dla oceny ryzyka progresji u chorych z CR. U chorych z NLR>3,18, PLR>217 lub LMR<3,29 obserwowano istotnie częściej progresję choroby. W grupie CR z cechami progresji wysokie NLR miało 77%, podobnie PLR -77%, w porównaniu do pozostałych odpowiednio: 44% i 35%. Niskie LMR obserwowano u 73% chorych z progresją i u 33% bez progresji.

#### Wnioski.

- NLR, LMR i PLR są czułymi wskaźnikami korelującymi z miejscowym zaawansowaniem oraz odpowiedzią na chemioterapię I-rzutu.

- Wysokie NLR i PLR oraz niskie LMR przed rozpoczęciem leczenia wiążą się ze znamienne większym ryzykiem progresji choroby

## P-55

### Ocena stężeń chromograniny A (CgA) u chorych na nowotwory/guzy neuroendokrynne (NEN/NET) trzustki nieczynne hormonalnie

Małgorzata Fuksiewicz (1), Beata Kotowicz (1), Agnieszka Kolańska-Ćwikła (2), Jerzy Piotrowski (2), Grzegorz Nawrocki (2), Andrzej Cichoński (2), Maria Kowalska (1)

(1) Pracownia Markerów Nowotworowych Zakładu Patologii i Diagnostyki, Laboratoryjnej, Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Warszawa, (2) Klinika Onkologiczna, Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Warszawa

**Wstęp.** Guzy neuroendokrynne NEN (neuroendocrine neoplasms) to heterogenna grupa nowotworów wywodząca się z rozproszonego układu neuroendokrynnego APUD, którego komórki charakteryzuje zdolność gromadzenia prekursorów amin biogenych oraz ekspresja specyficznych białek receptorowych na błonie komórkowej. W diagnostyce i monitorowaniu leczenia wykorzystywana jest zdolność uwalniania do krwioobiegu przez niektóre komórki guza nieswoistych markerów. Celem badań była ocena użyteczności klinicznej oznaczania chromograniny A u chorych na niesekrecyjne nowotwory neuroendokrynne trzustki, poprzez określenie jej zależności z parametrami kliniczno-patologicznymi oraz analizę związku stężeń z czasem wolnym od choroby (DFS) i całkowitego przeżycia (OS).

**Materiał i metody.** Analizowaną grupę stanowiło 59 chorych, 31 kobiet i 28 mężczyzn, w wieku od 20 do 80 lat (mediana wieku 60 lat), na nowotwory neuroendokrynne trzustki, w tym:

- 30 chorych z nowotworem wysokozróżnicowanym: G1, Ki 67  $\leq 2\%$ ,
- 24 z nowotworem średniozróżnicowanym: G2, Ki 67 3%-20%
- 5 z rakiem (NEC–neuroendocrine carcinoma): G3, Ki 67  $> 20\%$ .

Stężenie chromograniny A oznaczono w surowicy krwi przed leczeniem, metodą immunoenzymatyczną, zestawami firmy Termo Fisher Scientific.

**Wyniki.** Wykazano istotnie wyższe stężenia chromograniny A u chorych, w porównaniu z grupą kontrolną ( $p < 0,019$ ). Stwierdzono, że stężenia CgA były istotnie wyższe u chorych z zajęтыми węzłami chłonnymi niż u chorych, u których węzły chłonne były wolne od przerzutów ( $p < 0,027$ ). Znamienne wyższe stężenia CgA wykazano również u chorych z obecnością przerzutów odległych ( $p < 0,006$ ). Stężenia CgA dodatkowo korelowały zarówno ze stopniem zróżnicowania nowotworu G ( $p < 0,032$ ;  $R=0,33$ ) jak i indeksem proliferacyjnym Ki67 ( $p < 0,019$ ;  $R=0,43$ ). W trakcie ponad trzyletniego okresu obserwacji 10 chorych zmarło a 46 pozostawało w remisji. U tych chorych, którzy zmarli wykazano istotnie wyższe stężenia CgA ( $p < 0,028$ ), oznaczane przed rozpoczęciem leczenia. W jednoczynnikowej analizie przeżycia, wykazano, że oprócz cech kliniczno-patologicznych: G, Ki67 i M,

podwyższone stężenia CgA ( $p < 0,040$ ) są złym czynnikiem prognostycznym dla OS.

**Wnioski.** W surowicy krwi chorych na niesekrecyjne nowotwory neuroendokrynne trzustki, podwyższone stężenia chromograniny A przed leczeniem, związane są z zaawansowaniem choroby oraz z krótszym czasem przeżycia.

## P-56

### Przydatność oznaczania YKL-40 oraz ocena jego wartości prognostycznej u chorych na raka trzonu macicy

Beata Kotowicz (1), Małgorzata Fuksiewicz (1), Joanna Jońska-Gmyrek (2), Maria Kowalska (1)

(1) Pracownia Markerów Nowotworowych Zakładu Patologii i Diagnostyki Laboratoryjnej, Centrum Onkologii Instytut, Warszawa, (2) Klinika Nowotworów Układu Moczowego, Centrum Onkologii Instytut, Warszawa

**Wstęp.** Celem pracy było zbadanie przydatności oznaczania biomarkera YKL-40 u chorych na raka trzonu macicy, w odniesieniu do markera nowotworowego CA125, oraz określenie wartości prognostycznej w ocenie czasu wolnego od choroby (DFS) i czasu całkowitego przeżycia (OS).

**Materiał i metody.** Badaniem objęto 74 chore na raka endometrium, w wieku od 42 do 84 lat (mediana 61 lat). Stopień zaawansowania klinicznego według klasyfikacji FIGO i typ nowotworu I/II określono na podstawie badania histopatologicznego. Po około 5 letniej obserwacji, nawrót stwierdzono u 26%, zmarło 22% chorych. Grupę referencyjną stanowiło 25 zdrowych kobiet. U chorych przed rozpoczęciem leczenia i w grupie kobiet zdrowych, oznaczano w surowicy krwi stężenia CA125 zestawami firmy ROCHE Diagnostics i YKL-40 metodą ELISA zestawami firmy R&D.

**Wyniki.** Testem Manna-Whitneya, u chorych w stopniach I-IB stwierdzono znamienne wyższe stężenia obu markerów, w odniesieniu do grupy kontrolnej. Na podstawie analizy krzywych ROC przeprowadzonej u chorych w stopniach FIGO I-IB vs grupa kontrolna wyznaczono punkt odcięcia dla YKL-40 (35.5 ng/mL), jako stężenie różnicujące. U chorych we wczesnych stopniach zaawansowania I-IB podwyższone stężenia YKL-40 przed leczeniem stwierdzono już u 69%, natomiast wartości CA 125 były podwyższone tylko u 13%, ponadto wykazano większe pole powierzchni pod krzywą ROC dla YKL-40 ( $AUC = 0,813$ ), niż dla CA125 ( $AUC = 0,776$ ). Obserwowano także większą czułość diagnostyczną YKL-40, w porównaniu z CA125, zarówno u chorych w typie I jak i w II nowotworu. U chorych, u których stwierdzono progresję odsetek podwyższonych stężeń YKL-40 (53%) i CA125 (37%) był wyższy, niż u chorych w remisji (YKL-40-29%; CA125-2%). Testem Ch2 wykazano, że różnice te były istotne statystyczne. W analizie wieloczynnikowej Cox'a wartość prognostyczną zarówno dla DFS ( $P < 0,014$ ) jak i OS ( $P < 0,040$ ) wykazano jedynie dla stężeń CA125.

**Wnioski.** Wysoka czułość diagnostyczna YKL-40 we wczesnych stopniach zaawansowania przemawia za możliwością wykorzystania oznaczeń tego markera w diagnostyce różnicowej chorych na raka endometrium. U tych chorych, u których stężenia YKL-40



przed leczeniem są powyżej punktu odcięcia występuje zwiększone ryzyko nawrotu choroby. Wartość prognostyczną potwierdzono jedynie dla stężeń CA 125.

### P-57

#### **Stężenie Aktywiny A w surowicy jako wskaźnik choroby kostnej u chorych na szpiczaka plazmacytowego**

Maciej Korpysz (1), Marta Morawska (2), Helena Donica (1)

(1) Zakład Diagnostyki Biochemicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, (2) Oddział Hematologiczny Centrum Onkologii Ziemi Lubelskiej im. św. Jana z Dukli

**Wstęp.** Badania prowadzone w ostatnich latach koncentrują się na poszukiwaniu nowych czynników, które są uwalniane w szpiku i mogą pobudzać resorpcję kości oraz hamować kościotworzenie u chorych na szpiczaka plazmacytowego (MM). W badaniach in vitro oraz in vivo wykazano, że aktywina A należąca do rodziny TGF- $\beta$  może być ważnym czynnikiem biorącym udział w nasilonej aktywacji osteoklastów oraz hamowaniu funkcji osteoblastów. Celem podjętych badań była ocena zależności pomiędzy stężeniem aktywiny A w surowicy a wybranymi wykładnikami klinicznymi i biochemicznymi u chorych na MM.

**Materiał i metody.** Badaniami objęto 60 pacjentów z nowo rozpoznany MM. Chorych podzielono na podgrupy uwzględniając stadium choroby wg ISS lub stopień zaawansowania zmian kostnych stwierdzany w badaniu RTG. Grupę kontrolną stanowiło 25 osób zdrowych, które nie zgłaszały dolegliwości ze strony układu kostnego oraz nie przyjmowały leków wpływających na metabolizm kostny. Materiałem do badań była surowica krwi. Oznaczenia aktywiny A wykonano metodą immunoenzymatyczną (ELISA), markera resorpcji kości (CTx) metodą opartą na chemiluminescencji, natomiast wybrane parametry biochemiczne ( $\beta$ 2M, wapń, albumina, kreatynina) oznaczano standardowymi metodami laboratoryjnymi.

**Wyniki.** U chorych na MM stwierdzono wyższe stężenie aktywiny A w porównaniu z grupą kontrolną (mediana: 393 vs 450 pg/ml;  $p=0,019$ ), podobną zależność obserwowano dla stężenia CTx ( $p<0,05$ ). W stadium choroby ISS 3 stężenie aktywiny A było istotnie wyższe niż w stadium ISS 1 (363 vs 508 pg/ml;  $p=0,029$ ). Dodatkowo, u chorych z rozległymi ogniskami osteolitycznymi i/lub złamaniami stwierdzanymi w badaniu RTG stężenie aktywiny A było wyższe w porównaniu z chorymi, u których zmiany były pojedyncze (nieliczne) (365 vs 529 pg/ml;  $p=0,006$ ). Wykazano również istotną korelację dodatnią pomiędzy stężeniem aktywiny A a stężeniem  $\beta$ 2M ( $r=0,37$ ;  $p=0,003$ ), CTx ( $r=0,39$ ;  $p=0,002$ ), wapnia ( $r=0,27$ ;  $p=0,037$ ) oraz kreatyniny ( $r=0,36$ ;  $p=0,004$ ).

**Wnioski.** Wysokie stężenie aktywiny A korelowało ze zwiększoną destrukcją kości i zaawansowaniem choroby oraz wykazywało związek ze stężeniem CTx i wapnia, co wskazuje na udział aktywiny A w mechanizmie powstawania zmian kostnych u chorych na szpiczaka. W przyszłości blokowanie aktywności tej cząsteczki może stanowić interesujący cel terapii choroby kostnej u chorych na MM.

### P-58

#### **Galaktozoaminoglikany krwi jako wskaźniki degradacji chrząstki stawowej u chorych na młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów**

Paweł Olczyk (1), Katarzyna Winsz-Szczotka (2), Kornelia Kuźnik-Trocha (2), Katarzyna Komosińska-Vassev (2), Krystyna Olczyk (2)

(1) Zakład Farmacji Aptecznej, (2) Katedra i Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

**Wstęp.** Młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów (MIZS) to najczęściej występująca postać układowych chorób tkanki łącznej wieku rozwojowego, w przebiegu której przedłużona i niekontrolowana aktywacja czynników prozapalnych prowadzi do przewlekłego stanu zapalnego, toczącego się pierwotnie w obrębie błony maziowej stawów, po czym często rozszerzającego się na tkanki okołostawowe, przyczepy ścięgien i mięśni oraz pochewki ścięgien. Wyrazem tych procesów są zmiany destrukcyjne łącznotkankowego utkania wymienionych struktur, wynikające z degradacji komponentów ECM, w tym proteoglikanów zawierających łańcuchy galaktozoaminoglikanów (GAAGs). Nie wiadomo jednakże, czy powyższe tkankowe zmiany metabolizmu tych ostatnich cząsteczek znajdują odzwierciedlenie w galaktozoaminoglikanowym profilu we krwi dzieci chorych. Stąd też, za cel pracy przyjęto ocenę surowiczego stężenia GAAGs, najobficiej reprezentowanych w krążeniu frakcji glikoaminoglikanów, a tym samym najlepiej odzwierciedlających tkankowe przemiany PGs u chorych z MIZS, w momencie klinicznej manifestacji choroby, jak również u tych samych pacjentów po zastosowaniu terapii modyfikującej przebieg procesu zapalnego i przyczyniającej się do uzyskania klinicznej poprawy.

**Materiał i metody.** Ilościowej oceny GAAGs we krwi dzieci zdrowych oraz chorych na MIZS, zarówno przed leczeniem jak po uzyskaniu u nich – w wyniku terapii – klinicznej poprawy, dokonano poprzez ocenę stężenia kwasów heksuronowych, w próbkach wyizolowanych glikoaminoglikanów, zarówno przed jak i po zastosowaniu chondroitynazy ABC.

**Wyniki.** Stwierdzono znamienne statystycznie ( $p<0,0001$ ), rzędu 33%, obniżenie stężenia GAAGs w surowicy dzieci z rozpoznany MIZS przed zastosowaniem leczenia, w stosunku do stężenia ocenianych glikanów w surowicy krwi dzieci zdrowych. Uzyskane wyniki wskazują ponadto, że zastosowanie leków modyfikujących stan zapalny w przebiegu MIZS, doprowadzające u pacjentów do uzyskania klinicznej poprawy, równocześnie przyczynia się do wzrostu stężenia GAAGs we krwi osób chorych – poddanych terapii. Jednakże, wykazane u leczonych dzieci z MIZS stężenie GAAGs było nadal znamienne ( $p=0,026$ ) niższe w stosunku do stężenia omawianych związków we krwi dzieci zdrowych.

**Wniosek.** Obserwowane w stanie klinicznej poprawy stężenie GAAGs we krwi wskazuje na istnienie odrębnego, niezależnego od nasilenia procesów zapalnych, mechanizmu regulującego przemiany tych związków w przebiegu MIZS.



**P-59****Fluorymetryczna metoda oznaczanie wewnątrzkomórkowego cynku z użyciem barwnika TSQ**

Aleksandra Dyś, Andrzej Szutowicz, Hanna Bielarczyk  
Zakład Medycyny Laboratoryjnej, Gdański Uniwersytet Medyczny

**Wstęp.** Cynk to jeden z niezbędnych składników diety, odgrywający istotną rolę w różnorodnych procesach biochemicznych. Zn jest kofaktorem ponad 300 enzymów, niezbędny do funkcjonowania ponad 2000 czynników transkrypcyjnych. W mózgu, cynk występuje w kompleksie z glutaminianem w pęcherzykach presynaptycznych zakończeń glutaminianergicznym, a następnie wychwytywany ze szczeliny synaptycznej przez neurony postsynaptyczne z udziałem transporterów cynkowych i wapniowych kanałów jonowych. Nadmierna akumulacja Zn w neuronach postsynaptycznych może powodować natychmiastowe zahamowanie metabolizmu energetycznego, co prowadzi do utraty funkcji przekąźniczych i integralności strukturalnej. Opracowanie niedrogiej i ilościowej metody analitycznej oznaczania Zn całkowitego byłoby pomocne zarówno w ocenie jego niedoborów w surowicy pacjenta, jak i nadmiernej akumulacji w neuronach postsynaptycznych.

**Materiał i metody.** Metoda oznaczania cynku (Zn) opiera się na selektywnym wiązaniu tego kationu przez barwnik fluorescencyjny 6-metoksy-(8-para-toluenosulfonamido)-chinolina (TSQ). W kompleksie TSQ-Zn<sup>2+</sup> dwie cząsteczki liganda wiążą jeden jon Zn<sup>2+</sup>. Do kuwety reakcyjnej dodano bufor HEPES pH 7,4, próbę badaną oraz barwnik fluorescencyjny TSQ. Intensywność fluorescencji odczytywano przy długości fali wzbudzenia 335 nm oraz emisji 495 nm.

**Wyniki.** W celu kalibracji metody pomiaru Zn całkowitego wykonano roztwory wzorcowe 1-50 μmol/L. Do kuwety pomiarowej dodano bufor HEPES pH 7,4, próby wzorcowe i zmierzono intensywność fluorescencji (RLU) z różnymi stężeniami TSQ. Uzyskano zadawalającą precyzję oznaczenia zarówno w serii jednoczesnej (WZ=3%), jak i niejednoczesnej (WZ=10%). Zależność liniową uzyskano w zakresie stężeń 1-10 μmol/L. Wykorzystując opracowaną metodę badania wykazały, zależną od stężenia akumulację Zn w neuronach cholinergicznym zarówno przy krótkim, jak i długim czasie ekspozycji na wzrastające, zewnątrzkomórkowe stężenie cynku.

**Wnioski.** Zmodyfikowana fluorescencyjna metoda oznaczania Zn z użyciem TSQ zapewnia prosty, wydajny, wrażliwy i niedrogi sposób pomiaru tego mikroelementu w płynach biologicznych i przedziałach wewnątrzkomórkowych. Akumulacja Zn w neuronach cholinergicznym, prowadziła do inhibicji zużycia acetylo-CoA w cyklu kwasów trójkarboksylowych, co skutkowało obniżeniem poziomu ATP i zwiększoną śmiertelnością neuronów. Finansowane z projektu ST57 GUMed.

**P-60****Ocena możliwości elektroelucji, natywnych i zmodyfikowanych egzogennymi fosfolipidami, cząstek lipoprotein o wysokiej gęstości (HDL) z żelu agarozowego**

Kamil Dąbkowski, Barbara Kortas-Stempak, Anna Gliwińska, Agnieszka Ćwiklińska, Agnieszka Kuchta, Ewa Wieczorek, Maciej Jankowski

Zakład Chemii Klinicznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Gdański Uniwersytet Medyczny

**Wstęp.** Cząstki HDL podlegają ciągłym przemianom metabolicznym w osoczu, co czyni tę frakcję bardzo heterogenną. Poznanie funkcji i znaczenia różnych grup cząstek HDL wymaga opracowania metod, umożliwiających ich izolację na różnych etapach ich przemian. Celem pracy była optymalizacja warunków izolacji natywnych i zmodyfikowanych cząstek HDL metodą elektroelucji z żelu agarozowego.

**Materiał i metody.** Wykorzystywano izolowaną precypitacyjnie frakcję HDL surowicy, natywną i zmodyfikowaną w reakcji z liposomami fosfatydylocholinowymi. Frakcję HDL poddawano elektroforezie na 0.5% żelu agarozowym, a następnie wycinano paski żelu zawierające rozdzielone podfrakcje i umieszczano w workach dializacyjnych. Elektroelucję prowadzono przy stałym napięciu 50V, w 50 mM buforze barbital/HCl o pH 8,6. Następnie pozostały żel poddawano ultrawirowaniu i otrzymany eluat zagęszczano metodą ultrafiltracji.

Ocenę efektywności izolacji cząstek HDL, na podstawie odzysku fosfolipidów (FL) i cholesterolu (CHC), prowadzono w 4 wariantach doświadczalnych: (A) 1,5h elektroelucja w trybie ciągłym, bez dodatku buforu do worka dializacyjnego, (B) 1,5h elektroelucja w trybie ciągłym, z dodatkiem 3 ml buforu do worka dializacyjnego, (C) 1,5h elektroelucja z 1 ml buforu, wymienianym na świeży po każdym 30 minutowym cyklu oraz (D) 2,5h elektroelucja w trybie ciągłym z dodatkiem 3 ml buforu. Porównano również odzysk pomiędzy frakcją natywną HDL i zmodyfikowaną egzogennymi fosfolipidami.

**Wyniki.** Odzyski FL w wariantach doświadczalnych B (74,5±2,1%), C (74,8±2,5%) i D (74,0±1,6%) były porównywalne i statystycznie wyższe (p<0,01) niż dla wariantu A (64,5±3,1%). Analizując wyniki odzysku CHC: (A) 61,2±4,4%, (B) 72,9±2,7%, (C) 72,6±2,1%, (D) 91,9±0,7% również zaobserwowano statystyczny wzrost odzysku innych wariantów w porównaniu do wariantu A. Jednakże wartość odzysku CHC dla wariantu D statystycznie przewyższała pozostałe warianty oraz była nieproporcjonalna do odzysku FL (p<0,01). Dla wariantu B, porównano efektywność elektroelucji natywnych i zmodyfikowanych cząstek HDL, uzyskując odpowiednio odzyski FL:74,5±2,1%, CHC:72,9±2,7% (natywne HDL) i FL:63,1±8,4% (p<0,05), CHC:75,3±4,4% (zmodyfikowane HDL).

**Wnioski.** Za najbardziej optymalny pod względem efektywności i skomplikowania uznano wariant z 1,5h trybem ciągłym i dodatkiem buforu do worka z fragmentem żelu. Proponowana metoda jest wydajna, pozwala na uzyskiwanie powtarzalnych wyników oraz umożliwia izolację natywnych i zmodyfikowanych cząstek HDL.

## P-61

### Zastosowanie mikroskopii ciemnego pola i rozproszenia światła laserowego do obserwacji mechanizmów agregacji nanocząsteczek srebra w reakcjach immunologicznych

Anna Lizoń, Ryszard Drożdż

Zakład Diagnostyki Medycznej Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum w Krakowie

**Wstęp.** Agregacja nanocząsteczek srebra wiąże się z efektem powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR) przejawiającym się jako zmiany widma w zakresie światła widzialnego. Funkcjonalizacja nanocząsteczek srebra antygenami białkowymi a następnie przeciwciałami skierowanymi przeciw tym antygenom powinna spowodować zmiany powierzchniowego rezonansu plazmonowego widoczne jako różnice w zabarwieniu roztworu. Efekt ten może być wykorzystany jako metoda detekcji białek.

**Materiał i metody.** Do doświadczeń wykorzystano nanocząsteczki srebra uzyskane poprzez redukcję azotanu srebra borowodorkiem sodu w obecności kwasu cytrynowego jako czynnika stabilizującego. Nanocząsteczki opłaszczano łańcuchami lekkimi immunoglobulin oraz odpowiednimi przeciwciałami. Ocenę zmian powierzchniowego rezonansu plazmonowego przejawiającą się jako różnice w widmie dokonywano przez pomiar absorpcji światła w zakresie od 350 do 600 nm. Analizowano barwę roztworów oraz ich obrazy w mikroskopie ciemnego pola. Rozproszenie zielonego światła laserowego rejestrowano za pomocą samodzielnie skonstruowanego urządzenia wykorzystującego zielony półprzewodnikowy laser oraz obiektyw o wydłużonym zakresie ostrości.

**Wyniki.** Metodą analizy rozproszenia zielonego światła laserowego wykazano obecność silnych rozprożeń co wskazuje na występowanie w roztworze hiperagregatów nanocząsteczek srebra i białek. W obrazie z mikroskopu ciemnego pola stwierdzono obecność zagregowanych nanocząsteczek srebra. Procesom tworzenia agregatów nie towarzyszyły oczekiwane zmiany SPR – zarówno zabarwienie roztworów jak i ich widmo nie zmieniło się znacząco.

**Wnioski.** Reakcje immunochemiczne przebiegające w obecności nanocząsteczek srebra stabilizowanych kwasem cytrynowym powodują agregację nanocząsteczek lub poszerzenie korony białkowej otaczającej nanocząsteczki, natomiast nie towarzyszą im zmiany powierzchniowego rezonansu plazmonowego. Śledzenie procesów agregacji nanocząsteczek opłaszczonych białkami wymaga specjalnie opracowanych technik detekcji i odpowiednich przeciwciał.

## P-62

### Czy możliwa jest racjonalna analiza stężeń sodu i potasu uzyskiwanych naprzemiennie z różnych analizatorów laboratoryjnych?

Włodzimierz Pawłowski

Szpital Wojewódzki w Poznaniu, Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Mikrobiologicznej

**Wstęp.** W codziennej praktyce klinicznej coraz powszechniej wykorzystuje się analizatory parametrów krytycznych (APK) w ocenie

nie tylko pH oraz parametrów „gazowych”, ale również wielu innych analizów. Nierzadko wyniki tych badań spływają do klinicysty równoległe/naprzemiennie z rezultatami pochodzącymi z klasycznych analizatorów biochemicznych. W prospektywnych badaniach niejednokrotnie wykazywano dobrą korelację pomiędzy różnymi typami analizatorów dla wielu parametrów. W niniejszej pracy oceniono jak w codziennej praktyce klinicznej korelują ze sobą wyniki stężeń podstawowych elektrolitów – sodu i potasu.

**Materiał i metody.** Retrospektywna ocena w zakresie zgodności stężeń sodu i potasu w jednoczasowo zleconych i wykonanych badaniach: 1) „gazometria” w krwi tętnicznej versus oznaczenie Na, K w surowicy krwi żyłnej u 100 pacjentów Oddziału Intensywnej Terapii (OIOM); 2) „gazometria” w krwi włosniczkowej versus oznaczenie Na, K w surowicy krwi żyłnej u 100 pacjentów Poradni Nefrologicznej (PNEF) Szpitala Wojewódzkiego w Poznaniu. Oznaczenia w krwi pełnej wykonywano na analizatorach ABL 90 PLUS i 800 FLEX (Radiometer; Na i K – potencjometria bezpośrednia), stężenia sodu i potasu w surowicy krwi żyłnej: u pacjentów z OIOM na analizatorze VITROS 5600 (Ortho Clinical Diagnostics; potencjometria bezpośrednia), u pacjentów z PNEF na analizatorze Cobas 6000 (Roche, potencjometria pośrednia). Dla sparowanych wyników Na i K wyliczono równania regresji liniowej, współczynniki korelacji oraz oceniono odsetek par badań, w których różnice pomiędzy wynikami przekraczały: A) wartości całkowitego błędu dopuszczalnego (TEA) wg Westgarda (Na: 0,73%; K: 5,6%) oraz B) wartości „akceptowalne klinicznie” (Na: 3 mmol/l, K: 0,3 mmol/l), które przyjęto po dyskusji z 3 specjalistami różnych dyscyplin medycznych. **Wyniki.** Równania regresji liniowej, współczynniki korelacji, odsetki wyników różniących się powyżej TEA wg kryteriów Westgarda oraz przekraczające wartości akceptowalne klinicznie wyniosły odpowiednio: pacjenci z OIOM – Na:  $y = 0,82x + 25,3$ ; 0,93; 53%; 12%; K:  $y = 0,93x + 0,36$ ; 0,96; 17%; 5%; pacjenci z PNEF – Na:  $y = 0,71x + 41,2$ ; 0,77; 36%; 5%; K:  $y = 1,01x - 0,19$ ; 0,81; 44%; 30%.

**Wnioski.** 1. Naprzemiennie wykorzystywanie APK i klasycznych urządzeń laboratoryjnych nie zapewnia racjonalnego monitorowania pacjenta w zakresie natremii i kaliemii. 2. W warunkach rutynowej pracy klinicznej zadawalające współczynniki korelacji nie są gwarancją dobrej porównywalności metod.

## P-63

### Selektywna inhibicja iNOS chroni serce przed uszkodzeniem w wyniku niedokrwienia i reperfuzji

Anna Krzywonos-Zawadzka, Iwona Bil-Lula, Mieczysław Woźniak

Katedra Analityki Medycznej, Zakład Chemii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

**Wstęp.** Ostre niedokrwienie z następczą reperfuzją tętnic wieńcowych (I/R) i masywna produkcja cytokin prozapalnych w miejscu niedokrwienia/uszkodzenia mięśnia sercowego są źródłem nadprodukcji ONOO<sup>-</sup> w wyniku silnego stresu oksydacyjnego i mogą prowadzić do zaburzeń kurczliwości mięśnia sercowego. Tlenek azotu produkowany przez syntazę tlenu azotu (iNOS) jest silnym wazodilatorem, działa antyagregacyjnie na płytki krwi oraz

stymuluje neoangiogenezę. Jednak w warunkach niedotlenienia iNOS może wywoływać efekt cytotoksyczny stymulowany powstawaniem nadtlenozotynu ONOO<sup>-</sup> i wolnych rodników. Dodatkowo ONOO<sup>-</sup> – który powstaje z NO w wyniku I/R, aktywuje metaloproteinazę 2 macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP-2). W wyniku stresu oksydacyjnego może również dochodzić do uszkodzenia enzymu syntazy NO i produkcji wolnych rodników zamiast NO (tzw. NOS uncoupling). W celu ochrony serca przed cytotoksycznym efektem NO podczas I/R proponujemy zastosowanie selektywnego inhibitora iNOS -1400W.

**Materiał i metody.** Kardioprotekcyjne działanie leku badano na izolowanych sercach szczura (samce rasy Vistar, 300g) metodą Langendorfa. Wskaźniki hemodynamiczne serca monitorowano przez wyznaczenie RPP (*rate pressure product*) – iloraz maksymalnej różnicy ciśnienia skurczowego i rozkurczowego w lewej komorze i częstotliwości skurczów serca. W zależności od fazy eksperymentu, serca poddano: perfuzji buforem Krebs-Henseleit'a przez 25 min, niedokrwieniu 20 min i reperfuzji 30 min (grupa I/R – symuluje zawał serca), lub perfuzji 25 min z udziałem 1400W w stężeniu 5µM, niedokrwieniu 20 min i reperfuzji 30 min z udziałem 1400W w stężeniu 5µM. Przeprowadzono również kontrole aerobową. W każdej grupie przebadano min. 4 serca.

**Wyniki.** W grupie serc poddanych I/R z dodatkiem 1400W (5uM) wykazano zmniejszoną zawartość iNOS ( $p < 0,06$  vs Aero;  $p < 0,012$  vs I/R20). Miarą kardioprotekcji był wzrost wartości RPP w grupie serc poddanych I/R z dodatkiem 1400W (5uM) w porównaniu z grupą IR bez leku ( $p < 0,001$ ) Wartości RPP dla grupy IR z lekiem była identyczna jak wartości RPP w grupie aerobowej ( $p = 0,48$ ). Dodatkowo, wykazaliśmy iż zastosowanie 1400W (5uM) zmniejsza aktywność MMP 2 w tkance sercowej poddanej I/R ( $p < 0,045$  vs Aero;  $p < 0,0009$  vs I/R20)

**Wnioski.** Zastosowanie selektywnego inhibitora NOS (5uM 1400W) działa kardioprotekcyjnie, hamując niekorzystne zmiany w sercu, zachodzące podczas ostrego niedokrwienia naczyń wieńcowych oraz następczego szoku tlenowego, podczas reperfuzji naczyń wieńcowych.

## P-64

### Ocena stężenia metaloproteinazy 9. (MMP-9) w surowicy chorych na pierwotne nadciśnienie tętnicze z zaburzeniami gospodarki lipidowej

Aleksandra Baszczuk, Anna Thielemann, Agnieszka Pietrzak, Anna Dżumak, Lena Bielawska, Aleksandra Ludziejewska, Ewa Wysocka

Katedra i Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu

**Wstęp.** Utrwalonemu nadciśnieniu tętniczemu towarzyszy rozwój zmian miażdżycowych oraz proces przebudowy naczyń zależny od dynamicznych wzajemnych interakcji między lokalnymi czynnikami wzrostu, substancjami wazoaktywnymi i receptorami hemodynamicznymi. W czasie przebudowy w ścianach naczyń obserwuje się zwiększoną aktywność TNF- $\alpha$ , który wzmacnia produkcję metaloproteinaz. MMPs stanowią grupę endopeptydaz,

których główną funkcją jest degradacja białek przestrzeni międzykomórkowej. Celem badania była ocena stężenia MMP-9 oraz jego powiązań z nadciśnieniem i zaburzeniami gospodarki lipidowej.

**Materiał i metody.** Badanie przeprowadzono wśród 61 chorych na pierwotne nadciśnienie tętnicze, w wieku 21-73 lat. Grupa kontrolna obejmowała 16 osób bez nadciśnienia, w wieku od 25 do 64 lat. Stężenia MMP-9 analizowano w grupach chorych na NT z: hipercholesterolemią ( $n=38$ ) i prawidłowym poziomem cholesterolu ( $n=23$ ); poziomem triglicerydów w zakresie wartości referencyjnych ( $n=34$ ) i powyżej tych wartości ( $n=27$ ), prawidłowym ( $n=28$ ) i podwyższonym poziomem LDL ( $n=33$ ) oraz prawidłowym ( $n=44$ ) i obniżonym ( $n=17$ ) stężeniem HDL-cholesterolu. Oznaczenie stężenia metaloproteinazy 9. wykonano techniką ELISA (R&D System). Metodami enzymatycznymi na analizatorze Dimension, oznaczono stężenia: cholesterolu całkowitego, HDL-cholesterolu, LDL-cholesterolu oraz triglicerydów (Siemens). Analiza statystyczna wyników badań została wykonana przy pomocy programu komputerowego STATISTICA v 9.0.

**Wyniki.** W surowicy chorych na pierwotne nadciśnienie tętnicze zanotowano wyższy poziom metaloproteinazy 9. (mediana 330,05 ng/ml), niż poziomu tego enzymu w surowicy osób z grupy kontrolnej (mediana 205,51 ng/ml). Jednakże, różnice te nie były statystycznie istotne ( $p=0,0799$ ). Chorzy na NT z hipercholesterolemią wykazywali statystycznie istotnie wyższy poziom stężeń MMP-9 w surowicy w porównaniu z chorymi z normocholesterolemią (649,51 ng/ml vs 352,72 ng/ml,  $p=0,0032$ ). Ponadto wykazano znaczącą korelację stężenia MMP-9 z wartościami stężeń cholesterolu całkowitego ( $R=0,3125$ ,  $p=0,0142$ ). W przypadku pozostałych parametrów lipidowych różnice nie były statystycznie istotne.

**Wnioski.** Chorzy na nadciśnienie tętnicze charakteryzują się wyższymi stężeniami MMP-9. Wskazuje to na nasilone procesy degradacji białek w przestrzeni międzykomórkowej, co może być związane z przebudową naczyń krwionośnych. Zjawisko to wydaje się być bardziej nasilone u chorych z towarzyszącą nadciśnieniu hipercholesterolemią.

## P-65

### Korelacja ekspresji selektyny P z parametrami morfologii płytek krwi w chorobie niedokrwiennej serca.

Anna Małgorzata Konarzewska, Joanna Pawlus, Joanna Osada, Milena Dąbrowska

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Zakład Diagnostyki Hematologicznej

**Wstęp.** Do najczęstszych przyczyn choroby niedokrwiennej serca (ChNS) zaliczamy aktywację i agregację płytek krwi oraz zakrzep tworzący się na zmianie miażdżycowej. Celem pracy była ocena ekspresji selektyny P (CD62P) w korelacji z parametrami morfologii płytek krwi w grupie chorych ze stabilną (SA), niestabilną chorobą wieńcową (UA) oraz zawałem serca (MI).

**Materiał i metody.** Badania objęły 105 pacjentów z ChNS oraz 25 osób zdrowych. Pomiar ekspresji CD62P wykonano metodą immunocytofluorymetryczną. Liczbę płytek krwi (PLT), odsetek płytek olbrzymich (L-PLT), ich średnią objętość (MPV) oraz średnią



gęstość ziarnistości (MPC) oznaczono metodą dwuwymiarowej analizy płytek. W celu doboru grupy badanej wykonano rutynowo stosowane badania biochemiczne i koagulologiczne.

**Wyniki.** Wraz ze stopniem zaawansowania ChNS wzrastały wartości MPV (SA 8,8±1,4, UA 9,9±1,9, MI 11,8±3,5 fl) i L-PLT (SA 8,4±4,5, UA 10,3±4,4, MI 12,3±4,3 %) oraz obniżała się wartość MPC (SA 28,8±1,9, UA 26,5±2,3, MI 23,4±2,8 g/l). Ekspresja CD62P wykazała istotny statystycznie wzrost w grupie UA i MI vs. osoby zdrowe (odpowiednio: 6662±22987, 6826±1936, 3610,8±1277 cząstek/płytkę). W grupie SA uzyskano dodatnią korelację CD62P z L-PLT ( $r=0,61$ ;  $p=0,015$ ) i MPV ( $r=0,57$ ;  $p=0,037$ ) oraz ujemną korelację CD62P z MPC ( $r=-0,64$ ;  $p=0,031$ ). W grupie UA obserwowano wysoką dodatnią korelację CD62P z L-PLT ( $r=0,77$ ,  $p=0,002$ ) oraz ujemną korelację CD62P z MPC ( $r=-0,61$ ;  $p=0,014$ ). W grupie MI, MPC korelowało ujemnie z CD62P ( $r=-0,61$ ,  $p=0,023$ ) i MPV ( $r=-0,67$ ;  $p=0,000$ ). W różnicowaniu stabilnej choroby wieńcowej ze stanem zdrowia największą moc diagnostyczną wykazała ekspresja CD62P (AUC: 0,921; czułość: 89%; swoistość 80%). W odróżnieniu niestabilnej choroby wieńcowej od stanu zdrowia największą moc diagnostyczną wykazała MPV (AUC: 0,977; czułość: 93%; swoistość: 100%). W różnicowaniu pacjentów z zawałem mięśnia sercowego od osób zdrowych największą moc diagnostyczną wykazał odsetek L-PLT (AUC: 0,985; czułość: 95%; swoistość: 88%).

**Wnioski.** Rutynowa ocena parametrów morfologicznych płytek nie jest wystarczająco czułym badaniem sugerującym ich aktywację w SA. Niemniej, na nadmierną reaktywność płytek wskazuje zwiększona ekspresja CD62P. W UA oraz MI już na etapie rutynowej oceny morfologii krwi zwraca uwagę wzrost objętości płytek (MPV, L-PLT) i możliwość ich degranulacji (obniżenie MPC), co koreluje ze wzrostem ekspresji CD62P, odzwierciedlającym aktywację płytek.

## P-66

### Stężenie homocysteiny i białka C-reaktywnego u zdrowych osób o różnym stopniu aktywności fizycznej

Alicja Płóciniczak, Alicja Brożek, Anna Blacha, Marcin Nowicki, Miłostawa Zowczak-Drabarczyk, Kalina Maćkowiak, Dorota Formanowicz, Maria Pioruńska-Stolzmann

Zakład Biochemii Klinicznej i Medycyny Laboratoryjnej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Celem pracy była analiza wpływu aktywności fizycznej na stężenie homocysteiny (HCY) i białka C-reaktywnego (hsCRP) będących niestandardowymi czynnikami ryzyka chorób sercowo-naczyniowych (ChSN).

**Materiał i metody.** Badaniami objęto 332 zdrowe osoby (206 K i 126 M), które podzielono pod względem wieku i płci na cztery podgrupy: grupa 1: osoby w wieku poniżej 45 lat (K1, M1) oraz grupa 2: w wieku powyżej 65 lat (K2 i M2). W podgrupach dokonano podziału ze względu na aktywność fizyczną: aktywni (A)  $\geq 3$  godz. aktywności fizycznej/tyg. oraz nieaktywni (N)  $\leq 1$  godz. aktywności fizycznej/tyg. U wszystkich badanych wykonano na czczo oznaczenie stężenia: HCY (metoda chemiluminescencji bezpośredniej,

analizator Advia Centaur) i hsCRP (metoda immunoenzymatyczna ELISA, testy firmy DRG Diagnostics, czytnik TECAN SUNRISE). Wyniki przedstawiono jako: [medianę(pierwszy-trzeci kwarty)]; p].

**Wyniki.** K1 vs K2 różniły się stężeniami: HCY [ $\mu\text{mol/l}$ ] [10,6 (7,9-11,9) vs. 12,5 (10,6-14,6);  $p=0,0081$ ], i hsCRP [mg/l] [0,9 (0,5-1,7) vs. 2,3 (1,1-3,4);  $p=0,0000$ ]. M1 vs M2 różniły się stężeniami HCY [ $\mu\text{mol/l}$ ] [11,78 (9,21-13,20)] vs. 12,95 (11,0-14,9)  $p=0,0037$ ] i hsCRP [mg/l] [1,1 (0,60-2,10) vs. 1,9 (0,9-0,34);  $p=0,0180$ ]. K1-A vs. K1-N różniły się stężeniem HCY [ $\mu\text{mol/l}$ ] [12,10 (10,60-13,78) vs. 13,50 (11,02-15,43);  $p=0,0081$ ]. Nie zaobserwowano różnic w stężeniu hsCRP i T-C. K2-A vs K2-N różniły się stężeniami: hsCRP [mg/l] [1,9 (0,87-2,70) vs. 2,7 (1,85- 3,6);  $p=0,0165$ ]. Nie zaobserwowano różnic w stężeniu HCY. M1-A vs M1-N różniły się stężeniem HCY [ $\mu\text{mol/l}$ ] [12,79 (10,90-13,92) vs. 15,40 (13,92-17,39)  $p=0,0021$ ]. Nie zaobserwowano różnic w stężeniu hsCRP. M2-A vs M2-N nie zaobserwowano różnic w zakresie stężeń HCY i hsCRP

**Wnioski.** 1. Większa aktywność fizyczna w grupie osób 65 r.ż. wskazuje na korzystny wpływ aktywności fizycznej na zmniejszenie ryzyka ChSN w tej grupie.

## P-67

### Czułość kliniczna różnych rodzajów testów immunoenzymatycznych do wykrywania markerów zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu C (anty-HCV) na podstawie badania donacji pierwotnie seronegatywnych w badaniu przeglądowym (anty-HCV-/RNA HCV+)

Piotr Grabarczyk (1), Dorota Kubicka-Russel (1), Aneta Kopacz (1), Grzegorz Liszewski (1), Ewa Sulkowska (1), Paulina Zwolińska (1), Kazimierz Madaliński (2), Paulina Godzik (2), Maciej Marek (3), Małgorzata Szabelewska (4), Marek Radkowski (5)

(1) Zakład Wirusologii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa, (2) Pracownia Immunopatologii Zakażeń Wirusami Hepatotropowymi, Państwowy Zakład Higieny – Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego, (3) Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Kaliszu, (4) Wojskowe Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Warszawie, (5) Zakład Immunopatologii Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych, Warszawski Uniwersytet Medyczny

**Wstęp.** W ostatnich latach nastąpił istotny postęp nie tylko w wykrywaniu zakażenia HCV metodami NAT, ale także metodami serologicznymi. Celem badań była ocena czułości klinicznej różnych testów serologicznych w donacjach uznanych pierwotnie na podstawie badania przeglądowego jako tzw. NAT yields (RNA HCV+/anty-HCV-).

**Materiał i metody.** Badaniami objęto 106 donacji ze wczesnego etapu zakażenia HCV zidentyfikowanych w latach 2002-2016 w Polsce. Wszystkie były negatywne w serologicznych badaniach przeglądowych (65 w ORTHO HCV V3.0 ELISA, 25 w Architect Anti-HCV Abbott oraz 16 Vitrosanti-HCV Ortho). 45 zakażonych donacji zostało zidentyfikowanych w badaniu przeglądowym RNA HCV



wykonanym testem Amplicore (Roche), 11 Ampliscreen (Roche), 21 Taqscreen MPX (Roche), 12 Taqscreen MPX 2.0 (Roche), 3 w badaniu Procleix HCV/HIV-1 (Chiron), 9 ProcleixUltrio (Novartis), 4 Ultrio Plus (Novartis), 1 UltrioElite (Grifols). Stężenie RNA HCV (VL) wynosiło od 6,0 do 4,78x10<sup>7</sup> IU/ml, średnia 2,3x10<sup>6</sup> IU/ml, mediana 4,43x10<sup>5</sup> IU/ml. Donacje były zakażone genotypami 1a (4,7%), 1b (40,6%), 3a (45,3%), 4 (7,5%), mieszanymi (1,8%). Analizowano reaktywność próbek w 4 testach anty-HCV: w 2 testach chemiluminescencji (test I – VitrosaHCV, test II – Abbott Anti-HCV), w ELISA czwartej generacji (test III – BioRadMonolisa<sup>TM</sup> HCV Ag-Ab Ultra V2) oraz w teście elektrochemiluminescencji (test IV – Roche ElecsysAnti-HCV II). W przypadku uzyskania wyniku reaktywnego, badanie powtarzano dwa razy. Dodatkowo wszystkie próbki przebadano na obecność antygenu HCV (testem V – Abbott, n=70 lub testem VI – Ortho, n=36).

**Wyniki.** 32,1% próbek było powtarzalnie reaktywnych w teście ELISA IV generacji (wszystkie dodatnie w teście V i VI), zaś 11,3% w teście elektrochemiluminescencji (wszystkie były dodatnie w teście V lub VI, a 8 w teście III). VL najniższy był w próbkach z ujemnymi wynikami wszystkich testów serologicznych (testy I-V, n=18 średnia 2,2x10<sup>5</sup> IU/ml) oraz w dodatnich w teście I i IV (n=13, średnia = 9,3x10<sup>5</sup> IU/ml), najwyższy w próbkach dodatnich w teście IV generacji (dodatnie/reaktywne w teście IV generacji, ale negatywne w testach I, II i IV, n=26, średnia VL=3x10<sup>6</sup> IU/ml). Różnice były istotne statystycznie (p<0,05).

**Wnioski.** Najwyższą czułość kliniczną w badaniu donacji pierwotnie zaklasyfikowanych jako RNA HCV yields prezentował test ELISA IV generacji, a następnie test elektrochemiluminescencji. Autorzy dziękują firmom Roche Diagnostics Polska oraz BioRad Polska za przekazanie testów.

## P-68

### Wyniki przeglądowych badań markerów serologicznych i molekularnych u dawców krwi wskazują na wysoką endemiczność zakażeń wirusem zapalenia wątroby typu E w Polsce

*Ewa Sulkowska, Dorota Kubicka-Russel, Grzegorz Liszewski, Ewa Noceń, Anna Chrzanowska, Aneta Kopacz, Jolanta Antoniewicz-Papis, Magdalena Łętowska, Piotr Grabarczyk*  
Instytut Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie

**Wstęp.** Genotyp 1 i 2 wirusa zapalenia wątroby typu E (HEV) są przenoszone między ludźmi, szczególnie w krajach, gdzie panują niewystarczające warunki sanitarne i higieniczne. Do zakażeń genotypami 3 i 4 dochodzi głównie w wyniku spożycia mięsa zwierząt hodowlanych (głównie wieprzowiny) i dziczyzny (mięsa dzików). Zakażenia genotypem 1 zazwyczaj przebiegają objawowo i ulegają samoograniczeniu. Większość zakażeń genotypem 3 ma charakter bezobjawowy lub skąpoobjawowy, jednak u części osób z obniżoną odpornością – np. chorych na białaczkę, zakażonych HIV, po przeszczepach narządów i tkanek może przechodzić w postać przewlekłą, czemu towarzyszą istotna progresja choroby wątroby (m.in. przewlekłe zapalenie wątroby, marskość wątroby, piorunujące zapalenie wątroby). Celem badania była ocena czę-

stości markerów zakażenia HEV wśród polskich krwiodawców.

**Materiał i metody.** Próbkę krwi pobrano w okresie 02-09.2015 od 4409 pierwszorazowych i 1081 wielokrotnych dawców w 21 Centrach Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa (CKiK). RNA HEV badano indywidualnie metodą TMA (Procleix HEV AssayGrifols). 3079 dawców pierwszorazowych przebadano w kierunku anty-HEV testem Wantai HEV IgG ELISA i Wantai-HEV-IgM ELISA (Beijing WantaiBiological). Wyniki powtórnie reaktywne w kierunku RNA HEV ponownie badano testem PCR Real Star<sup>®</sup>HEV RT-PCR Kit 1.0 (Altona Diagnostics). Wyniki dodatnie anty-HEV klasy IgM potwierdzono testem Western blot (WB) recomLine HEV IgG/IgM (Mikrogen, Diagnostik).

**Wyniki.** Wykryto trzy próbki wstępnie RNA HEV reaktywne (1/1830), dwie (1/2745) były powtórnie reaktywne i dodatkowo potwierdzone w RT PCR. Anty-HEV IgG wykryto u 43,52% dawców pierwszorazowych (1340/3079), u 39 dawców wykryto anty-HEV IgM (1,2%). U siedmiu dawców IgM (0,2%) były jedynymi markerami zakażenia. 26 z 37 (70,2%) dodatnich wyników badania IgM zostało potwierdzonych w WB. Częstość IgG wahała się między regionami od 30% na Podlasiu do 65% w Wielkopolsce. Częstość przeciwciał IgG rosła wraz z wiekiem od 25% u najmłodszych (18-27) do ponad 60% u starszych dawców (47-58). Zarówno IgG jak i IgM były wykrywane częściej u mężczyzn niż u kobiet (odpowiednio 47,8% vs. 39% oraz 1,04% vs. 0,2%, p<0,05).

**Wnioski.** Wyniki wskazują na wysoką endemiczność zakażeń HEV w Polsce. Istnieje pilna potrzeba, aby dokonać lokalnej oceny znaczenia klinicznego HEV w Polsce, oraz rozważyć zwiększenie dostępności diagnostyki HEV oraz zasadność wprowadzenia profilaktyki przenoszenia zakażeń przez transfuzje oraz transplantację.

## P-69

### Porównanie jakości niektórych testów komercyjnych stosowanych do wykrywania infekcji *Borrelia burgdorferi*

*Zofia Czubasiewicz (1), Marek Szewczyk (1), Bogdan Mazur (1), Andrzej Wiczkowski (2)*

(1) Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii, Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, (2) Wydział Nauk o Zdrowiu, Akademia Techniczno-Humanistyczna w Bielsku – Białej

**Wstęp.** Diagnostyka boreliozy jest problematyczna gdy objawy kliniczne nie są typowe. Wtedy istotną częścią rozpoznania są wyniki badań laboratoryjnych. Dlatego wskazane jest używanie metod diagnostycznych, które w najmniejszym stopniu są obciążone wynikami fałszywie dodatnimi oraz ujemnymi. Celem pracy jest porównanie jakości zestawów Western Blot (W-B) oferowanych do badań diagnostycznych, do wykrywania swoistych przeciwciał przeciw antygenom *Borrelia burgdorferi* (B. b.).

**Materiał i metody.** Materiałem była krew pobrana od 1819 mieszkańców Górnego Śląska (próba ślepa). W pobranych próbkach zbadano miano przeciwciał w klasie IgM i IgG skierowanych przeciwko antygenom B. b. za pomocą zestawów testowych Anty-Borrelia ELISA (IgM) i Anty-Borrelia plus VlsE Elisa (IgG) (Euroimmun, Niem-

cy). Następnie wykonano test potwierdzający W-B dwoma testami komercyjnymi na 96 surowicach w klasie IgM i na 194 surowicach w klasie IgG zbadanych wcześniej metodą ELISA. Zastosowano zestawy testowe: recomLine Borrelia IgM i recomLine Borrelia IgG (Mikrogen, Niemcy), Borrelia ViraStripe IgM Testkit i Borrelia ViraStripe IgG Testkit (Viramed, Niemcy).

**Wyniki.** Porównanie wyników otrzymanych przy użyciu testów metodą ELISA i dwoma rodzajami testów W-B uwidacznia znaczną liczbę wyników fałszywie dodatnich i fałszywie ujemnych. Całkowita zgodność wyników testów ELISA i W-B wyniosła: 65,6% (IgM ELISA: Mikrogen), 69,8% (IgM ELISA: Viramed), 83,9% (IgG ELISA: Mikrogen), 81,9% (IgG ELISA: Viramed). Zaobserwowano większą zgodność wyników w klasie IgG. W klasie IgM zaobserwowano 11,45% (Mikrogen) i 13,5% (Viramed) wyników ujemnych testem ELISA i dodatnich testem W-B. Przeprowadzona analiza statystyczna przy użyciu testu  $\chi^2$  dla tablicy wielopolowej wskazuje na istotną różnicę pomiędzy wynikami uzyskanymi metodą ELISA i dwoma testami W-B. Mimo zastosowania bardzo czułego testu przesiewowego uzyskano znaczny odsetek wyników fałszywie ujemnych, czego należy unikać stosując procedurę dwuetapowej diagnostyki, zakładającej potwierdzanie tylko dodatnich i wątpliwych wyników.

**Wnioski.** Wnioskuje się zatem, iż test ELISA, wykorzystany do badań nie jest wystarczająco czuły do stosowania go jako test przesiewowy. Rozbieżności otrzymane w wynikach testów W-B, mogą być efektem różnic w składach antygenowych testów oraz sposobie pozyskania antygenów.

## P-70

### **Analiza przydatności w praktyce lekarzy podstawowej opieki zdrowotnej szybkich testów diagnostycznych różnicujących bakteryjne i wirusowe zakażenia górnych dróg oddechowych**

*Anna Mertas, Dawid Mamak, Marta Nowak, Mateusz Nowak*

Studenckie Koło Naukowe Katedry i Zakładu Mikrobiologii i Immunologii Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze, Studenckie Towarzystwo Naukowe Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

**Wstęp.** Testy do szybkiej diagnostyki zakażeń bakteryjnych i wirusowych mogą być stosowane nie tylko w laboratoriach szpitalnych, czy oddziałach intensywnej opieki medycznej, ale także w gabinetach lekarskich podstawowej opieki zdrowotnej. Szybkie testy wykonywane w miejscu kontaktu lekarza z pacjentem (POCT) mogą dawać znaczące korzyści w leczeniu zakażeń, nie zastępując jednak rutynowych laboratoryjnych badań mikrobiologicznych. Wczesne ustalenie jaka jest etiologia np. rozpoznanego zakażenia górnych dróg oddechowych pozwala na właściwy dobór skutecznej terapii. Cel: Przeprowadzone badania ankietowe miały na celu dokonanie oceny dostępności i przydatności szybkich testów diagnostycznych wykorzystywanych w gabinetach podstawowej opieki zdrowotnej przez pediatrów oraz lekarzy rodzinnych.

**Materiał i metody.** Badanie przeprowadzono metodą ankietową w czterech grupach respondentów: 54 pediatrów, 83 lekarzy rodzinnych, 219 pacjentów oraz 133 rodziców/opiekunów pacjentów pediatrycznych. Łącznie analizowano ankiety z opiniami 489 osób. Głównym zamierzeniem przeprowadzonych badań była ocena dostępności i użyteczności szybkich testów diagnostycznych podczas ustalania czynnika etiologicznego będącego przyczyną zakażenia górnych dróg oddechowych.

**Wyniki.** Zebrane w ankietach informacje wykazały, że szybkie testy diagnostyczne są uznawane przez lekarzy i pacjentów za wiarygodne i bardzo pomocne narzędzie w różnicowaniu bakteryjnych i wirusowych zakażeń górnych dróg oddechowych, zwłaszcza gdy objawy kliniczne są niejednoznaczne. W opinii 87% ankietowanych lekarzy powszechne wykorzystanie w gabinetach lekarskich tego rodzaju testów wpłynęłoby na ograniczenie stosowania antybiotyków oraz zjawiska antybiotykooporności. Analiza zebranych danych wykazała, że dostępność w/w testów jest niewystarczająca i znacząco odbiega od oczekiwań zarówno lekarzy, jak i pacjentów. Aż 78% rodziców/opiekunów pacjentów pediatrycznych i 69% dorosłych pacjentów wyraziło w ankiecie chęć wykorzystania przed zastosowaniem antybiotyku badania różnicującego zakażenia bakteryjne od wirusowych.

**Wniosek.** Przeprowadzona analiza jednoznacznie wykazała, że stosowanie szybkich testów diagnostycznych przez lekarzy podstawowej opieki zdrowotnej (zwłaszcza przez pediatrów) jest pomocne w wielu aspektach klinicznych. Uzyskane dane obrazują także problem, jakim jest ograniczona dostępność tego rodzaju testów w gabinetach lekarzy rodzinnych i pediatrów.

## P-71

### **Wpływ diety na współczynnik apoB/apoA1 u młodych dorosłych**

*Kalina Maćkowiak, Miłostawa Zowczak-Drabarczyk, Alicja Brożek, Anna Blacha, Marcin Nowicki, Alicja Płóćniczak, Aleksandra Pocheć, Dorota Formanowicz, Maria Pioruńska-Stolzmann,*

Zakład Biochemii Klinicznej i Medycyny Laboratoryjnej, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu

**Wstęp.** Badania naukowe wskazują, że prawidłowe żywienie sprzyja zachowaniu zdrowia. Współczynnik apoB/apoA1 jest jednym z najsilniejszych markerów ryzyka chorób sercowo-naczyniowych.

Celem pracy było określenie wpływu diet wegetariańskiej i tradycyjnej na współczynnik apoB/apoA1, wybrane parametry gospodarki lipidowej i węglowodanowej oraz stężenie homocysteiny u zdrowych młodych dorosłych.

**Materiał i metody.** Badaniem objęto dwie grupy zdrowych osób w wieku 20-40 lat: wegetarian (W) (14 mężczyzn i 38 kobiet) oraz stosujących dietę tradycyjną (T) (20 mężczyzn i 33 kobiet). Wszystkie osoby badane deklarowały stosowanie tej samej diety od co najmniej 12 miesięcy. Z krwi żyłnej, pobranej na czczo, wykonano analizy: profilu lipidowego (analyzer Cobas B101), stężeń: apolipoproteinapo A1 i apo B (metodą nefelometryczną, analyzer ADVIA2120), glukozy (GLU) (testami suchej chemii Roche Diagno-

stics, analizator Reflotron) i homocysteiny (HCY) (metodą chemiluminescencji bezpośredniej, analizator Advia Centaur) Ponadto wykonano badania antropometryczne (wskaźnik BMI, obwód pasa) oraz pomiar ciśnienia tętniczego krwi. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej przy użyciu programu Statistica 10.0.

**Wyniki.** Zaobserwowano istotne różnice pomiędzy badanymi grupami w zakresie: apo A1: 1,53 g/l (W) vs. 1,62 g/l (T), [p=0,007]; apo B: 0,63 g/l (W) vs. 0,78 g/l (T), [p<0,001]; współczynnika apoB/apoA1 0,42 (W) vs. 0,47 (T) [p=0,002], stężenia (T-C): 160 mg/dl (W) vs. 176 mg/dl (T), [p=0,01]; a także obwodu pasa: 75 cm (W) vs. 79 cm (T), [p=0,04]. Natomiast nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy grupami w zakresie BMI, ciśnienia krwi, HCY, GLU, HDL-C, LDL-C oraz TAG.

**Wnioski.** Stosowanie diety wegetariańskiej przez zdrowych młodych dorosłych wpływa na obniżenie współczynnika apoB/apoA1, co w przyszłości może zmniejszać ryzyko wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych.

## P-72

### Insulinooporność i cechy zespołu metabolicznego u ludzi młodych

Sylwia Płaczowska (1), Izabela Kokot (2), Katarzyna Sołkiewicz (2), Lilla Pawlik-Sobecka (2), Agnieszka Piwowar (3)

(1) Diagnostyczne Laboratorium Naukowo-Dydaktyczne, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, (2) Zakład Praktycznej Nauki Zawodu Analityka, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, (3) Katedra i Zakład Toksykologii, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

**Wstęp.** Poważnym problemem współczesnej medycyny jest wzrastająca liczba osób z zespołem metabolicznym (ZM) oraz insulinopornością, które są głównymi czynnikami ryzyka rozwoju chorób cywilizacyjnych takich jak cukrzyca, nadciśnienie i choroby sercowo-naczyniowe. Wystąpienie cech zespołu metabolicznego oraz insulinoporności na wiele lat wyprzedza rozwój chorób metabolicznych i powinno być wskazaniem do podjęcia działań prewencyjnych. Przedstawione powyżej informacje są mocno ugruntowane dla populacji osób w średnim wieku, ale w ostatnim czasie pojawiają się doniesienia o występowaniu coraz liczniejszych zaburzeń metabolicznych w populacjach osób młodych, nawet przed 30 rokiem życia. Celem badania była ocena stopnia insulinoporności w zależności od liczby zidentyfikowanych cech ZM w grupie osób młodych, potencjalnie zdrowych.

**Materiał i metody.** Do badania włączono 152 osoby w wieku 18-31 lat (108 kobiet i 44 mężczyzn) bez wcześniej zdiagnozowanych i leczonych farmakologicznie zaburzeń węglowodanowych i lipidowych. U wszystkich uczestników dokonano pomiarów obwodu pasa i ciśnienia krwi tętniczej, a także wykonano oznaczenia stężenia glukozy, profilu lipidowego i insuliny na czczo oraz glukozy i insuliny w 60 i 120 minucie doustnego testu tolerancji glukozy

(DTTG). Na podstawie uzyskanych danych obliczono wskaźniki insulinoporności (HOMA 1) oraz insulinowrażliwości (Matsuda Index), a także zidentyfikowano obecność cech zespołu metabolicznego zgodnie z definicją IDF 2009. Analiza statystyczna uzyskanych wyników przeprowadzono z wykorzystaniem testu ANOVA Kruskala-Wallis.

**Wyniki.** Uzyskane wyniki wskazują na istotne zwiększenie wskaźnika HOMA1 u osób ze zidentyfikowanym zespołem metabolicznym: w odniesieniu do osób bez cech ZM (p < 0,001) oraz wykazujących 1 lub 2 cechy ZM (p < 0,011) oraz spadek Matsuda Index w odniesieniu do osób bez cech ZM (p < 0,001).

**Wnioski.** Występowanie ZM jest związane z istotnym zwiększeniem insulinoporności wątrobowej oraz zmniejszeniem insulinowrażliwości tkanek obwodowych. Problem ZM i insulinoporności dotyczy w znacznym stopniu również ludzi młodych i wymaga wprowadzenia odpowiednich działań prewencyjnych, w celu zapobiegania rozwojowi poważnych powikłań pod postacią cukrzycy oraz chorób sercowo-naczyniowych. U osób młodych wskazane jest wykonywanie trzypunktowego DTTG i wyznaczenie wskaźników insulinoporności/wrażliwości, które są mogą być nowym, skutecznym narzędziem służącym motywowaniu do zmiany stylu życia.

## P-73

### Oksydacyjna modyfikacja lipoprotein osocza u osób otyłych

Lena Bielawska (1), Aleksandra Baszczuk (1), Anna Thielemann (1), Aleksandra Ludziejewska (1), Grażyna Kasprzak (1), Natalia Urbańska (2), Maciej Cymerys (3), Ewa Wysocka (1)

(1) Katedra i Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, (2) Natalia Urbańska, Szpital Kliniczny Przemienienia Pańskiego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, (3) Katedra Chorób Wewnętrznych, Zaburzeń Metabolicznych i Nadciśnienia Tętniczego, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

**Wstęp.** Otyłość brzuszna, insulinoporność, dyslipidemia i dysglukemia są uznanymi czynnikami ryzyka chorób sercowo-naczyniowych (ChSN). Stres oksydacyjny jest elementem łączącym wymienione zaburzenia. Celem pracy była ocena produktów oksydatywnej modyfikacji lipoprotein osocza u osób otyłych, z uwzględnieniem insulinoporności.

**Materiał i metody.** U osób z otyłością brzuszną, w wieku 26-65 lat, bez chorób ostrych i przewlekłych i nie stosujących specjalnej diety, oceniono obwód talii, BMI, zawartość tkanki tłuszczowej (%TŁ) i ciśnienie tętnicze. Podczas testu doustnej tolerancji glukozy, OGTT, zmierzono glikemię (G-0') i (G-120') oraz na czczo parametry lipidowe: T-C, HDL-C, TAG, LDL-C (Siemens, Dimension) i apoB (immunoturbidymetria). Osoby ze świeżo rozpoznaną cukrzycą typu 2 wykluczono z dalszych badań. W 0' i 120' OGTT we krwi zmierzono stężenia: insuliny, Ins (ELISA), całkowitego stanu antyoksydacyjnego osocza, TAS (Randox) oraz produktów



oksydatywnej modyfikacji lipoprotein: produkty peroksydacji lipidów jako substancje reagujące z kwasem tiobarbiturowym, TBARS (wg Okhawa) i oksydowane LDL, oxLDL (ELISA) wg pomiaru oksydowanych apoB w LDL. Utworzono trzy grupy w zależności od wskaźnika  $IR=Ins-0'/G-0'$ :  $IR<0,2$  G1(n=17:9K/8M);  $IR 0,2-0,3$  G2(n=18:9K/9M);  $IR>0,3$  G3(n=17:8K/9M). Ideę OGTT, wpływ 75 g glukozy i indeks  $R75=[120']/[0']$  wykorzystano do śledzenia zmian parametrów stresu oksydacyjnego. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programu Statistica 10.0.

**Wyniki.** Osoby nie różniły się wiekiem, SBP, DBP, G-0', G-120', profilem lipidowym i apoB. Osoby G3 prezentowały wyższe BMI i %TŁ. Od G1 do G3 zaobserwowano zwiększanie się stężenia oxLDL-0' ( $p=0,0009$ ) i obniżanie oxLDL-R75 ( $p<0,00001$ ). Stężenia TBARS nie różniły się między grupami G1-G2-G3. W G3 ujawniono najwyższe stężenia TAS-0' w porównaniu z G1 i G2 ( $p=0,02$ ), natomiast TAS-R75 różnił się między badanymi grupami ( $p=0,008$ ): zwiększony w G2 i zmniejszony w G3 w porównaniu z G1. W grupach G1, G2 i G3 obserwowano różne korelacje pomiędzy markerami stresu oksydacyjnego oraz pozostałymi parametrami, świadczące o protekcji jedynie w G1 i częściowo w G2.

**Wnioski.** Podstawowe stężenie TAS osocza, narastające wraz z insulinopornością, może ograniczać przyrost produktów peroksydacji lipidów, ale nie zabezpiecza przed oksydacyjną modyfikacją apoB w LDL. Spadek stężenia oxLDL w 120' OGTT u osób z insulinopornością budzi niepokój zwiększonego pobierania przez komórki posiadające receptor zmiatający.

## P-74

### Ocena wykładników stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego u osób ze zwiększonym ryzykiem sercowo-naczyniowym

Aleksandra Ludziejewska (1), Lena Bielawska (1), Anna Thielemann (1), Aleksandra Baszczuk (1), Grażyna Kasprzak (1), Joanna Walczak-Gocyla (2), Wiesław Bryl (3), Ewa Wysocka (1)

(1) Katedra i Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, (2) Szpital Kliniczny Przemienienia Pańskiego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, (3) Katedra Chorób Wewnętrznych, Zaburzeń Metabolicznych i Nadciśnienia Tętniczego, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

**Wstęp.** Pojęcie „otyły – metabolicznie zdrowy” budzi słuszne wątpliwości. Światowa definicja zespołu metabolicznego nie wyczerpuje zakresu biochemicznych czynników ryzyka chorób sercowo-naczyniowych (ChSN). Stres oksydacyjny jest elementem łączącym wymienione zaburzenia. Celem pracy była ocena równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej w osoczu osób otyłych, w kategoriach ryzyka ChSN uwzględniających stężenie białka C-reaktywnego (CRP).

**Materiał i metody.** U kobiet i mężczyzn, w wieku 30-63 lat, bez chorób ostrych i przewlekłych i nie stosujących specjalnej diety, oceniono obwód talii, BMI, zawartość tkanki tłuszczowej (%TŁ) i ciśnienie tętnicze krwi i przeprowadzono test doustnej

tolerancji glukozy, OGTT, zmierzono glikemię (G-0') i (G-120') oraz na czczo parametry lipidowe: T-C, HDL-C, TAG, LDL-C, HbA1c (HPLC, BioRad) i stężenie hsCRP. Do dalszego etapu zakwalifikowano 72 osoby z prawidłową tolerancją glukozy. W 0 i 120 min. OGTT we krwi zmierzono stężenie insuliny, Ins (ELISA-BioSource), wyliczono wskaźniki insulinoporności. Na czczo oceniono całkowity stan antyoksydacyjny osocza, TAS (Randox) oraz produkty peroksydacji lipidów jako substancje reagujące z kwasem tiobarbiturowym, TBARS (wg Okhawa). Utworzono cztery grupy w zależności od stężenia hsCRP: 3,0mg/l (n=22) O4. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programu Statistica 10.0.

**Wyniki.** Wykazano narastające stężenie TBARS w grupach O1-O4 ( $p=0,03$ ). Badane grupy różniły się stężeniem TAS. Zaobserwowano wzrost poziomu TAS w grupie O2 i O3 w porównaniu z O1 i O4 ( $p=0,04$ ). W całej badanej populacji hsCRP korelowało dodatnio z obwodem talii, ciśnieniem skurczowym, HbA1c, G-0', G-120' i TBARS, spośród wymienionych z obwodem talii i TBARS korelacja była niezależna od pozostałych. TBARS z kolei korelowały dodatnio z obwodem talii, ciśnieniem skurczowym, HbA1c, G-0', G-120', T-C, LDL-C, TAG, a z HDL-C korelowały ujemnie (G-120' i T-C niezależnie od pozostałych). TAS korelowało dodatnio z obwodem talii, G-0', G-120', TAG i ujemnie z HDL-C. Wszystkie te parametry (TAS, TBARS, hsCRP) korelowały ujemnie ze wskaźnikami insulinoporności.

**Wnioski.** Wzajemne powiązania między badanymi parametrami metabolicznymi sugerują, że CRP może być ważnym parametrem w ocenie ryzyka-sercowo-naczyniowego u osób otyłych, zwłaszcza przy braku zaburzeń glikemii.

## P-75

### Diagnostic usefulness of antibodies in children with infectious mononucleosis

Bogdan Cylwik (1), Beata Żelazowska-Rutkowska (1), Małgorzata Wojtkowska (1), Justyna Trochim (1), Witold Olański (2)

(1) Zakład Laboratoryjnej Diagnostyki Pediatrycznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, (2) Klinika Medycyny Ratunkowej Dzieci, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

**Introduction.** Infectious mononucleosis is an acute, self-limiting lymphoproliferative blood disease, which in its classical form is induced by Epstein-Barr virus (EBV) classified in the human as type 4 herpes virus. The onset of the disease is characterised by non-specific flu-like symptoms, such as fever, sore throat and swollen lymph nodes. In younger children the infection can be oligosymptomatic, and in some cases fibrin coating can be observed on the palatine tonsils. Infectious mononucleosis is diagnosed based on clinical symptoms and laboratory tests: biochemical (increased activity of the enzymes: AST, ALT, GGT), haematological (elevated WBC, the presence of mononuclear cells in a blood smear) and through the finding of nonspecific heterophilic antibodies and the specific ones directed towards viral protein components. The study objective was to assess the occurrence and type of antibodies in children with infectious mononucleosis.



**Material and methods.** The study group consisted of 27 children (14 boys and 13 girls) aged 2-16 years (mean:  $6.4 \pm 7.8$ ) with symptoms of infectious mononucleosis, admitted to the Department of Emergency Medicine, Medical University of Białystok. The control group was made up of 28 healthy children (15 boys and 13 girls) aged 2-18 years (mean:  $6.9 \pm 8.4$ ). The study material included venous blood samples collected for clotting. Anti-EBV antibodies (heterophilic and specific: anti-VCA IgM, anti-VCA IgG and anti-EBNA) were determined using the immunochromatographic cassette test VRAPID MONO M&G (Viracell, Spain).

**Results.** The study showed that 18 patients with symptoms of infectious mononucleosis had only anti-VCA IgM, 5 patients had both heterophilic and specific anti-VCA IgM, 3 patients had only heterophilic antibodies and one had heterophilic antibodies as well as specific anti-VCA IgM, anti-VCA IgG and anti-EBNA antibodies. However, in control group anti-EBNA antibodies were detected only in 2 patients.

**Conclusions.** The study indicates that the diagnosis of the acute phase of EBV infection requires determination of specific anti-VCA IgM. Single determination of nonspecific heterophilic antibodies has no clinical significance since these antibodies account for a small percentage of positive results in children with EBV infection.

### P-76 Charakterystyka demograficzna dawców krwi RCKiK w Katowicach, u których potwierdzono zakażenie kiłą w latach 2005 do 2016

Lidia Basta, Ewa Rudowska, Adrian Miara, Stanisław Dyląg, Bożena Drybańska

Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa Katowice

**Wstęp.** Krętek błądy *Treponema pallidum* został zidentyfikowany jako czynnik etiologiczny kiły w 1905 roku. W latach 2005–2016 średni współczynnik zapadalności wynosił 2/100 000 mieszkańców, jego wartość wahała się od 1,6 (2005) do 4,15 (2016).

**Material i metody.** Badaniami objęto wszystkich dawców, którzy oddali krew w RCKiK w Katowicach. Wśród badanych dawców byli dawcy pierwszorazowi jednokrotni, pierwszorazowi powtórni, wielokrotni regularni i wielokrotni powtórni. Każdą grupę dawców pod względem demograficznym podzielono na 6 grup wiekowych: 60 lat z podziałem na kobiety i mężczyzn.

**Wyniki.** W latach 2005-2016 przebadano 604916 dawców w kierunku zakażeń kiłą, w tym 145118 kobiet i 459798 mężczyzn. Zakażenie kiłą wykryto u 224(37/100000 donacji) dawców, w tym u 40(27/100000 donacji) kobiet i 184(40/100000) mężczyzn. U dawców pierwszorazowych jednokrotnych zakażenie kiłą wykryto u 106(81/100000) dawców w tym u 20 (45/100000) kobiet i 86(99/100000) mężczyzn. Najwyższą liczbę zakażeń wykryto u mężczyzn w grupie wiekowej >60 lat (2614/100000). Wśród kobiet najwyższą liczbę zakażeń wykryto w grupie wiekowej 51-60 lat (171/100000). U dawców pierwszorazowych powtórnych wykryto 4 zakażenia kiłą w tym 0 u kobiet i 4(12/100000) u mężczyzn.

Najwyższą liczbę zakażeń wykryto u mężczyzn w grupie wiekowej 41-50 lat(42/100000). U dawców wielokrotnych regularnych zakażenie wykryto u 77(21/100000), w tym u 17 kobiet(23/100000) i 60 mężczyzn (20/100000). Najwyższą liczbę zakażeń wykryto w grupie wiekowej 41-50 lat u kobiet(58/100000) i mężczyzn >60 lat (92/100000). U dawców wielokrotnych powtórnych zakażenie wykryto u 37(60/100000) w tym u 3(19/100000) kobiet i 34(74/100000) mężczyzn. Największą liczbę zakażeń wykryto w grupie wiekowej 41-50 lat u kobiet (55/100000) i >60 lat u mężczyzn(338/100000).

**Wnioski.** 1. W RCKiK w Katowicach w latach 2005 do 2016 kiłą wykryto u 224 dawców, 40 kobiet i 185 mężczyzn. 2. Najwyższą liczbę zakażeń wykryto u kobiet w grupie wiekowej 51-60 lat u dawców pierwszorazowych powtórnych i 41-50 lat u dawców wielokrotnych regularnych i wielokrotnych powtórnych. 3. U mężczyzn najwyższą liczbę zakażeń wykryto w grupie wiekowej 41-50 lat u dawców pierwszorazowych jednokrotnych i pierwszorazowych powtórnych i w grupie > 60lat u dawców wielokrotnych regularnych i wielokrotnych powtórnych.

### P-77 Trendy wyników pozytywnych w badaniach wykrywających markery obecności wirusów HIV, HCV, HBV i krętka błędnego u krwiodawców z województwa śląskiego w latach 2007 – 2016

Ewa Rudowska, Lidia Basta, Anna Kopacz, Aleksandra Wierzelewska, Łucja Maj, Krzysztof Musioł, Stanisław Dyląg, Bożena Drybańska

Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa Katowice

**Wstęp.** Ryzyko przeniesienia czynników zakaźnych poprzez transfuzję, a w szczególności wirusów HIV, HCV, HBV oraz bakterii – krętka błędnego jest poważnym skutkiem ubocznym transfuzji krwi. Takie zagrożenia eliminowane są przez badanie markerów serologicznych i genetycznych wirusów i TP w pobranych donacjach krwi. Ilość wykrywanych zakażeń zależy od rodzaju dawców. Dawca, u którego badania markerów zakaźnych wykonywane są po raz pierwszy, zaliczany jest do dawców pierwszorazowych. Dawca wielokrotny to taki dawca u którego badania wykonywane są po raz kolejny. Analizie poddano obszar województwa śląskiego, na którym krew pobierana jest przez RCKiK w Katowicach.

**Material i metody.** W okresie od stycznia 2007– do grudnia 2016 przebadano – 140 515 dawców pierwszorazowych i 387 423 dawców wielokrotnych stosując metody serologiczne badań dla wirusów HIV, HCV i HBV oraz bakterii TP i badania NAT dla wirusów HIV, HCV, HBV. Wyniki reaktywne w badaniach przesiewowych wykonanych w RCKiK w Katowicach były potwierdzone w RCKiK w Katowicach oraz w Pracowni Wirusologii Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie. W RCKiK w Katowicach badania wykonano przy użyciu testów Architect Abbot i VITROS OCD J&J oraz Taqscreen MPX firmy Roche

**Wyniki.** Wyniki obliczeń zostały pogrupowane ze względu na dawców pierwszorazowych i dawców wielokrotnych. W latach 2007 –

2016 przebadano 140 415 dawców pierwszorazowych i 361 445 dawców wielokrotnych. Wykryto zakażenia u dawców pierwszorazowych w sumie, w ilości: HIV – 26; HCV – 453, HBV – 589, Kiła – 72, Odpowiednio u dawców wielokrotnych wykryto zakażenia w sumie: HIV – 38, HCV – 44, HBV – 25, Kiła – 138. Liczby wykrytych zakażeń zostały przeliczone na 100 000 dawców w celu dokonania porównań. Wyniki przedstawione są w tabelach i na wykresach oddzielnie, dla każdego roku i każdego wirusa. Tablice i wykresy przedstawiają osobno dane dla dawców pierwszorazowych i wielokrotnych.

**Wnioski.** 1. W latach 2007 – 2016 w związku z wykryciem zakażenia HIV, HCV, HBV lub bakterią krętka bladego (TP) zdyskwalifikowano na stałe 1475 zakażonych dawców krwi. 2. Ilość wykrytych zakażeń wirusem HIV jest kilkakrotnie mniejsza od wykrytych zakażeń wirusami HCV i HBV. 3. Zakażenia wirusami HCV i HBV wykrywane są częściej u dawców pierwszorazowych niż u dawców wielokrotnych. 4. Zakażenia kiłą i wirusem HIV wykrywane są częściej u dawców wielokrotnych. 5. Bardzo wyraźnie zaznacza się z kolejnymi latami spadek wykrytych zakażeń wirusami HBV i HCV u dawców pierwszorazowych.

## **P-78** **Kwalifikacja procesowa analizatora immunochemicznego Abbott Architect i2000SR w Regionalnym Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Katowicach**

*Adrian Miara, Lidia Basta, Ewa Rudowska, Stanisław Dyląg, Bożena Drybańska*

Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa Katowice

**Wstęp.** Przetaczanie bezpiecznych składników krwi jest podstawowym celem transfuzjologii. Każde nowe urządzenie wykorzystywane w służbie krwi należy poddać walidacji, w skład której wchodzi m.in. kwalifikacja procesowa. Poprawnie przeprowadzona kwalifikacja procesowa analizatora stanowi gwarancję wiarygodnych wyników badań laboratoryjnych dopuszczających donacje do użytku klinicznego, dlatego też za cel pracy przyjęto opis procedury kwalifikacji procesowej nowego analizatora Abbott Architect służącego do jakościowego wykrywania przeciwciał anty-HIV, anty-HCV, anty-TP oraz antygeny HBsAg w próbkach surowicy/osocza w RCKiK w Katowicach.

**Materiał i metody.** Kwalifikację procesową przeprowadzono porównując wyniki badań z analizatora Abbott Architect dotychczas stosowanego oraz wyniki badań z analizatora podlegającego walidacji. Oznaczenia wykonano zgodnie z instrukcją producenta, a do przeprowadzenia procedury wykorzystano cztery panele próbek osocza przygotowane przez IHiT w Warszawie, sto próbek surowicy pochodzących z badań bieżących, cztery panele reaktywnych próbek surowicy, archiwizowanych w RCKiK w Katowicach, dla których wyniki testów potwierdzenia były dodatnie. Dokonano także oceny precyzji metod poprzez oznaczenie próbek o różnej reaktywności odpowiednio trzy razy w ciągu jednego dnia i w czasie trzech kolejnych dni. Następnie wyznaczono podstawowe parametry statystyki opisowej dla otrzymanych wyników.

**Wyniki.** Wykazano pełną zgodność wyników uzyskanych z obu analizatorów. Wyniki reaktywne (S/CO) uzyskane dla poszczególnych próbek panelowych mieściły się w zakresie 1,25-223,87 dla anty-HIV, 2,23-6,22 dla anty-HCV, 20,92-4538,05 dla HBsAg oraz 1,09-26,99 dla anty-TP. Średnie wyniki (S/CO) pomiaru dla próbek w ocenie powtarzalności wynosiły: anty-HIV 0,12; 4,57; 72,03, anty-HCV 0,05; 2,19; 16,26, HBsAg 0,18; 5,35; 4236,63, natomiast dla anty-TP 0,04; 2,28; 48;52. W badaniu odtwarzalności metod uzyskano wyniki: anty-HIV 0,13; 4,58; 72,73, anty-HCV 0,05; 2,1; 16,4, HBsAg 0,18; 5,43; 4220,49, anty-TP 0,04; 2,36; 33,02. Współczynniki zmienności były mniejsze niż 20%.

**Wnioski.** Kwalifikację procesową analizatora Abbott Architect i2000SR zakończono z wynikiem pozytywnym. Urządzenie pracuje poprawnie w całym operacyjnym zakresie pomiarów, ze szczególnym uwzględnieniem skrajnych limitów. Wyniki testowania próbek z paneli walidacyjnych zostały pozytywnie ocenione przez IHiT. Urządzenie spełnia wymagania specyfikacji i dopuszczono je do użytku przy pełnym obciążeniu.

## **P-79** **Czynniki wpływające na starzenie się płytek krwi podczas przechowywania koncentratów krwinek płytkowych – badania wstępne**

*Aneta Wrzyszc (1), Paulina Mozdyniewicz (2), Alina Rak (3)*

(1) Katedra Analityki Medycznej, Zakład Hematologii Laboratorium Synevo, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, (2) Laboratorium Synevo, Szpital Św. Rafała w Krakowie, (3) Katedra Analityki Medycznej, Zakład Chemii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

**Wstęp.** Koncentraty krwinek płytkowych (KKP) są niezastąpione podczas leczenia i zapobiegania małopłytkowości, lecz znajdują też coraz częstsze zastosowanie w medycynie regeneracyjnej. Charakteryzują się bardzo krótkim terminem przydatności do użycia związanym z procesem tzw. starzenia się płytek. Możliwe, że zmiany zachodzące w płytkach podczas przechowywania, objawiające się obniżeniem reaktywności i wzrostem ich aktywacji, częściowo wynikają z zanieczyszczenia preparatów leukocytami i substancjami z nich uwalnianymi.

**Materiał i metody.** Materiał stanowiły KKP przechowywane w RCKiK we Wrocławiu w „oddychających” pojemnikach, na mieszadle horyzontalnym, w temp. 20 – 24°C. Próbkę badaną oddzielano od pierwotnego pojemnika w systemie zamkniętym w dniu przygotowania KKP (0), po 24, 48, 120 i 144 godzinach. Każdą próbkę poddano analizie ilościowej (CELL-DYN 1800). We wszystkich próbkach oceniono ekspresję aktywnego receptora dla fibrynogenu (PAC-1, CyFlow Space) oraz adhezję do fibrynogenu w warunkach statycznych. Badano również wpływ leukocytów na wyniki tych badań wykorzystując lizaty leukocytów izolowanych z badanych KKP. Analizę statystyczną wyników przeprowadzono z wykorzystaniem testu Wilcoxon dla par powiązanych.

**Wyniki.** Zaobserwowano zmiany PLT i WBC w trakcie przechowywania preparatów ze znaczącym obniżeniem po 144 h ( $p=0,0076$  i  $p=0,0051$ ) oraz stopniowe zmniejszanie MPV ( $p=0,0033$  po

144 h, n=6). Stwierdzono stopniowy wzrost ekspresji PAC-1 na płytkach ( $p=0,0277$ ) do 48 h przechowywania, a po 144 h odnotowano spadek jego ekspresji. Podobne zmiany zaobserwowano w adhezji płytek do fibrynogenu, gdzie po maksymalnym wzroście po 48 h ( $p=0,277$ ), po 120 h zauważono spadek adhezji do poziomu z 24 h. Po dodaniu do płytek lizatu leukocytów stwierdzono zahamowanie adhezji trombocytów zależne od dawki lizatu ( $p<0,0001$ ) mimo równoczesnego wzrostu ekspresji PAC-1 ( $p=0,0280$ ).

**Wnioski.** Jednym z czynników wpływających na starzenie się płytek krwi w KKP może być zanieczyszczenie preparatów leukocytami. Wyniki naszych badań sugerują, że identyfikacja i hamowanie niekorzystnego działania na płytki substancji uwalnianych przez leukocyty oraz/lub udoskonalenie metod usuwania leukocytów z preparatów płytkowych może przyczynić się do wydłużenia żywotności płytek krwi w koncentratkach.

## P-80

### Metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej MMP-9 jako marker starzenia się płytek krwi

Alina Rak (1), Agnieszka Sapa (1), Kornela Wiśniewska (2), Karolina Todryk (2), Monika Wieczorek (2), Aneta Wrzyszc (2)

(1) Katedra Analityki Medycznej, Zakład Hematologii Laboratoryjnej, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, (2) Studenckie Koło Naukowe Medycyny Laboratoryjnej, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, (3) Katedra Analityki Medycznej, Zakład Hematologii Laboratoryjnej, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

**Wstęp.** Uważa się, że MMP-2 i MMP-9 mają wpływ na funkcje płytek krwi: MMP-2 działa pro-, a MMP-9 antyagregacyjnie. Udowodniono, że płytki posiadają i w miarę aktywacji wydzielają MMP-2, natomiast kwestią dyskusyjną pozostaje obecność w płytkach MMP-9. Dotychczasowe badania sugerują, że zawartość niektórych białek w płytkach może być zdeterminowana stopniem ich dojrzałości. Celem pracy było zbadanie aktywności MMP-2 i MMP-9 w subpopulacjach płytek krwi.

**Materiał i metody.** Materiał do badań stanowiły koncentraty krwinek płytkowych (KKP) otrzymane z RCKiK we Wrocławiu oraz świeża krew pobrana od zdrowych ochotników na cytrynian sodu w stosunku 9:1. Subpopulacje płytek krwi izolowano na gradiencie OptiPrep (Sigma-Aldrich). Każdą próbkę poddano analizie ilościowej (CELL-DYN 1800). W izolowanych płytkach krwi oceniano aktywność MMP-2 i MMP-9 metodą zymografii żelatynowej. Obie badane metaloproteinazy wykazują aktywność żelatynolityczną. Po wybarwieniu żelu aktywność żelatynaz była widoczna w postaci jasnych pasm na granatowym tle. Żele skanowano przy użyciu densytometru BIO-RAD G5-800 i analizowano za pomocą oprogramowania Quantity One (BioRad). Odsetek młodych płytek w izolowanych subpopulacjach oceniono metodą cytometrii przepływowej (CyFlow Space) po wybarwieniu płytek 1% roztworem oranżu tiazolu (OT, BD). Do analizy statystycznej wyników wykorzystano test Wilcozona dla par powiązanych oraz współczynnik R Spearmana.

**Wyniki.** W wyniku izolacji subpopulacji z KKP uzyskano 3 frakcje różniące się MPV ( $p=0,0277$ ,  $n=6$ ) oraz odsetkiem płytek OT-dodatnich ( $p=0,0346$ ,  $n=6$ ) z wysoką korelacją między tymi parametrami ( $r=0,5953$ ,  $p<0,05$ ). MPV kolejnych frakcji wynosiło średnio:  $F1=5,8\pm 0,88$  fl,  $F2=7,0\pm 0,6$  fl a  $F3=9,8\pm 0,56$  fl. Aktywność MMP-2 w KKP w kolejnych subpopulacjach nieznacznie rosła z 1,64 do 1,95 AU, natomiast aktywność MMP-9 znacząco spadała 4,14 do 2,04 AU i była silnie odwrotnie zależna od MPV ( $r=-0,6835$ ,  $p<0,05$ ). W płytkach krwi izolowanych ze świeżo pobranej krwi nie stwierdzono aktywności MMP-9.

**Wnioski.** Brak aktywności MMP-9 w płytkach krwi izolowanych ze świeżej krwi oraz pojawienie się aktywności enzymu w płytkach przechowywanych, wskazuje, że enzym ten jest absorbowany przez płytki z zewnątrz. Aktywność MMP-9 w płytkach jest silnie uzależniona od ich wielkości i stopnia dojrzałości. Oba fakty sugerują, że MMP-9 może być markerem starzenia się płytek krwi.

## P-81

### Działanie cytotoksyczne i proapoptotyczne metylotio-stilbenów-analogów resweratrolu

Małgorzata Zielińska-Przyjemka (1), Renata Mikstacka (2), Michał Cichocki (1), Tomasz Stefański (3), Mariusz Kaczmarek (4), Wanda Baer-Dubowska (1)

(1) Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, (2) Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika Collegium Medicum w Bydgoszczy, (3) Katedra i Zakład Technologii Chemicznej Środków Leczniczych, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, (4) Katedra Immunologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

**Wstęp.** Resweratrol jest fitoaleksyną o szerokim spektrum aktywności biologicznej. Szczególnie istotne są jego właściwości anty-oksydacyjne i anty-kancerogenne, które mogą być wykorzystane m.in. w terapii adjuwantowej nowotworów. Niska biodostępność ogranicza jednak jego zastosowanie kliniczne. Z tego powodu poszukiwane są naturalne i syntetyczne pochodne o korzystniejszych parametrach farmakokinetycznych i nie mniejszej od związku macierzystego aktywności biologicznej. Celem badań była ocena zdolności nowych analogów resweratrolu do hamowania cyklu komórkowego i indukcji apoptozy w komórkach nowotworowych nabłonka skóry i gruczołu piersiowego.

**Materiał i metody.** Do badań wykorzystano ludzkie komórki nowotworowe linii A431 (rak kolczasty naskórka) i MCF7 (rak gruczołu piersiowego) oraz prawidłowe immortalizowane keratynocyty linii HaCaT i komórek nabłonka gruczołu piersiowego linii MCF-12A. Ocenę cytotoksyczności siedmiu 4'-metylotio-trans-stilbenów (MTS) przeprowadzono testem MTT. Do oceny oddziaływania wybranych stilbenów na cykl komórkowy i zdolność indukcji apoptozy wykorzystano technikę cytometrii przepływowej. Test polimeryzacji tubuliny przeprowadzono wykorzystując oczyszczoną świniąską tubulinę.



**Wyniki.** Najwyższą podatność na cytotoksyczne działanie MTS stwierdzono w przypadku komórek MCF7 (IC50 2,1±0,4 – 5,1±1,4µM). Aktywność pro-apoptyczna 3,4,5-MTS i 2,4,5-MTS, była porównywalna z aktywnością trans-resweratrolu. W odniesieniu do cyklu komórkowego w linii MCF7 i A431 zaobserwowano statystycznie znaczne wydłużenie fazy G2/M pod wpływem inkubacji z 3,4,5-MTS, podczas gdy resweratrol w niższych stężeniach wydłużał fazę S (p<0,05). Równocześnie wykazano indukcję apoptozy wywołaną przez 3,4,5-MTS i 2,4,5-MTS w stężeniu 10 i 25µM (p<0,05) w obu liniach komórkowych. Badane związki 3,4,5-MTS i 2,4,5-MTS w stężeniu 10 µM zwiększały polimeryzację tubuliny (odpowiednio o 32,9 i 23,2 %) w porównaniu do próby kontrolnej.

**Wnioski.** 1. Zwiększanie polimeryzacji tubuliny przez 3,4,5-MTS w większym stopniu niż pozostałe analogi wskazuje na jego potencjał jako czynnika anty-mitotycznego. 2. Anty-mitotyczne działanie tej pochodnej stilbenu w komórkach MCF7 i A431 wiąże się z hamowaniem ich proliferacji poprzez indukowanie apoptozy i cyklu komórkowego w fazie G2/M. 3. Właściwości te mogą być potencjalnie wykorzystane do wspomagania działania chemioterapeutyków i zwiększenia ich skuteczności.

## P-82

### Analiza wyników programu zewnętrznej oceny jakości oznaczania stężenia karbamazepiny w polskich laboratoriach uczestniczących w programie Labquality w roku 2016

Robert Kowalski (1), Agnieszka Cwiklińska (2), Aleksandra Fijałkowska (3), Gabriela Bednarczuk (3), Krzysztof Lewandowski (1)

(1) Zakład Terapii Monitorowanej i Farmakogenetyki Katedra Analityki Klinicznej Gdański Uniwersytet Medyczny, (2) Zakład Chemii Klinicznej Katedra Analityki Klinicznej Gdański Uniwersytet Medyczny, (3) Systemy Oceny Wiarygodności Analiz Medycznych Sowa-Med., Gdańsk

**Wstęp.** Karbamazepina (CBZ) należy do leków przeciwpadaczkowych, o wąskim przedziale stężeń terapeutycznych, wynoszącym od 20 do 50 µmol/l. Terapia tym lekiem powinna być monitorowana oznaczeniem jego stężenia w osoczu krwi, w celu indywidualizacji dawkowania oraz zmniejszenia ryzyka wystąpienia działań toksycznych. Celem niniejszej pracy była analiza wyników oznaczania stężenia CBZ w polskich laboratoriach uczestniczących w międzynarodowym programie zewnętrznej oceny jakości (EQA).

**Materiał i metody.** Analizie poddano wyniki 4 sprawdzianów EQA organizowanego przez Labquality (Finlandia) w roku 2016. W każdym sprawdzianie laboratorium otrzymywało 2 liofilizowane próbki osocza, w których po rekonstrukcji oznaczano stężenie leku. Wyniki laboratoriów grupowano w zależności od stosowanego systemu analitycznego i porównywano do wartości oczekiwanej (WO) ustalonej dla danej grupy metodycznej. Zakres dopuszczalny ustalono jako przedział WO±10%. WO dla poszczególnych grup metodycznych porównano za pomocą testu ANOVA. Znaczącość statystyczną ustalono na poziomie p<0,05. W roku 2016 w programie EQA analizie poddano łącznie 549 wyników oznaczania stężenia CBZ, z czego 90 uzyskano od polskich uczestników. W sprawdzianach uczestniczyło 18 różnych polskich laboratoriów, 5 brało udział w 4 sprawdzianach, 1 w 3, 10 w 2 i 2 w 1 sprawdzianie. Polskich uczestników sklasyfikowano w 5 z 17 grup metodycznych; 40 wyników uzyskano przy użyciu systemu Siemens SYVA EMIT, 24 – Abbott Architect immunochemical, 18 – Roche Integra, 4 – Olympus i 4 – Roche Hitachi/Modular cobas c.

**Wyniki.** Średnie odchylenie wyników polskich laboratoriów wyniosło -1,1±10,8% (min. -23%, maks. +16%). 77 wyników (85,6%) mieściło się

w dopuszczalnym zakresie błędów <10%, 11 wyników (12,2%) – w przedziale 10-20%. Dla 2 wyników (2,2%) błąd wyniósł >20%. Analiza WO dla poszczególnych systemów analitycznych wykazała, że wyniki uzyskane za pomocą poszczególnych systemów analitycznych różniły się znacząco (p<0,001). Najniższe wartości wyników uzyskano systemem Abbott Architect immunochemical, najwyższe – systemem Olympus. Średnia różnica WO między tymi systemami analitycznymi wynosiła 20±6%. Udział w programach EQA jest ważnym elementem zapewniania jakości oznaczeń stężenia leków, w tym karbamazepiny.

**Wnioski.** Jakość oznaczeń CBZ w polskich laboratoriach uczestniczących w programie EQA Labquality można uznać za zadowalającą. Niemniej, interpretując wyniki oznaczania stężenia CBZ u pacjentów, należy zwracać uwagę na różnice pomiędzy systemami analitycznymi.

## P-83

### Adiponektyna i adipsyna jako parametry przydatne w ocenie zaburzeń metabolicznych w cukrzycy typu 2

Elżbieta Mizgała (1), Anna Mertas (2), Ewelina Szliszka (2)

(1) Katedra i Zakład Medycyny Rodzinnej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, (2) Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

**Wstęp.** Adiponektyna i adipsyna są adipocytokinami, których głównym źródłem są komórki tkanki tłuszczowej białej. Adiponektyna odgrywa znaczącą rolę w regulacji glikemii i lipidemii, natomiast adipsyna bierze udział w aktywacji układu dopełniacza na drodze alternatywnej. Wymienione adipocytokiny zyskują obecnie coraz większe znaczenie w aspekcie ich przydatności w procesie diagnostycznym zaburzeń metabolicznych występujących m.in. w przebiegu takich schorzeń jak cukrzyca typu 2, miażdżyca, nadciśnienie tętnicze, czy otyłość.

Przeprowadzone badania miały na celu ocenę stężenia adiponektyny i adipsyny w surowicy krwi osób z rozpoznaną cukrzycą typu 2 oraz analizę stężenia tych parametrów z uwzględnieniem wieku i BMI pacjentów, czasu trwania cukrzycy i jej wyrównania oraz wybranych parametrów gospodarki lipidowej (cholesterol całkowity, HDL i LDL).

**Materiał i metody.** Badaniami objęto 55 osób (41 kobiet i 14 mężczyzn) w wieku od 41 do 88 lat (średni wiek = 68 lat) z rozpoznaną cukrzycą typu 2, u których HbA1c przyjmowała wartości od 5,5 do 9,0% (średnia = 7,0%), natomiast wartość BMI wynosiła od 19,6 do 44,0 (średnia = 31,0). Stężenie adiponektyny i adipsyny oznaczano w surowicy krwi badanych osób z wykorzystaniem zestawu odczynników Bio-Plex Pro Diabetes 2-Plex assay oraz zestawu aparatury Bio-Plex 200 System firmy Bio-Rad (USA).

**Wyniki.** Stężenie adiponektyny u badanych osób z cukrzycą typu 2 przyjmowało wartości od 584,9 do 31301,0 ng/ml (średnia=7005,3 ng/ml) i wykazywało istotną statystycznie korelację dodatnią (p=0,0308) ze stężeniem adipsyny, które mieściło się w zakresie od 424,7 do 3265,7 ng/ml (średnia=934,8 ng/ml). Stężenie adiponektyny wykazywało także istotną statystycznie korelację ujemną ze stężeniem cholesterolu całkowitego (p=0,0005) oraz cholesterolu LDL (p=0,0045). Nie stwierdzono korelacji stężenia ocenianych adipocytokin z wiekiem i BMI badanych osób oraz czasem trwania i stopniem wyrównania cukrzycy typu 2.

**Wnioski.** Oceniane u osób z cukrzycą typu 2 adipocytokiny (adiponektyna i adipsyna) są parametrami, które mogą w przyszłości stanowić znaczące uzupełnienie algorytmu badań laboratoryjnych wykorzystywanych podczas diagnozowania i monitorowania leczenia chorób w przebiegu których występują zaburzenia metaboliczne.



## Skorowidz autorów

<b>A</b>		Cymerys Maciej	P-73
Adamowicz-Salach Anna	P-22	Czech Malwina	P-51
Antoniewicz-Papis Jolanta	10-W-3, P-68	Czubasiewicz Zofia	P-69
<b>B</b>		<b>Ć</b>	
Badowska Wanda	P-31	Ćwiklińska Agnieszka	P-35, P-36, P-37, P-38, P-60, P-82
Baer-Dubowska Wanda	P-81	<b>D</b>	
Banach Maciej	P-39	Dąbkowski Kamil	P-35, P-36, P-37, P-38, P-60
Basta Lidia	P-76, P-77, P-78	Dąbrowska Milena	P-65
Baszczyk Aleksandra	P-43, P-64, P-73, P-74	Deja Regina	P-44, P-51
Bauer Alicja	14-U-1	Demkow Urszula	6-W-3, 14-W-1
Beck Brygida	P-15	Derwich Katarzyna	P-31
Bednarczuk Gabriela	P-82	Dębska Marzena	P-17, P-18, P-19, P-34
Bednarek-Papierska Lucyna	P-24, P-25, P-26	Dębski Romuald	P-18
Bednarek-Skublewska Anna	P-11	Donica Helena	P-57
Bejger Dorota	P-27	Drożdż Ryszard	P-02, P-61
Będkowska Ewa	P-50	Drybańska Bożena	P-76, P-77, P-78
Bielarczyk Hanna	P-59	Dumnicka Paulina	P-02, P-16
Bielawska Lena	P-43, P-64, P-73, P-74	Dybska Emilia	P-43
Bielińska-Bujniewicz Eugenia	P-39	Dyląg Stanisław	P-76, P-77, P-78
Biesaga Beata	2-W-5	Dymicka-Piekarska Violetta	P-47, P-52
Bil-Lula Iwona	1-U-1, P-63	Dyś Aleksandra	P-59
Błacha Anna	P-20, P-53, P-66, P-71	Dziatkiewicz Paulina	P-30
Boguszewicz Łukasz	P-44	Dziedzic Marcin	P-11
Borkowska Edyta	P-23	Dżumak Anna	P-43, P-64
Borowiec Maciej	P-23	<b>E</b>	
Boruta Beata	P-06, P-39	Ejduk Anna	P-22
Boruta Agnieszka	P-39	<b>F</b>	
Brandys Katarzyna	P-54	Fabijańska-Mitek Jadwiga	P-33
Brojer Ewa	P-17, P-18, P-19, P-22, P-34	Fedak Danuta	P-01
Brożek Alicja	P-20, P-53, P-66, P-71	Fijałkowska Aleksandra	P-82
Bryl Wiesław	P-74	Fischer Katarzyna	14-W-2
Bugajska Jolanta	6-W-4	Flisiak Robert	9-W-2
Bujniewicz Eugenia	P-06	Formanowicz Dorota	P-20, P-53, P-66, P-71
Bulanda Małgorzata	3-W-4	Fuksiewicz Małgorzata	P-55, P-56
Buziak-Bereza Monika	8-W-4	<b>G</b>	
<b>C</b>		Gaciong Zbigniew	11-W-1
Cackowska Monika	P-36, P-37, P-38	Gacuta Ewa	P-50
Celejewska Agata	P-45	Gala-Błądzińska Agnieszka	P-16
Celewicz Zbigniew	P-18	Gaweł Kinga	P-11
Ceranowicz Piotr	P-16	Gaweł Damian	14-U-1
Chlebowska-Tuz Justyna	P-32	Gawęda Paulina	P-01
Chmura Aleksandra	P-42, P-45	Gawrońska Beata	P-09, P-52
Chorostowska-Wynimko Joanna	11-W-3	Gierszon Agnieszka	P-19
Chrostek Lech	9-W-1, 9-W-2, 9-W-3, 9-W-4, P-50	Giglok Monika	P-51
Chrzanowska Anna	P-68	Gila Lidia	P-30
Cichocki Andrzej	P-55, P-81		
Ciepiela Olga	13-W-3		
Cylwik Bogdan	9-W-1, 9-W-2, 9-W-3, 9-W-4, P-75		

Gindzieńska-Sieskiewicz Ewa	9-W-4	Komosińska-Vassev Katarzyna	P-10, P-29, P-58
Glinicki Piotr	P-24, P-25, P-26	Konarzewska Anna Małgorzata	P-65
Gliwińska Anna	P-35, P-36, P-37, P-38, P-60	Konduracka Ewa	5-W-1
Gmerek Katarzyna	P-33	Kopacz Aneta	P-67, P-68
Godowska Monika	9-W-2	Kopacz Anna	P-77
Godzik Paulina	P-67	Kopeć Izabela	P-18, P-19, P-22
Gomółka Ewa	15-W-3	Koper Olga Martyna	P-09, P-52
Gosiewski Tomasz	3-W-4	Korman Lucyna	P-07
Grabarczyk Piotr	10-W-1, P-67, P-68	Korpysz Maciej	P-57
Grodecka-Gazdecka Sylwia	P-43	Kortas-Stempak Barbara	P-35, P-36, P-37, P-38, P-60
Grodzicki Tomasz	2-W-1	Kościelniak Barbara	P-14
Gruszewska Ewa	9-W-2, 9-W-3, 9-W-4	Kotowicz Beata	P-55, P-56
Gryglewska Halina	2-W-1	Kowalczyk Jerzy	P-31
Gudowska Monika	9-W-3, 9-W-4	Kowalska Maria	2-W-3, P-55, P-56
Guz Katarzyna	10-W-6, P-17, P-18, P-19, P-22, P-34	Kowalski Robert	P-82
Guzińska-Ustymowicz Katarzyna	P-03, P-04	Koza Katarzyna	P-33
Gwarda Henryka	P-06	Koziński Marek	1-W-1
		Kozłowska Sylwia	P-50
<b>H</b>		Kozłowska-Skrzypczak Maria	P-30
Habior Andrzej	14-U-1	Kozubski Wojciech	P-12
Hałabiś-Kalinowska Magdalena	P-11	Król Ewa	P-36, P-37, P-38
Hubalewska-Dydejczyk Alicja	8-W-2	Kruszyńska Aleksandra	P-24, P-25, P-26
Hurkacz Magdalena	15-W-4	Krzywonos-Zawadzka Anna	1-U-1, P-63
Husebekk Anne	W-P, P-17	Kubicka-Russel Dorota	P-67, P-68
		Kuchta Agnieszka	P-35, P-36, P-37, P-38, P-60
<b>J</b>		Kulis Jan	P-31
Jakubiec Józef L.	11-W-4	Kulpa Jan Kanty	2-W-2, P-40, P-48, P-49, P-54
Jakubowski Lucjusz	3-W-3	Kunicki Paweł K.	15-W-1
Janiec-Jankowska Aneta	P-21	Kurkowska-Jastrzębska Iwona	12-W-1
Jankowski Maciej	P-35, P-36, P-37, P-38, P-60	Kurzawa Paweł	P-43
Jażdżewski Krystian	11-W-2	Kuśnierz-Cabala Beata	P-16
Jelski Wojciech	P-13	Kuźnicki Jacek	12-W-2
Jeske Wojciech	P-24, P-25, P-26	Kuźniewski Marek	P-16
Jochymek Bożena	P-51	Kuźnik-Trocha Kornelia	P-10, P-58
Jońska-Gmyrek Joanna	P-56	Kwiatkowska Ewa	P-21
Jóźwiak Jacek	P-39		
Jurczyszyn Artur	4-W-3	<b>L</b>	
Jurkowski Marek	P-13	Lachert Elżbieta	10-W-2
		Latos Magdalena	P-45
<b>K</b>		Leś Dominika	P-42
Kaczmarek Mariusz	P-81	Lewandowski Krzysztof	P-82
Kamieńska Elżbieta	P-31	Lipartowska-Klimuk Karina	9-W-3
Kamińska Joanna	P-09, P-52	Liszewski Grzegorz	P-67, P-68
Kamzol Wojciech	P-48	Lityńska Anna	P-46
Kapusta Maria	P-01	Lizoń Anna	P-61
Karolczyk Grażyna	P-31	Lubowicka Emilia	P-41, P-50
Kasprzak Grażyna	P-43, P-73, P-74	Ludwig-Gałęzowska Agnieszka	3-W-4
Kemona Andrzej	P-03, P-04	Ludziejewska Aleksandra	P-43, P-64, P-73, P-74
Kemona Halina	P-09, P-52	Luterek Katarzyna	P-18
Kędra Bogusław	9-W-3, P-03, P-04		
Klimczak-Jajor Edyta	P-22, P-34	<b>Ł</b>	
Kokot Izabela	P-07, P-72	Łangowski Krzysztof	P-27
Kolasińska-Ćwikła Agnieszka	P-55	Ławicki Sławomir	P-41, P-50
Kołosza Zofia	P-42, P-45	Łebek-Szatańska Agnieszka	P-24, P-25, P-26
Kołtan Andrzej	P-31	Łętowska Magdalena	P-68

Łoniewska-Lwowska Adrianna	P-33	<b>O</b>	
Łopacz Patrycja	P-19	Obtułowicz Krystyna	P-01
		Odnoczko Edyta	7-W-4
<b>M</b>		Olański Witold	P-75
Machczyński Mariusz	P-20	Olczyk Krystyna	P-10, P-29, P-58
Maćkowiak Kalina	P-20, P-66, P-71	Olczyk Paweł	P-29, P-58
Madaliński Kazimierz	P-67	Orłowska-Dziedzic Ewelina	P-11
Maj Łucja	P-77	Orzińska Agnieszka	10-W-4, P-17, P-18, P-19
Malczewska-Malec Małgorzata	1-W-2	Osada Joanna	P-65
Maleszka Aleksandra	P-02	Ostrowska Magdalena	P-24, P-25, P-26
Malinowska Iwona	P-31	Osztynowicz Krystyna	P-12
Małecka-Massalska Teresa	P-11		
Mamak Dawid	P-70	<b>P</b>	
Manasar Ahmed	P-06, P-39	Pabisek-Miernik Julita	P-14
Manda-Handzlik Aneta	14-W-4	Panasiuk Anatol	9-W-2
Marek Maciej	P-67	Paradowski Marek	5-W-4
Mariak Zenon	P-52	Pater Paulina	P-02
Masłyk Barbara	P-51	Pawiński Tomasz	15-W-2
Mastej Mirosław	P-39	Pawlik-Sobecka Lilla	P-07, P-28, P-72
Matowicka-Karna Joanna	P-09, P-52	Pawlus Joanna	P-65
Maziarz Barbara	P-16	Pawłowski Włodzimierz	P-62
Mazur Bogdan	W-P, P-31, P-69	Pierzyna-Światała Magdalena	P-31
Mazur-Laskowska Małgorzata	P-16	Pietrzak Anna	P-12
Mendek-Czajkowska Ewa	P-22	Pietrzak Agnieszka	P-64
Mertas Anna	P-70, P-83	Pioruńska-Stolzmann Maria	P-20, P-53, P-66, P-71
Miara Adrian	P-76, P-78	Piotrowski Jerzy	P-55
Michalak Sławomir	14-W-3, P-12	Piwowar Agnieszka	P-72
Michalik Mikołaj	P-53	Płaczkowska Sylwia	P-07, P-72
Michno Anna	7-W-3	Płoski Rafał	3-W-2
Mikstacka Renata	P-81	Płóćniczak Alicja	P-20, P-66, P-71
Mitura Joanna	P-21	Pocheć Aleksandra	P-71
Mituś Jerzy W.	P-49	Pokrywka Małgorzata	P-46
Mizgała Elżbieta	P-83	Polcyn-Adamczak Magdalena	P-08
Morawska Marta	P-57	Powrózek Tomasz	P-11
Mozdyniewicz Paulina	P-79	Pryczynicz Anna	P-03, P-04
Mrochem-Kwarciak Jolanta	P-42, P-44, P-45, P-51	Pyl Hanna	P-34
Mroczo Barbara	2-W-4		
Mucha-Małecka Anna	P-40	<b>R</b>	
Musioł Krzysztof	P-77	Radkowski Marek	P-67
Muszyńska-Roslan Katarzyna	P-31	Radziwon Piotr Marek	4-W-1
Myczkowska Kinga	P-06	Rak Alina	P-79, P-80
		Rochowiak-Pajzderska Aleksandra	P-08
<b>N</b>		Romaniuk Wioletta	P-03, P-04
Nawrocki Grzegorz	P-55	Rozwadowska Maria	P-02
Nazorek Dorota	P-42	Ruchała Marek	8-W-3
Niedzielska Ewa	P-31	Rudowska Ewa	P-76, P-77, P-78
Niedźwiecki Maciej	P-31	Rutkowski Tomasz	P-42, P-44, P-45
Niemir Zofia	P-08	Rychlik Urszula	2-W-2, P-40, P-48, P-49, P-54
Noceń Ewa	P-68		
Nowak Marta	P-70	<b>S</b>	
Nowak Mateusz	P-70	Salamon Dominika	3-W-4
Nowakowska Dorota	P-21	Sanak Marek	3-W-1
Nowicka Cecylia	P-27	Sapa Agnieszka	P-80
Nowicki Marcin	P-20, P-53, P-66, P-71	Sas-Korczyńska Beata	P-48

Sawicki Karol	P-52	<b>U</b>	
Sędek Łukasz	P-31	Uhrynowska Małgorzata	10-W-6, P-17, P-19, P-22, P-34
Sierakowski Stanisław	9-W-4	Undas Anetta	7-W-2
Sitkiewicz Dariusz	5-W-2	Urbańska Natalia	P-73
Składowski Krzysztof	P-42, P-44, P-45	<b>W</b>	
Skulimowska Joanna	P-22, P-34	Wajda Justyna	P-16
Słowińska-Solnica Krystyna	P-01	Walczak-Gocyla Joanna	P-74
Smykał-Jankowiak Katarzyna	P-08	Wiczowski Andrzej	P-69
Sobolewska Monika	P-50	Wieczorek Ewa	P-35, P-36, P-37, P-38, P-60
Sobol-Milejska Grażyna	P-31	Wieczorek Monika	P-80
Sokolik Renata	P-07	Wielgoś Mirosław	P-18
Sokołowska Bożena	4-W-2	Wierzelewska Aleksandra	P-77
Solnica Bogdan	13-W-2, P-01, P-16	Wieszcy Paulina	14-U-1
Solski Janusz	P-11	Windyga Jerzy	7-W-1
Solkiewicz Katarzyna	P-07, P-72	Winsz-Szczotka Katarzyna	P-10, P-29, P-58
Sonsala Alicja	P-31	Wiśniewska Kornelia	P-80
Sosada Krystian	13-W-1	Witt Michał	W-I
Spodaryk Mikołaj	P-14	Wnuk Arkadiusz	13-W-4
Sporek Mateusz	P-16	Wojciechowska Beata	10-W-5
Sroka-Oleksiak Agnieszka	3-W-4	Wojtkowska Małgorzata	P-75
Stachurska Anna	P-33	Wolszczak-Biedrzycka Blanka	P-13
Stasik Zofia	P-40, P-49, P-54	Wołkow Paweł	3-W-4
Stefański Tomasz	P-81	Woszczyk Mariola	P-31
Stelmaszczyk-Emmel Anna	6-W-2	Woźniak Mieczysław	1-U-1, P-63
Straburzyńska-Migaj Ewa	5-W-5	Wójcik Ewa	2-W-2, P-40, P-48, P-49, P-54
Sulkowska Ewa	10-W-1, P-67, P-68	Wrzyszc Aneta	P-79, P-80
Sygitowicz Grażyna	5-W-3	Wyglądalska-Jernas Halina	P-12
Szabelewska Małgorzata	P-67	Wygoda Andrzej	P-42, P-44, P-45
Szatkowski Wiktor	P-54	Wysocka Ewa	P-43, P-64, P-73, P-74
Szczepański Tomasz	P-31	<b>Z</b>	
Szczypińska Olga	P-21	Zajkowska Monika	P-41
Szewczyk Marek	P-69	Zaręba Konrad	P-03, P-04
Szliszka Ewelina	P-83	Zasimowicz-Majewska Elżbieta	P-05, P-13
Szmitkowski Maciej	9-W-3, P-50	Zawada Magdalena	4-W-4
Sztefko Krystyna	W-P, 6-W-1, 8-W-1, P-14	Ząbek-Adamska Anna	P-16
Szternel Łukasz	1-W-3	Zgliczyński Wojciech	P-24, P-25, P-26
Szutowicz Andrzej	12-W-3, P-59	Zielińska-Przyjemska Małgorzata	P-81
<b>T</b>		Zińczuk Justyna	P-03, P-04
Tarapacz Jadwiga	P-40, P-48, P-49, P-54	Zorena Katarzyna	12-W-4
Thielemann Anna	P-43, P-64, P-73, P-74	Zowczak-Drabarczyk Miłoslawa	P-20, P-53, P-66, P-71
Tisończyk Joanna	P-02	Zwolińska Paulina	P-67
Todryk Karolina	P-80	<b>Ż</b>	
Tokarz-Kupczyk Elżbieta	P-12	Żelazowska-Rutkowska Beata	P-75
Tomasik Przemysław	P-14	Żurawski Sebastian	P-43
Traczyk-Borszyńska Magdalena	P-23		
Trelińska Joanna	P-31		
Trochim Justyna	P-75		
Turowski Paweł	P-22, P-34		
Twardoch-Pyka Magdalena	P-31		
Tysarowski Andrzej	P-21		



**P-84****Porównanie dwóch metod oznaczania HbA1c – chromatografii wysokociśnieniowej i metody immunoturbidymetrycznej**

Joanna Klimaszewska-Łata, Agnieszka Jankowska-Kulawy, Aleksandra Dyś, Dorota Bizon-Zygmańska, Hanna Bielarczyk

Zakład Medycyny Laboratoryjnej, Katedra Biochemii Klinicznej, Gdański Uniwersytet Medyczny

**Wstęp.** Hemoglobina A1c (HbA1c) jest produktem kondensacji hemoglobiny A z glukozą w procesie tzw. nieenzymatycznej glikacji białek. U ludzi zdrowych HbA1c stanowi 4-6% całkowitej hemoglobiny, natomiast w cukrzycy stopień glikacji hemoglobiny jest większy. Wzrost HbA1c jest na ogół proporcjonalny do zwiększenia stężenia glukozy we krwi w okresie 3 miesięcy poprzedzających badanie. Poziom HbA1c jest, obok glikemii, najczęściej wykorzystywanym wskaźnikiem monitorującym leczenie cukrzycy i umożliwiającym ocenę stanu wyrównania metabolicznego pacjentów. Różnorodność metod stosowanych do oznaczania hemoglobiny glikowanej powoduje, że wyniki oznaczeń dotyczyć mogą różnych glikowanych pochodnych hemoglobiny, a więc nie są ze sobą w pełni porównywalne. Istnieją warianty hemoglobiny, które w zależności od stosowanej techniki mogą zawyżać lub zaniżać wyniki oznaczeń HbA1c. Osiągnięcie porównywalnych wyników jest jednak niezbędne jeśli chce się używać niezależnych od metod kryteriów decyzyjnych w leczeniu cukrzycy. Celem pracy było

przeprowadzenie walidacji dwóch metod analitycznych do określenia poziomu HbA1c we krwi: metody jonowymiennej z użyciem cieczonej chromatografii wysokociśnieniowej (HPLC) – analizator Variant firmy Bio-Rad oraz metody immunoturbidymetrycznej przy użyciu analizatora Architect firmy Abbott.

**Materiał i metody.** Materiał do badań stanowiły próbki krwi żyłnej pobrane od 49 pacjentów. Wyniki uzyskane przy użyciu obu metod porównano między sobą stosując analizę regresji liniowej oraz test zgodności Passinga i Babloka.

**Wyniki.** Obie metody charakteryzowały się zbliżoną powtarzalnością (CV 0.55% dla HPLC i 0.56% dla immunoturbidymetrii). Odtwarzalność była wyraźnie lepsza przy zastosowaniu HPLC (CV w serii niejednoczesnej 1.22% vs 1.57%). Nieco lepszą dokładnością cechowała się natomiast immunoturbidymetria. Odzysk w metodzie HPLC wyniósł 96-100%, natomiast przy zastosowaniu immunoturbidymetrii 100-103%. Metoda HPLC w przeciwieństwie do immunoturbidymetrii nie wymagała manualnego przygotowania próbki, co zmniejszało możliwość błędów analitycznych. Wykazano, że przy użyciu immunoturbidymetrii uzyskiwane wyniki były średnio o 2.2% niższe, w porównaniu do metody HPLC.

**Wnioski.** Wykazano istnienie ograniczenia w metodzie turbidymetrycznej, jakim był zakres oznaczalności stężenia hemoglobiny całkowitej i HbA1c, wpływający na możliwość obliczenia odsetka HbA1c. Analiza statystyczna wykazała jednak istnienie bardzo dobrej korelacji między obiema metodami (współczynnik korelacji liniowej  $r=0.992$ ).